

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression von Cyclin D1, p27 und ER β im
hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Sandra Itzel
aus Offenbach am Main

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. Reles
 2. Priv.-Doz. Dr. med. D. Lüftner
 3. Prof. Dr. med. W. Friedmann

Datum der Promotion: 22.03.2013

1	EINLEITUNG.....	6
1.1	EPIDEMIOLOGIE.....	6
1.2	ÄTIOPATHOGENESE.....	7
1.2.1	<i>Risikofaktoren.....</i>	7
1.2.1.1	Alter.....	7
1.2.1.2	Familiäre Belastung.....	7
1.2.1.3	Endogene endokrine und reproduktive Faktoren.....	8
1.2.1.4	Gutartige Brusterkrankung.....	8
1.2.1.5	Hormonersatztherapie (HRT).....	8
1.2.1.6	Weitere Risikofaktoren.....	9
1.2.2	<i>Pathogenese des Mammakarzinoms.....</i>	9
1.3	HISTOLOGIE.....	9
1.4	STADIENEINTEILUNG NACH PTNM.....	9
1.5	PROGNOSEFAKTOREN.....	11
1.5.1	<i>Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz.....</i>	11
1.5.1.1	Alter.....	11
1.5.1.2	TNM-Status.....	11
1.5.1.3	Histologischer Typ.....	11
1.5.1.4	Differenzierungsgrad.....	11
1.5.1.5	Peritumorale Gefäßinvasion.....	12
1.5.1.6	Steroidhormonrezeptorstatus.....	12
1.6	PRÄDIKTIVE FAKTOREN.....	12
1.6.1	<i>Östrogen-/Progesteronrezeptorstatus.....</i>	12
1.6.2	<i>Menopausenstatus.....</i>	12
1.6.3	<i>HER-2/neu-Status.....</i>	13
1.7	THERAPIE.....	13
1.7.1	<i>Allgemeine Therapie.....</i>	13
1.8	ZELLZYKLUSREGULATION.....	13
1.9	TAMOXIFEN – WIRKMECHANISMUS UND RESISTENZ.....	14
1.9.1	<i>Östrogen und Östrogenrezeptor.....</i>	14
1.9.2	<i>Tamoxifen in der adjuvanten endokrinen Therapie.....</i>	15
1.9.3	<i>Tamoxifenresistenz.....</i>	16
1.9.3.1	Cytochrom P450 2D6 Metabolismus.....	17
1.9.3.2	Crosstalk zwischen ER- und HER2-Signalwegen.....	17
1.9.3.3	Erhöhte Expression bzw. Aktivität von ER-Coaktivatoren.....	18
1.9.3.4	Unterexpression von ERβ.....	18
1.9.3.5	Überexpression von Cyclin D1.....	19
1.9.3.6	Unterexpression von p27.....	19
1.10	CYCLIN D1.....	19
1.10.1	<i>Gen und Protein.....</i>	19
1.10.2	<i>Funktion von Cyclin D1.....</i>	20
1.10.3	<i>Regulation von Cyclin D1.....</i>	20

1.10.4	<i>Cyclin D1 und Karzinome</i>	21
1.10.5	<i>Cyclin D1 und das Mammakarzinom</i>	21
1.11	<i>p27</i>	22
1.11.1	<i>Gen und Protein</i>	22
1.11.2	<i>Funktion von p27</i>	22
1.11.3	<i>Regulation der p27 Expression</i>	23
1.11.4	<i>p27 und maligne Erkrankungen</i>	23
1.11.5	<i>p27 und das Mammakarzinom</i>	24
1.12	<i>ER β</i>	24
1.12.1	<i>Gen und Protein</i>	24
1.12.2	<i>Funktion von ERβ</i>	25
1.12.3	<i>Regulation von ERβ</i>	26
1.12.4	<i>ERβ und maligne Erkrankungen</i>	26
1.12.5	<i>ERβ und Mammakarzinom</i>	26
1.13	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	PATIENTINNEN UND KLINISCHE DATEN	28
2.2	TUMORGEWEBE	31
2.3	KONVENTIONELLE HISTOLOGISCHE DIAGNOSTIK	31
2.4	ERSTELLUNG DER TISSUE MICRO ARRAYS (TMA)	31
2.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	31
2.5.1	<i>Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1</i>	31
2.5.2	<i>Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1 an Paraffingewebe in Form von tissue micro arrays</i>	32
2.5.3	<i>Immunhistochemischer Nachweis von p27</i>	33
2.5.4	<i>Immunhistochemischer Nachweis von p27 an Paraffingewebe in Form von tissue micro arrays</i>	33
2.5.5	<i>Immunhistochemischer Nachweis von ERβ</i>	34
2.5.6	<i>Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptor β (ERβ) an Paraffingewebe in Form von tissue micro arrays</i>	35
2.6	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	36
2.7	VERWENDETE REAGENZIEN UND LÖSUNGEN	37
2.8	STATISTIK	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	ALTER DER PATIENTINNEN BEI DIAGNOSESTELLUNG	40
3.2	HISTOLOGIE	40
3.3	DIFFERENZIERUNGSGRAD (G)	41
3.4	PATHOLOGISCHES TUMORSTADIUM (PT)	43
3.5	LYMPHKNOTENBEFALL	44
3.6	ÖSTROGENREZEPTOR ALPHA (ER α)	46
3.7	PROGESTERONREZEPTOR (PR)	48

3.8	WACHSTUMSFRAKTION KI 67	50
3.9	HER-2/NEU-STATUS	51
3.10	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON CYCLIN D1	52
3.11	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON p27.....	59
3.12	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON ERβ	64
3.13	KOMBINATIONEN AUS CYCLIN D1, p27 UND ERβ	69
4	DISKUSSION.....	70
4.1	KLINISCHE UND HISTOLOGISCHE DATEN ALS PROGNOSEFAKTOREN	71
4.2	UNTERSUCHUNG DER ZELLYKLUSREGULATOREN.....	71
4.2.1	<i>Cyclin D1</i>	71
4.2.1.1	Cyclin D1 Expression beim Mammakarzinom	71
4.2.1.2	Cyclin D1 Expression und klinische und pathologische Parameter	75
4.2.1.3	Cyclin D1 als Prognosefaktor	76
4.2.1.4	Cyclin D1 als prädiktiver Faktor für Tamoxifen	78
4.2.2	<i>p27</i>	79
4.2.2.1	p27 Expression beim Mammakarzinom	79
4.2.2.2	p27 Expression und klinische und pathologische Parameter	81
4.2.2.3	p27 als Prognosefaktor	82
4.2.2.4	p27 als prädiktiver Faktor für Tamoxifen	83
4.2.3	<i>ERβ</i>	84
4.2.3.1	ERβ Expression beim Mammakarzinom.....	84
4.2.3.2	ERβ Expression und klinische und pathologische Parameter	88
4.2.3.3	ERβ als Prognosefaktor	89
4.2.3.4	ERβ als prädiktiver Faktor für Tamoxifen	90
4.3	CYCLIN D1, p27 UND ERβ IN KOMBINATION	91
4.3.1	<i>Cyclin D1/p27</i>	91
4.3.2	<i>Cyclin D1/ERβ</i>	92
4.3.3	<i>p27/ERβ</i>	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	97
	LITERATURVERZEICHNIS.....	99
	ANHANG	110
	LEBENS LAUF.....	110
	ERKLÄRUNG	111

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau mit weltweit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr. Es steht bei Frauen mit 14% weltweit an erster Stelle der Krebstodesursachen (Parkin et al. 2005). In Deutschland erkrankt etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Damit führt das Mammakarzinom nach wie vor die Rangfolge der Krebsinzidenz an (vor Kolonkarzinom, Bronchialkarzinom, Endometriumkarzinom, Magenkarzinom und Ovarialkarzinom) (Robert-Koch-Institut 2004; (RKI) 2005). Nach Aussage der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister und des Robert-Koch-Instituts gab es im Jahr 2000 47517 Neuerkrankungsfälle in Deutschland. Dies entspricht 24% aller weiblichen Krebserkrankungen (Robert-Koch-Institut 2004; (RKI) 2005). Epidemiologische Basiszahlen in Deutschland sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Epidemiologische Basiszahlen.

Jährliche Neuerkrankungen in Deutschland (absolut) ^{a,b}	2000	47517 Frauen ^d
Anteil an allen Krebsneuerkrankungen ^a	2000	24%
Mittleres Erkrankungsalter ^c	1998-2000	63,9 Jahre
Mediane Überlebenszeit (tumorabhängiger Tod) für M0 ^c	ab 1994	7,0 Jahre
Mediane Überlebenszeit (tumorabhängiger Tod) für alle, inkl. M1 ^c	ab 1994	6,3 Jahre
Zehnjahres-Überlebensrate (Gesamtüberleben) ^c	ab 1994	61%
Sterbefälle an Brustkrebs in Deutschland ^a	2000	17814 Frauen
Anteil der krebsbedingten Sterbefälle in Deutschland ^a	2000	18%

^a Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (3)

^b Robert-Koch-Institut (RKI) (4)

^c Tumorregister München (TRM), Jahresberichte 1999 bis 2001/2002 (5-7); M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasen vorhanden

^d Bei ca. 42 Mio. Frauen in Deutschland

Die Inzidenz des Mammakarzinoms zeigt weltweit starke regionale Unterschiede: Am häufigsten tritt es in Nordamerika und Westeuropa mit 85-99 Fällen/100 000/Jahr (altersstandardisierte Rate) auf. Vor allem an den altersstandardisierten Raten (ASR) ist der große Unterschied zwischen

den so genannten „more developed countries“ mit einer ASR von 67,8 und den „less developed countries“ mit einer ASR von 23,8 zu Gunsten der letzteren deutlich abzulesen (Parkin et al. 2005).

Laut amtlicher Todesursachenstatistik ist das Mammakarzinom bezüglich der Mortalität in Deutschland die häufigste Krebstodesursache. Die Mortalität des Mammakarzinoms in Deutschland ist seit 1997 rückläufig. Zu dieser Entwicklung haben Fortschritte in der Früherkennung und der Therapie des Mammakarzinoms maßgeblich beigetragen. Eine Abnahme der Mortalität von z.T. über 20% wird seit Ende der 1980er Jahre in England und den USA verzeichnet.

1.2 Ätiopathogenese

1.2.1 Risikofaktoren

1.2.1.1 Alter

Das Alter gilt abgesehen vom Geschlecht - das Mammakarzinom ist mit 0,6% bei Männern eine Rarität - als der wichtigste Risikofaktor. Das relative Risiko (RR) von Frauen mit einem Mindestalter von 50 Jahren im Vergleich zu jüngeren Frauen beträgt 6,5 (Armstrong et al. 2000). Die Inzidenz des Mammakarzinoms steigt mit zunehmendem Alter signifikant an und verdoppelt sich ca. alle 10 Jahre bis zum Eintreten der Menopause. Um das Alter von 50 Jahren erreicht die altersspezifische Inzidenzrate ein kleines Plateau um postmenopausal erneut stärker anzusteigen (Ausnahme: Japan) (McPherson et al. 2000).

1.2.1.2 Familiäre Belastung

Das relative Risiko bei einer Mammakarzinomerkrankung in der Verwandtschaft ersten Grades liegt je nach individueller Konstellation zwischen 1,4 und 13,6. Bei Verwandtschaft zweiten Grades ergibt sich ein relatives Risiko von 1,5-1,8 (Armstrong et al. 2000). Allerdings sind nur 5-10% aller Mammakarzinome hereditär. Unter diesen ist das familiäre Mamma- und/oder Ovarialkarzinomsyndrom mit einer Häufigkeit von 70-90% aller hereditären Mammakarzinome das häufigste. Es wird hauptsächlich mit autosomal dominant vererbten Keimbahnmutationen in den Brustkrebsgenen BRCA1 (Chromosom 17q21) und BRCA2 (13q12) assoziiert. Das durchschnittliche kumulative Risiko für BRCA1-Mutationsträgerinnen bis zum Alter von 70 Jahren an Mammakarzinom zu erkranken beträgt 65%, für das Ovarialkarzinom 40% (Antoniou et al. 2003). Im Falle der BRCA2-Mutation wird das Risiko für das Mammakarzinom auf 45% und für das Ovarialkarzinom auf 11% geschätzt (Antoniou et al. 2003).

1.2.1.3 Endogene endokrine und reproduktive Faktoren

Veränderungen des hormonellen Milieus spielen bei der Entwicklung der Brust während und nach wichtiger Stadien wie z.B. der Menarche, Menopause, Schwangerschaft und Laktation eine maßgebliche Rolle. So liegt auch deren Einfluss auf die Pathogenese des Mammakarzinoms nahe. So gelten eine frühe Menarche (RR 1,2-1,5 für <12 vs. ≥14 Jahre), eine späte Menopause (RR 1,5-2,0 für ≥55 vs. <55 Jahre) und ein höheres Alter bei erster Lebendgeburt (1,3-2,2 für >30 vs. <20 Jahre) als anerkannte Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms (Armstrong et al. 2000).

1.2.1.4 Gutartige Brusterkrankung

Patientinnen, bei denen eine Mammabiopsie den histologischen Befund einer gutartigen Brusterkrankung ergab, haben ein erhöhtes Risiko für eine Mammakarzinomerkrankung (RR 1,56). Im einzelnen haben gutartige Brusterkrankungen mit Atypien ein RR von 4,24, solche mit proliferativen Veränderungen ohne Atypien ein RR von 1,88 und nonproliferative Läsionen ein RR von 1,27 (Hartmann et al. 2005). Dieser Sachverhalt gibt wiederum mögliche Hinweise für die Pathogenese des Mammakarzinoms (s.u.).

1.2.1.5 Hormonersatztherapie (HRT)

Eine Reanalyse von Beral et. al. im Jahre 1997, die Daten aus 51 epidemiologischen Studien auswertete, ermittelte ein erhöhtes relatives Mammakarzinomrisiko von 1,35 nach HRT über mehr als fünf Jahre (1997). Dabei hält die Risikoerhöhung lediglich für den Zeitraum der Hormonersatzbehandlung an und sinkt nach deren Absetzen allmählich auf das Niveau von Patientinnen ohne HRT. Darauf folgende Studien zeigten eine stärkere Risikoerhöhung bei Gestagenzusatz im Vergleich zur Östrogenmonotherapie im Rahmen der HRT. Die „Million Women Study“, eine prospektive Kohortenstudie, ermittelte für Anwenderinnen von Östrogen-Gestagen-Kombinationen ein RR von 2,0, für Anwenderinnen einer Östrogenmonotherapie ein RR von 1,3 und für diejenigen unter Tibolon ein RR von 1,45 ein Mammakarzinom zu entwickeln (Beral 2003). In der WHI-Studie ergab sich eine Hazard Ratio (HR) von 1,26 nach einer durchschnittlichen Einnahmedauer von 5,2 Jahren für den Östrogen-Gestagen-Arm und keinen signifikanten Unterschied für den Östrogen-Arm (Rossouw et al. 2002). Die HERS-Studie zeigte eine nicht-signifikante Risikoerhöhung nach einer im Mittel 4,1-jährigen Einnahmedauer von Östrogen-Gestagen-Präparaten (Hulley et al. 2002).

1.2.1.6 Weitere Risikofaktoren

Anderen Risikofaktoren wie fettreicher Diät (RR=1.05) (Hunter et al. 1996) oder Alkoholkonsum (RR=1,09-1,41) (Smith-Warner et al. 1998) konnte eine Bedeutung für die Entstehung des Mammakarzinoms nicht oder nur in geringem Maße nachgewiesen werden oder sind in der allgemeinen Bevölkerung sehr selten (wie z.B. Strahlenexposition oder Chemotherapie).

1.2.2 Pathogenese des Mammakarzinoms

Entsprechend dem linearen Tumorprogressionsmodell zur Entstehung und Progression des kolorektalen Karzinoms (Fearon and Vogelstein 1990) geht man auch bei der Entwicklung des Mammakarzinoms von einer kaskadenartigen Abfolge genetischer Alterationen aus. Diese vollzieht sich auf unterschiedlichen Regulationsebenen des Zellwachstums und der Zellproliferation. Dieses als Mehrschrittkarzinogenese beschriebene Modell wird durch pathologisch-epidemiologische (siehe 1.2.1.4 Gutartige Brusterkrankung) und molekularbiologische Daten gestützt. So fand man von der duktalem Hyperplasie hin zum invasiven Karzinom eine graduelle Zunahme der Mutationsfrequenz (O'Connell et al. 1998).

1.3 Histologie

Die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO 2003) gibt die histologische Typisierung der invasiven Mammakarzinome vor. Dabei ist das invasive duktales Karzinom mit 40-75% die häufigste Tumorform, gefolgt von dem invasiven lobulären mit 5-15%, dem medullären mit 1-7%, dem tubulären mit 1-2%, dem muzinösen mit ebenfalls 1-2% und dem papillären Karzinom mit max. 1-2%. Die übrigen Karzinomtypen sind mit einer jeweiligen Häufigkeit von <1% sehr selten.

1.4 Stadieneinteilung nach pTNM

Zur Stadieneinteilung des Mammakarzinoms siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms nach UICC 6. Auflage 2002 (UICC 2002 TNM classification of malignant tumours. Wiley-Liss, Inc, New York)

pT – Primärtumor	
pT X	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT 0	kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pTis (DCIS)	duktales Carcinoma in situ
pTis (LCIS)	lobuläres Carcinoma in situ
pTis (Paget)	Paget Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbaren Tumor
pT1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion von 0,1cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	mehr als 0,1cm, aber nicht mehr als 0,5cm in größter Ausdehnung
pT1b	mehr als 0,5cm, aber nicht mehr als 1cm in größter Ausdehnung

pT1c pT2 pT3 pT4 pT4a pT4b pT4c pT4d	mehr als 1cm, aber nicht mehr als 2cm in größter Ausdehnung Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 5cm in größter Ausdehnung Tumor mehr als 5cm in größter Ausdehnung Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut mit Ausdehnung auf die Brustwand mit Ödem, Ulzerationen der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust Kriterien 4a und 4b gemeinsam entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pN – Regionäre Lymphknoten pNX pN0 pN1mic pN1 pN1a pN1b pN1c pN2 pN2a pN2b pN3 pN3a pN3b pN3c	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt) keine regionalen Lymphknotenmetastasen Mikrometastase (größer als 0,2mm, aber nicht größer als 2mm in max. Ausdehnung). Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren. Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2mm in max. Ausdehnung. Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren. Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren. Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen. Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2mm in max. Ausdehnung. Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen. Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbarer(en), mikroskopisch nachweisbarer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten. Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 2mm in max. Ausdehnung) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten. Metastase(n) in klinisch erkennbarem(en) Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinellymphknoten-Dissektion, aber nicht klinisch erkennbar. Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten.
pM – Fernmetastasen pMX pM0 pM1	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden keine Fernmetastasen Fernmetastasen

1.5 Prognosefaktoren

Im Folgenden sollen die etablierten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom, denen eine gesicherte unabhängige klinische Relevanz nachgewiesen wurde, erläutert werden.

1.5.1 Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz

1.5.1.1 *Alter*

Mammakarzinompatientinnen unter 35 Jahren haben eine schlechtere Prognose als ältere Patientinnen. Es besteht eine hochsignifikante Prävalenzabnahme von ungünstigen prognostischen Merkmalen (z.B. Differenzierungsgrad 3, Lymphgefäßinvasion) mit zunehmendem Alter (Nixon et al. 1994). Nach multivariater Analyse erwies sich jüngeres Alter als ein signifikanter Prognosefaktor für Rezidive und Sterblichkeit.

1.5.1.2 *TNM-Status*

Die Tumorgröße ist einer der bedeutendsten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom. Dies gilt auch für eine follow-up Periode von bis zu 20 Jahren (Arriagada et al. 2006). Da mit zunehmender Tumorgröße die Wahrscheinlichkeit von Lymphknotenmetastasen zunimmt, besteht eine starke Interaktion zwischen diesen beiden Prognosefaktoren. Jedoch ist der Nodalstatus von starker unabhängiger prognostischer Relevanz. Die Mortalität nodalpositiver Patientinnen ist im Vergleich zu Patientinnen ohne Lymphknotenbefall ca. 4-8mal höher (Arriagada et al. 2006). Bei nodalpositiven Patientinnen ist die Anzahl befallener Lymphknoten von signifikanter prognostischer Bedeutung. Das mediane RFÜ beträgt für Patientinnen mit ein bis drei befallenen Lymphknoten 11,1 Jahre, im Falle von vier bis neun befallenen Lymphknoten 5,4 Jahre und bei 10 oder mehr befallenen Lymphknoten 2,1 Jahre (Weiss et al. 2003). Patientinnen mit fernmetastasiertem Mammakarzinom haben abhängig von dem gleichzeitigen Bestehen eines Lokalrezidivs eine 20-Jahresüberlebensrate von 0,09 bis 0,18 (Hatteville et al. 2002).

1.5.1.3 *Histologischer Typ*

Der histologische Typ ist ebenfalls von ausgesprochener prognostischer Relevanz. So nehmen bestimmte Sonderformen wie z.B. das tubuläre, invasive kribriforme oder muzinöse Karzinom einen signifikant günstigeren Verlauf als das invasive duktales Karzinom (Ellis et al. 1992).

1.5.1.4 *Differenzierungsgrad*

Der Differenzierungsgrad ist ein starker unabhängiger prognostischer Faktor. Eine schlechtere Differenzierung des Tumorgewebes ist mit einem schlechteren Langzeitüberleben assoziiert

(Arriagada et al. 2006). Je nach Tumorgröße und Nodalstatus gehen gut differenzierte Mammakarzinome mit einer 10-Jahresüberlebensrate von 90-94% und solche mit schlechter Differenzierung mit einer 10-Jahresüberlebensrate von 30-78% einher (Pinder et al. 1998; Kollias et al. 1999; Reed et al. 2000; Frkovic-Grazio and Bracko 2002).

1.5.1.5 Peritumorale Gefäßinvasion

Die peritumorale Lymph- oder Blutgefäßinvasion geht mit einem signifikant erhöhten Lokalrezidivrisiko und einer schlechteren Prognose in nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen einher (Colleoni et al. 2007).

1.5.1.6 Steroidhormonrezeptorstatus

Der prognostische Wert des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus ist nur eingeschränkt bedeutsam, da der Überlebensvorteil der hormonrezeptorpositiven Tumore ohne adjuvante systemische Therapie nach 5 Jahren bei ca. 10% liegt (Clark and McGuire 1988) und er mit der Dauer der Beobachtungszeit gegen null geht (Mason et al. 1983; Adami et al. 1985). Da die Prognose im Zusammenhang mit dem Hormonrezeptorstatus stark von der adjuvanten Therapie abhängt, liegt seine Bedeutung vielmehr in seiner prädiktiven Aussagekraft für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie.

1.6 Prädiktive Faktoren

1.6.1 Östrogen-/Progesteronrezeptorstatus

Ein positiver Hormonrezeptorstatus ist seit Jahren als bester prädiktiver Marker für eine anti-hormonale Therapie etabliert. Einige Studien weisen zusätzlich auf ein besseres Ansprechen hormonrezeptornegativer Mammakarzinome auf primäre Chemotherapie hin (Colleoni et al. 2004).

1.6.2 Menopausenstatus

Der Menopausenstatus ist wegweisend für die Art der adjuvanten endokrinen Therapieführung. Die endokrine Standardtherapie bei postmenopausalen Frauen besteht aus Tamoxifen, Aromataseinhibitoren oder einer Sequenztherapie. Für prämenopausale Patientinnen, die keine Chemotherapie erhalten, ist eine Kombinationstherapie aus GnRH(Gonadotropin-Releasing-Hormon)-Analoga und Tamoxifen oder eine Tamoxifenmonotherapie der empfohlene Standard (Goldhirsch et al. 2009). Der Einsatz von Aromataseinhibitoren zur Behandlung prämenopausaler Mammakarzinompatientinnen ist noch Gegenstand klinischer Studien.

1.6.3 HER-2/neu-Status

Die Bestimmung des HER-2/neu-Status ist mittlerweile ein integraler Bestandteil des optimalen Mammakarzinommanagements geworden. Dieser ist prädiktiv für eine Behandlung mit Trastuzumab, einem humanisierten Antikörper gegen das HER-2/neu-Onkoprotein (Piccart et al. 2001). Im Rahmen der 10. Internationalen Expertenkonsensuskonferenz St. Gallen 2007 wurde die adjuvante Therapie mit Trastuzumab angesichts der erfolgreichen Daten laufender Studien in die Therapieempfehlungen aufgenommen (Romond et al. 2005; Slamon D 2006; Smith et al. 2007).

1.7 Therapie

1.7.1 Allgemeine Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms besteht aus den drei Hauptpfeilern der operativen, radioonkologischen und (neo)adjuvanten systemischen Therapie. Bezüglich der operativen Therapie wird die brusterhaltende Therapie (BET) mit Sentinellymphknotenentfernung und/oder Axilla-dissektion und Radiatio des Restparenchyms der Mamma bei Fehlen von Kontraindikationen favorisiert. Allerdings ist die Mammakarzinomtherapie im Sinne einer Individualisierung zu sehen, die wichtige Aspekte der Tumorbeschaffenheit und den Patientenwunsch berücksichtigt. Insbesondere die adjuvante Systemtherapie des Mammakarzinoms entwickelt sich immer mehr in Richtung zielgerichteter Konzepte. Neue Erkenntnisse über molekularbiologische Tumoreigenschaften werden miteinbezogen und werden somit der Vorstellung vom Mammakarzinom als einer heterogenen Tumorentität gerecht. So basieren die Therapieempfehlungen zur adjuvanten Therapie der Konsensuskonferenz von St. Gallen 2009 im Wesentlichen auf der Expression prädiktiver Marker unter Berücksichtigung des prognostischen Risikoprofils (Goldhirsch et al. 2009).

1.8 Zellzyklusregulation

In der Karzinogenese spielen Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Onkogene eine wichtige Rolle. Doch auch Alterationen im regulären Zellzyklus können einen wesentlichen Einfluss auf Tumorentstehung, Ausbreitung und mögliche Resistenzentwicklungen gegenüber endokrinen Therapien haben. Der Zellzyklus teilt sich in vier Phasen. Während sich die meisten Zellen des menschlichen Organismus in der G₀-Phase (Ruhephase) befinden, kann der Eintritt in den Zellzyklus durch verschiedene Regulatoren induziert werden. So durchläuft die Zelle aufeinanderfolgend die G₁-Phase (Vorbereitung der DNA-Synthese), die S-Phase (Synthese der DNA), die G₂-Phase (Vorbereitung der Mitose) und die M-Phase (Mitose). In der Regulation des Zellzyklus

haben die cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) eine Schlüsselfunktion inne. Dies sind Serin/Threonin Kinasen, die nach Bindung mit Cyclinen aktive heterodimere Komplexe bilden. Diese wiederum induzieren via Phosphorylierung von Zielproteinen eine Progression im Zellzyklus. So wird CDK2 sequentiell von den Cyclinen E1 und E2 während des G1/S-Übergangs und von den Cyclinen A1 und A2 während der S-Phase aktiviert. CDK4 und CDK6 spielen gemeinsam mit den D-Cyclinen (D1, D2 und D3) in der frühen G1-Phase eine Rolle, wobei ihr Einfluss auf den sogenannten „restriction point“ von besonderem Interesse ist. Bei diesem handelt es sich um ein kritisches Ereignis während G1, nach dessen Überschreitung die Zelle unabhängig von mitogenen oder antiproliferativen Stimuli unweigerlich in den fortschreitenden Zellzyklus eintritt. Somit ist die Bedeutung der Dysregulation dieses „Restriktionspunktes“ für die Karzinogenese via unkontrollierte Proliferation nachvollziehbar. Zwei Typen von cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKI) fungieren als Gegenspieler der CDKs. So inhibieren die CKIs der Gruppe INK4 - INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) und INK4D (p19) - die CDK4/6-Komplexierung mit den D-Cyclinen. Die WAF-KIP Gruppe bestehend aus WAF1/CIP1 (p21), KIP1 (p27) und KIP2 (p57) hemmen die CDK2- und CDK4/6-Aktivität durch Bildung von heterotrimeren Komplexen mit diesen (Malumbres and Barbacid 2001). Die Hauptsubstrate von CDK4/6 und CDK2 in der G1-Progression sind die sogenannten Retinoblastoma-Proteine RB, p130 und p107. Diese binden Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und verhindern so deren Aktivität in der G0- und M-Phase und tragen zur Unterdrückung von Promotoren bei. Durch die CDK4/6-CyclinD-Komplexe werden die RB-Proteine teilweise phosphoryliert, was deren inhibierende Wirkung auf die Transkriptionsfaktoren zum Teil aufhebt, so dass Gene wie Cyclin E transkribiert werden können. Die Bindung von Cyclin E and CDK2 phosphoryliert wiederum RB, so dass dessen Hemmung auf E2F hinfällig wird und E2F-responsive Gene induziert werden, die den Zellzyklus weiter vorantreiben (Malumbres and Barbacid 2001). Expressionsalterationen von Zellzyklusregulatoren sind ein häufiges Ereignis in der Karzinogenese. Dabei bestehen die Alterationen sowohl in Cyclinüberexpression (vor allem Cyclin D1 und E1) und CDK-Überexpression (hauptsächlich CDK4 und CDK6) als auch in RB- und CKI-Expressionsverlust (v.a. INK4A, INK4B und KIP1) (Malumbres and Barbacid 2001).

1.9 Tamoxifen – Wirkmechanismus und Resistenz

1.9.1 Östrogen und Östrogenrezeptor

Die entscheidende Rolle von Östrogen und speziell 17β -Estradiol (E_2) in der Pathogenese und Progression des Mammakarzinoms wurde ausführlich untersucht. Bekannt ist, dass die kumula-

tive Exposition der Brustdrüse gegenüber endogenen und exogenen Hormonen zu sporadischen Mammakarzinomen führen kann (Foster et al. 2001). Die Östrogenwirkung in Zielgeweben wird über spezifische intrazelluläre Rezeptorproteine namens Östrogenrezeptor α (ER α) und Östrogenrezeptor β (ER β) vermittelt. Der ER ist ein überwiegend nukleäres Protein, das als Ligand-aktivierbarer Transkriptionsfaktor agiert und die Expression unterschiedlicher Gene reguliert. Viele dieser Gene (z.B. Insulin-like growth factor 1 Rezeptor, Cyclin D1, Bcl-2) fördern die Proliferation und das Überleben von Mammakarzinomzellen. ER besteht aus sechs Domänen, darunter zwei Transkriptionsaktivierungsfunktionsdomänen (AF): die Ligand-unabhängige AF1 und die Ligand-abhängige AF2. Östrogen induziert durch Bindung an AF2 eine Konformationsänderung vom ER und es bilden sich Dimere (entweder α/α , β/β Homodimere oder α/β Heterodimere), die nach Bindung an sogenannte östrogen-responsive Elemente (ERE) in der Promotorregion von östrogen-responsiven Genen die Rekrutierung von Coaktivatoren oder Corepressoren ermöglichen. Dieser Komplex induziert oder supprimiert anschließend die Transkription (Lewis and Jordan 2005; Speirs and Walker 2007). Neben diesem AF2-vermittelten Signalweg kann ER die Gentranskription auch Ligand-unabhängig über AF1 beeinflussen. Im Rahmen der sogenannten „non-classic action“ kann er als Coregulator über Protein-Protein Interaktionen die Transkription von ERE-fremden Genen z.B. via AP-1 (Activating Protein 1) regulieren. Zusammen werden diese Effektorwege als Nukleär-initiierte Steroid-Signalwege (NISS) bezeichnet. Zusätzlich wurde auch ein Membran-initiiertes Steroid-Signalweg (MISS) postuliert, der den Wirkmechanismus plasmamembrannaher ERs beschreibt. Hier greift der ER östrogenabhängig in multiple Signalwege von Wachstumsfaktoren wie IGFR und HER2 ein (Schiff et al. 2005). Der ER α und der ER β weisen ausgedehnte Homologien auf. Während die Bedeutung vom ER α für die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms hinreichend bestätigt wurde, ist die Rolle von ER β noch weitgehend kontrovers. Einige Studien weisen auf eine antagonistische Wirkung zu ER α hin (Hall and McDonnell 1999; Liu et al. 2002) und eine Assoziation von niedriger ER β Expression und Tamoxifenresistenz wird diskutiert (Hopp et al. 2004).

1.9.2 Tamoxifen in der adjuvanten endokrinen Therapie

Tamoxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM), der durch östrogenagonistische und -antagonistische Wirkungen in unterschiedlichen Gewebearten gekennzeichnet ist. Als erster klinisch relevanter SERM wurde Tamoxifen durch seine östrogenantagonistische Wirkung in Brustgewebe zum am meisten angewandten Medikament in der Mammakarzinomtherapie. Seine signifikant vorteilhafte Wirkung auf rezidivfreies und Gesamtüberleben bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom unabhängig von Alter, Nodalstatus und Meno-

pausenstatus wurde in großen klinischen Studien wiederholt unter Beweis gestellt (1998). So verringert die 5-jährige adjuvante Tamoxifeneinnahme das jährliche Rezidivrisiko bzw. die Mortalität um 47% bzw. 26%. Außerdem wird das Risiko von kontralateralem Mammakarzinom um fast 50% gesenkt. Auch in der Chemoprävention des Mammakarzinoms in Hochrisikogruppen hat sich Tamoxifen etabliert (Cuzick et al. 2003). Jedoch ist der genaue Wirkmechanismus bis heute nicht vollkommen geklärt. In Tumorgewebe aus Tier- und Zellmodellen bewirkte es über Mediatorgene wie Cyclin D1 eine Reduktion der Proliferationsfraktion und eine Zunahme der Tumorzellapoptose und des Zellzyklusarrestes in G1/G0 (Christov et al. 2003). Auf molekularer Ebene konkurriert Tamoxifen direkt mit Östrogen um die Bindung an die AF-2-Domäne von ER α . Die Bindung von Tamoxifen an AF-2 induziert spezifische Konformationsänderungen von ER α , die zu einer Assoziation der Amino- und Carboxylterminalen Regionen führen. Diese Interaktion ist jedoch transkriptionell unproduktiv. Über diesen direkten Weg und über die indirekte Inhibition via Rekrutierung von Corepressoren verhindert Tamoxifen die Aktivierung der Gentranskription (Katzenellenbogen et al. 1997; Lewis and Jordan 2005). Da die ER α -Aktivität im Brustepithel hauptsächlich AF2-vermittelt ist, verhält sich Tamoxifen in Brustzellen im Wesentlichen antagonistisch. In anderen AF1-dominanten Geweben wie z.B. dem Endometrium entfaltet es hingegen agonistische Wirkung (Ali and Coombes 2002). Andere Studien hingegen zeigten agonistische Wirkungen von Tamoxifen in Brustkrebszellen, indem es dieselben Gene wie Östrogen induzierte, die für die Zellzyklusprogression verantwortlich sind. Allerdings wurden die Gene für Cyclin D1, fra-1 und UNG (Uracil-DNA-Glykosylase) zwar von Östrogen induziert, aber nicht von Tamoxifen (Hodges et al. 2003). Dieser Sachverhalt könnte auf eine „gatekeeper“-Funktion von Cyclin D1 hinweisen, die über Agonismus versus Antagonismus in Brustkrebszellen, und damit die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen entscheidet. Trotz der wachsenden Bedeutung der Sequenz- und Monotherapie mit Aromataseinhibitoren (AI) bleibt die alleinige Tamoxifengabe über 5 Jahre eine wichtige endokrine Standardtherapie (Goldhirsch et al. 2009).

1.9.3 Tamoxifenresistenz

Die Resistenz gegen Tamoxifen lässt sich als intrinsische (= *de novo*) oder erworbene Resistenz klassifizieren. Die intrinsische Resistenz ist als initiales Nicht-Ansprechen des Mammakarzinoms auf eine endokrine Therapie definiert, während ein im Verlauf eintretendes Therapieversagen als erworbene Resistenz bezeichnet wird. Trotz der Erfolge in der Behandlung des hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms durch endokrine Therapien, besteht in ca. 30% aller ER α -positiven Mammakarzinome eine intrinsische Resistenz gegen Tamoxifen. Zusätzlich entwickelt

die Mehrheit der initial gut auf Tamoxifen ansprechenden Mammakarzinome eine erworbene Resistenz trotz fortbestehender ER α Expression (Lewis and Jordan 2005). Die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen für die intrinsische und erworbene Resistenz sind bisher nicht geklärt und von ausgesprochener klinischer Bedeutung. Die Tatsache, dass tamoxifenresistente Mammakarzinome auf Aromataseinhibitoren oder den reinen ER α -Antagonisten Fulvestrant ansprechen, weist auf eine persistierende Bedeutung von Östrogen in der Tumorregulation hin (Lewis and Jordan 2005). Im Folgenden werden einige mögliche Mechanismen der Tamoxifenresistenz erörtert.

1.9.3.1 Cytochrom P450 2D6 Metabolismus

Tamoxifen erfährt durch das Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) eine Umwandlung in die Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen, welches eine 30-100fach höhere antiöstrogene Potenz aufweist als Tamoxifen, und N-Desmethyltamoxifen. Endoxifen (4-Hydroxy-N-Desmethyltamoxifen), ein weiterer Tamoxifenmetabolit, verfügt im Vergleich zu 4-Hydroxytamoxifen über äquivalente Eigenschaften in Bezug auf Bindung von ER α und ER β (Johnson et al. 2004), Hemmung der ER-abhängigen Zellproliferation in Mammakarzinom-Zelllinien (Lim et al. 2005) und ER-abhängige Genexpression (Lim et al. 2006). Zudem liegt Endoxifen bei Mammakarzinompatientinnen mit regelmäßiger Tamoxifeneinnahme in durchschnittlich 6-10fach höheren Plasmakonzentrationen vor als 4-Hydroxytamoxifen und steht in direktem Verhältnis zu genetischen Alterationen und Inhibition des enzymatischen Systems von CYP2D6 (Borges et al. 2006). Somit scheint Endoxifen der primäre aktive Metabolit von Tamoxifen zu sein. Ein verringerter CYP2D6 Metabolismus durch genetische Alterationen oder durch Co-Medikation mit CYP2D6-Inhibitoren war in einer klinischen Studie von postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen unter Tamoxifentherapie mit einem signifikant kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert (Goetz et al. 2007).

1.9.3.2 Crosstalk zwischen ER- und HER2-Signalwegen

Die Signalwege von ER und EGFR/HER2 interagieren auf unterschiedlichen Ebenen miteinander. Einerseits induziert ER im Rahmen der nukleär-initiierten Steroid-Signalwege die Expression von unterschiedlichen HER und Wachstumsfaktor-Rezeptor-Liganden. Andererseits führen multiple Wachstumsfaktor-Rezeptor-abhängige Signalwege über unterschiedliche Kinasen zur Phosphorylierung von ER und verschiedener Faktoren des ER-Signalweges. Diese Phosphorylierung potenziert die ER-vermittelte Gentranskription. Eine derartige gesteigerte Phosphorylierung durch Überexpression von Rezeptoren der HER-Familie führt möglicherweise zu einer Ligand-unabhängigen oder Tamoxifen-vermittelten Aktivierung von ER und somit zu Tamoxifenre-

sistenz. Eine weitere Ebene des Zusammenspiels zwischen ER- und HER-Signalwegen involviert den membran-initiierten Steroid-Signalweg von ER. Der membran-assoziierte ER kann direkt oder indirekt EGFR, HER2 und IGFR-1 und konsekutiv die entsprechenden Wachstumsfaktorrezeptor-abhängigen Kinasekaskaden aktivieren. Letztere phosphorylieren und aktivieren wiederum den nukleären ER und seine Coregulatoren. Tamoxifen könnte im Rahmen der membran-initiierten Steroid-Signalwege als ER-Agonist agieren und somit in Tumorwachstum und Therapieresistenz resultieren. Zudem ist die membran-assoziierte ER-Aktivität von der Expression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren und deren Liganden abhängig. Folglich ist dies möglicherweise der vorherrschende ER-Signalweg in Mammakarzinomzellen mit Überexpression von HER2 und/oder EGFR (Arpino et al. 2008). Präklinische und klinische Studien unterstützen diese Hypothesen. Langzeitkulturen von Mammakarzinomzellen wiesen bei erworbener Tamoxifenresistenz eine erhöhte Expression von EGFR/HER2, eine verstärkte Aktivierung von EGFR/HER2 Heterodimeren und gesteigerte Phosphorylierung von nukleärem ER auf. Mammakarziompatientinnen unter Tamoxifentherapie mit HER-2 und EGFR-Überexpression haben ein schlechteres outcome (Arpino et al. 2008).

1.9.3.3 Erhöhte Expression bzw. Aktivität von ER-Coaktivatoren

Überexpression von ER-Coaktivatoren und Downregulation von ER-Corepressoren können die inhibitorische Wirkung endokriner Therapien, insbesondere der selektiven Östrogenrezeptormodulatoren wie z. B. Tamoxifen, aufheben. Zudem verstärkt eine durch Wachstumsfaktorrezeptor-Signalwege vermittelte Phosphorylierung von ER-Coaktivatoren die Aktivität dieser Coaktivatoren. So kann bei Coaktivator-Phosphorylierung eine Tamoxifen-vermittelte ER-Aktivierung stattfinden. In einer experimentellen Studie an Mammakarzinomzelllinien, welche HER2 und den ER-Coaktivator AIB1 überexprimierten, wirkte Tamoxifen bei niedrigen Östrogenkonzentrationen als ein potenter Agonist in Bezug auf Tumorwachstum. Zwei unabhängige klinische Studien zeigten, dass eine hohe Expression des ER-Coaktivators AIB1 bei Mammakarzinompatientinnen mit einem geringeren Ansprechen auf Tamoxifen assoziiert ist (Arpino et al. 2008).

1.9.3.4 Unterexpression von ER β

Während die Bedeutung von ER α im Mammakarzinom weitgehend unumstritten ist (Osborne et al. 2001), ist die Rolle von ER β in dieser Tumorentität weiterhin unklar. Jedoch weisen Studien auf eine antagonistische Aktivität von ER β gegenüber ER α hin. So kann ER β durch Bildung von Heterodimeren mit ER α dessen Aktivität inhibieren (Pettersson et al. 2000). In experimentellen Versuchen an Mäusen mit Deletionen von ER β oder ER α konnte ER β die Transkription von

Östrogen-responsiven Genen signifikant inhibieren. Tamoxifen fungierte über ER β als reiner Antagonist in Bezug auf Östrogen-responsive Gene, während es über ER α eine partiell agonistische Wirkung entfaltete (Hall and McDonnell 1999). Mehrere retrospektive klinische Studien zeigten eine Assoziation von niedriger ER β Expression und Resistenz gegenüber endokrinen Therapien wie z.B. Tamoxifen (Murphy and Watson 2006).

1.9.3.5 Überexpression von Cyclin D1

Auf molekularer Ebene treibt Cyclin D1 als Komplex mit CDK4/6 den G1/S-Übergang im Zellzyklus voran und potenziert die Aktivität von ER α durch Rekrutierung von Coaktivatoren wie NCOA1 und PCAF (Ali and Coombes 2002). In Zellkulturexperimenten konnte in Cyclin D1-überexprimierenden Zellen eine akute Tamoxifenresistenz nachgewiesen werden (Hui et al. 2002). In einer weiteren Studie wiesen Zellen mit erworbener Tamoxifenresistenz eine erhöhte Expression von Cyclin D1 auf (Kilker et al. 2004) und in tamoxifenresistenten Zellkulturen konnte die essentielle Bedeutung von Cyclin D1 für die Tamoxifen-induzierte Zellzyklusprogression gezeigt werden (Kilker and Planas-Silva 2006).

1.9.3.6 Unterexpression von p27

Als Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) ist p27 ein wichtiger negativer Regulator der Zellzyklusprogression. Eine Downregulation von p27 geht in Zellkulturen mit einem Verlust des Tamoxifen-induzierten Zellzyklusarrests einher (Cariou et al. 2000). Eine klinische Studie an prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen, welche mit Tamoxifen und dem Gonadotropin-Releasing Hormon Analogon Goserelin behandelt wurden, ergab ein besseres outcome bei hoher Expression von p27 (Pohl et al. 2003).

1.10 Cyclin D1

1.10.1 Gen und Protein

Das Cyclin D1 Gen, bezeichnet als CCND1 oder PRAD1, liegt auf dem Chromosom 11q13. Es ist ein etabliertes Onkogen in unterschiedlichen Tumorentitäten, darunter auch das Mammakarzinom (Arnold and Papanikolaou 2005). Motokura et al. isolierten erstmalig das Cyclin D1 Gen. Eine Subgruppe von Nebenschilddrüsenadenomen verfügt aufgrund einer Inversion auf Chromosom 11 über einen Selektionsvorteil. Das verantwortliche aktivierte Onkogen wurde identifiziert und als PRAD1 (parathyroid adenoma 1) bezeichnet. Dessen überexprimiertes Genprodukt wurde später als Cyclin D1 bekannt (Motokura et al. 1991). Seine Bedeutung für die Karzinogenese wurde untermauert, als nachgewiesen wurde, dass es sich bei Cyclin D1 um das BCL-1 Onkogen

handelt. Dieses befindet sich an der Bruchstelle der charakteristischen t(11;14) (q13;q32) klonalen Translokation in Mantelzelllymphomen und einem Teil von Multiplen Myelomen (Swerdlow and Williams 2002).

1.10.2 Funktion von Cyclin D1

Cyclin D1 fungiert als Mediator von Wachstumsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass die Cyclin D1-Synthese bei Entzug des Wachstumsfaktors Colony-Stimulating Factor 1 in Makrophagen sistiert (Sherr et al. 1992). Die primäre Bedeutung von Cyclin D1 liegt in der Förderung der G1-Progression. Gemeinsam mit den Bindungspartnern CDK4 und CDK6 bildet Cyclin D1 Holoenzyme, welche den Zellzyklus durch Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (RB) vorantreiben. Nach Phosphorylierung wird die repressive Aktivität von RB auf den Transkriptionsfaktor E2F aufgehoben. Dies hat die Aktivierung der Transkription unterschiedlicher Gene zur Folge, welche für den Übergang von der G1- zur S-Phase und für die DNA-Replikation notwendig sind (Weinberg 1995). In der G1-Phase ist die Konzentration der Cyclin D1 mRNA am höchsten (Sherr 1996). Nach Beimpfung von Zellkulturen mit Anti-Cyclin D1 Antikörpern (Ak) vor Erreichen des Restriktionspunktes gehen viele Zellen nicht mehr in die S-Phase über. Eine solche Ak-Injektion hat hingegen zu einem Zeitpunkt nahe des G1/S-Übergangs keinen wachstumssupprimierenden Effekt (Quelle et al. 1993). Voraussetzung für diese Funktion von Cyclin D1 ist ein funktionsfähiges Retinoblastoma-Gen. Ohne RB kann der Zellzyklus in Anwesenheit von Cyclin D1-Ak nicht angehalten werden. Somit scheint die primäre Bedeutung von Cyclin D1-CDK-Komplexen in der Phosphorylierung von RB zu liegen (Hunter and Pines 1994). Desweiteren üben Cyclin D1-CDK-Komplexe über einen nicht-katalytischen Weg Einfluss auf den Zellzyklus aus. Sie konkurrieren mit den Cyclin E-CDK2-Komplexen um die Bindung an die CDK-Inhibitoren p21 und p27, was die Aktivierung der Cyclin E-CDK2-Komplexe in der späten G1-Phase erleichtert (Sherr and Roberts 1999). Darüberhinaus weisen Studien auf eine neue, CDK-unabhängige Funktion von Cyclin D1 hin. Es wurde gezeigt, dass Cyclin D1 eine regulierende Wirkung auf die Aktivität verschiedener Wachstumsfaktoren und Histon Deacetylasen hat (Coqueret 2002). Interessanterweise besteht eine weitere CDK-unabhängige Funktion von Cyclin D1 in der Ligand-unabhängigen Potenzierung der transkriptionellen Aktivität von ER α (Zwijsen et al. 1997; Zwijsen et al. 1998).

1.10.3 Regulation von Cyclin D1

Die Regulation von Cyclin D1 findet auf der Ebene der Transkription und Posttranskription statt. Dabei werden extrazelluläre Signale integriert, indem mitogene Faktoren während der G1-Phase

sowohl die Transkription und die Translation als auch die Lokalisation, Stabilität, den Abbau und die CDK-Komplexbildung von Cyclin D1 beeinflussen (Diehl 2002; Caldon et al. 2006). Östradiol vermittelt seine mitogenen Effekte zum Teil über die Aktivierung der ER α -abhängigen Cyclin D1-Synthese (Altucci et al. 1996; Foster and Wimalasena 1996). Diese stellt einen der Hauptendpunkte des RAS/RAF/MAPK-Signalweges dar, der für die Integration von Wachstumsfaktor-vermittelten mitogenen Signalen bedeutend ist (Malumbres and Pellicer 1998). Die subzelluläre Lokalisation von Cyclin D1 und seines Komplexes mit CDK4/6 ist zellzyklusabhängigen Schwankungen unterworfen. Während die Cyclin D1-Konzentration in der G1-Phase im Zellkern hoch ist, ist sie in den anderen Zellzyklusphasen im Zytoplasma hoch. Dabei spielt der Export von Cyclin D1 aus dem Zellkern eine zentrale Rolle. Dieser wird durch die Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) vermittelt, die wiederum durch den RAS/PI3K/AKT-Signalweg inhibiert wird (Diehl et al. 1998). Im Zytoplasma wird das eher instabile Cyclin D1 durch Skp-Cullin-F-box (SCF) Komplexe ubiquitiniert und konsekutiv durch das 26S Proteasom abgebaut. Dieser Abbau wird durch eine GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung von Cyclin D1 beschleunigt (Diehl et al. 1997). Folglich wird die Verfügbarkeit von Cyclin D1 durch ein Zusammenspiel von sowohl den mitogenen Signalwegen RAS/RAF/MAPK (Cyclin D1-Synthese) und RAS/PI3K/AKT (Cyclin D1-Stabilität), von der Bindung von Östrogen an ER α , als auch von der GSK3 β - und SCF-Aktivität (Cyclin D1-Abbau) reguliert. Desweiteren besteht die negative Regulierung von Cyclin D1 in der direkten und spezifischen Hemmung durch die CKIs der INK4-Familie. p16 bindet an CDK4 und CDK6 und verhindert dadurch deren Komplexbildung mit Cyclin D1 (Sherr and Roberts 1999).

1.10.4 Cyclin D1 und Karzinome

Unter den Zellzyklusregulatoren steht Cyclin D1 in einem starken Zusammenhang mit der Pathogenese von unterschiedlichen Tumoren. In verschiedenen malignen Tumoren der Brust (Fantl et al. 1993; Barnes and Gillett 1998), der Bauchspeicheldrüse (Gansauge et al. 1997) und der Harnblase (Hall and Peters 1996), in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Jin et al. 2001; Yamanouchi et al. 2001) und in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Izzo et al. 1998) konnten Amplifikationen in einer Region auf Chromosom 11q13, dem PRAD1- oder BCL1-Onkogen nachgewiesen werden.

1.10.5 Cyclin D1 und das Mammakarzinom

Eine Überexpression des Cyclin D1-Proteins wird in durchschnittlich 51% aller Mammakarzinome gefunden (Bartkova et al. 1994; Gillett et al. 1994; Zukerberg et al. 1995; Oyama et al.

1998; Steeg and Zhou 1998). Etwa 13%-20% aller Mammakarzinome weisen eine drei- bis mehr als zehnfache Amplifikation der DNA von 11q13.4 bis 11q13.5 auf (Schuurin 1995; Courjal et al. 1997). Eine Vielzahl von Studien konnte die Bedeutung von Cyclin D1 für die Pathogenese des Mammakarzinoms nachweisen. Eine Cyclin D1-Überexpression in transgenen Mäusen verursachte nach einer Latenzzeit Hyperplasien und Adenokarzinome der Mamma (Wang et al. 1994). Zellkulturexperimente zeigten, dass eine Induktion von Cyclin D1 zu einer Verkürzung der G1-Phase führt und die Zellproliferation fördert (Musgrove et al. 1994). Die Bedeutung von Cyclin D1 im Zellzyklus von Brustgewebe wurde durch Versuche mit Cyclin D1 defizienten Mäusen unterstrichen. Bei diesen Cyclin D1 knock-out Mäusen blieb die postpartale Brustdrüsenentwicklung aus (Fantl et al. 1995; Sicinski et al. 1995).

1.11 p27

1.11.1 Gen und Protein

p27 ist Teil der CIP/KIP Familie von CDK-Inhibitoren, zu der auch p21 und p57 gehören. p27 wurde als Mediator von proliferationshemmenden Zytokinen wie TGF- β und der Kontaktinhibition entdeckt, die das Zellwachstum hemmen (Polyak et al. 1994; Toyoshima and Hunter 1994). Das p27 Gen befindet sich auf Chromosom 12p13 (Ponce-Castaneda et al. 1995). Die kristalloide Proteinstruktur von p27 wurde 1996 von Russo et al. beschrieben. Es wurde eine inhibitorische Domäne bestehend aus einem 69-Aminosäuren-langen Carboxy-Ende identifiziert, die für die Bindung an den Cyclin A-CDK2-Komplex verantwortlich ist (Russo et al. 1996).

1.11.2 Funktion von p27

Durch Bindung an jeweils beide Einheiten verschiedener Cyclin-CDK-Komplexe reguliert p27 die Progression des Zellzyklus insbesondere am Übergang von der G1- zur S-Phase (Hunter and Pines 1994). Während p27 eine inhibierende Wirkung auf die Komplexe Cyclin E-CDK2 und Cyclin A-CDK2 ausübt, deuten weiterführende Erkenntnisse darauf hin, dass es Cyclin D-CDK-Komplexe in Abhängigkeit von seiner Konzentration positiv oder negativ regulieren kann (Sherr and Roberts 1999). In physiologischen Konzentrationen hat p27 eine aktivierende Wirkung auf Cyclin D-CDK-Komplexe. Sie entfaltet sich durch eine Erleichterung der Cyclin D-CDK-Komplexbildung, eine erhöhte nukleäre Lokalisation dieser Komplexe und die Stabilisierung von D-Cyclinen. Während die Bindung von p27 an Cyclin D-CDK-Komplexe in proliferierenden Zellen vorherrscht, dominieren in G1-arretierten Zellen Komplexe aus p27 und Cyclin E und CDK2. Folglich spielt die kompetitive Bindung von Cyclin D-CDK-Komplexen und Cyclin E-CDK2-Komplexen an p27 eine wichtige Rolle im Fortschreiten des Zellzyklus.

Im Rahmen seines inhibierenden Wirkmechanismus verhindert p27 durch Bindung an den jeweiligen Cyclin-CDK-Komplex die Phosphorylierung von CDK4 und CDK2 (Kato et al. 1994) und damit die Phosphorylierung von RB. Dies verhindert den Eintritt in die S-Phase und damit die Zellzyklusprogression.

Um ein Verweilen der Zelle in der G₀-Phase zu ermöglichen, werden hohe Konzentrationen von p27 benötigt (Sherr 1996). Somit ist eine Deutung seiner Funktion als potentieller Tumorsuppressor nicht überraschend (Nakayama et al. 1996). Zusätzlich werden ihm weitere Funktionen zugeschrieben, darunter die Regulation von nukleärem Import, Apoptose und Zellmotilität via Cyclin- und CDK-unabhängiger Effektorwege (Coqueret 2002). p27-knockout Mäuse entwickeln Hyperplasien in multiplen Organen und Hypophysentumoren, was eine Rolle als Proliferations- und Differenzierungsfaktor impliziert (Nakayama et al. 1996).

1.11.3 Regulation der p27 Expression

Die Regulation der p27 Expression findet zwar auch auf der Ebene der Transkription und Translation statt, die Verfügbarkeit von p27 wird jedoch während des gesamten Zellzyklus hauptsächlich durch Modulationen der Proteinstabilität und Alterationen der subzellulären Lokalisation bestimmt (Caldon et al. 2006). Während die p27 mRNA Konzentration im Verlauf des gesamten Zellzyklus konstant ist, ist die p27 Proteinkonzentration in G₀ am höchsten, nimmt in der G₁-Phase ab und ist in der S-Phase minimal (Hengst and Reed 1996). Der Abbau von p27 in der G₁- und S-Phase wird von zwei unterschiedlichen Komplexen vermittelt, die p27 ubiquitinieren und seinen proteasomalen Abbau einleiten (Hengst 2004). Der Erste ist der Kip ubiquitin-promoting complex (KPC), der in der G₁-Phase im Zytoplasma mit p27 interagiert. Der zweite Komplex hingegen wirkt während der S-Phase im Zellkern. Hier bewirkt eine Phosphorylierung von p27 am Threonin187 durch Cyclin E-CDK2 die Bindung einer SCF E3 Ubiquitin Ligase an p27 durch das F-box Protein Skp2 und den konsekutiven p27-Abbau (Hengst 2004). Die Phosphorylierung von p27 spielt auch bei der Regulation seiner subzellulären Lokalisation eine wichtige Rolle. Mitogene Stimuli induzieren die Phosphorylierung von p27 und fördern den nukleären Export (Boehm et al. 2002). Des Weiteren bewirkt eine Phosphorylierung die zytoplasmatische Retention von p27 (Liang and Slingerland 2003).

1.11.4 p27 und maligne Erkrankungen

In Tierversuchen zeigten p27 heterozygote Mäuse (p27^{+/-}) und homozygote Knockoutmäuse (p27^{-/-}) eine Prädisposition für Tumoren in verschiedenen Geweben (Fero et al. 1998). Obwohl genetische Alterationen von p27 in Neoplasien und Karzinomen des Menschen extrem

selten sind (Kawamata et al. 1995; Ponce-Castaneda et al. 1995), können reduzierte p27-Konzentrationen mit der Karzinogenese oder der Progression vieler maligner Tumoren in Verbindung gebracht werden. Während das p27-Protein in allen untersuchten normalen Epithelien wie Brust, Prostata, Eierstöcken, Haut, Schleimhaut von Mund, Speiseröhre, Magen, Darm und Lunge in hohen Konzentrationen exprimiert wird, gehen maligne Entartungen ebendieser Gewebe häufig mit dem Verlust von p27 einher (Slingerland and Pagano 2000). Verminderte p27-Konzentrationen wurden in bis zu 60% von Karzinomen des Menschen ermittelt. Zusätzlich wurde dem Verlust von p27 ein unabhängiges prognostisches Potential in unterschiedlichen Primärkarzinomen wie der Brust, der Lunge, des Darms, der Prostata oder des Ovars zugeschrieben (Slingerland and Pagano 2000; Viglietto et al. 2002; Schmider-Ross et al. 2006).

1.11.5 p27 und das Mammakarzinom

Aberrationen des p27 Gens sind im Mammakarzinom sehr selten (Spirin et al. 1996). Allerdings ist die Expression von p27 in maligne entartetem Brustdrüsengewebe im Vergleich zu normalem Brustdrüsengewebe erniedrigt (De Paola et al. 2002). An MCF-7 Mammakarzinom-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass eine hohe p27 Expression Wachstum und Tumorgenität unterdrückt (Sgambato et al. 1998). p27 scheint ein wichtiger Mediator des Tamoxifen-vermittelten Zellzyklusarrestes zu sein. Versuche an Mammakarzinomzellen zeigten den Verlust von p27 in Östrogen-stimulierten Zellen, wohingegen Tamoxifen zur Hochregulation von p27 führte. Interessanterweise führte eine Downregulation von p27 zu einer Aufhebung des Zellzyklusarrestes in mit Antiöstrogenen behandelten Zellen (Cariou et al. 2000).

1.12 ER β

1.12.1 Gen und Protein

Im Jahre 1996 wurde zusätzlich zu dem bekannten ER α ein zweiter Östrogenrezeptor ER β entdeckt (Kuiper et al. 1996). Während ER α auf Chromosom 6q25.1 lokalisiert ist, liegt der Genlocus von ER β auf Chromosom 14q22-24 (Enmark et al. 1997). Es handelt sich somit um unterschiedliche Genprodukte und nicht etwa um Spleißvarianten. Beide Östrogenrezeptoren bestehen aus acht Exons und haben sechs funktionale Domänen. Am aminoterminalen Ende befindet sich die A/B-Domäne, die die Transkriptionsaktivierungs Funktionsdomäne 1 (AF1) beinhaltet. Die zentrale Region C enthält die DNA Bindungsdomäne (DBD) und grenzt an die Region D, eine Art flexible Gelenkregion, die Konformationsänderungen des Rezeptormoleküls ermöglicht. Es schliesst sich die E/F-Domäne an, die die Ligand Bindungsdomäne (LBD) inklusive AF2 codiert und das Carboxylende von ER bildet. Mit jeweils 96% und 60% weisen die DBD und die LBD

die größten strukturellen Ähnlichkeiten auf (Lewis and Jordan 2005; Speirs and Walker 2007). ER α und ER β unterscheiden sich hauptsächlich in der Aktivität von AF1, die bei ER β zu vernachlässigen ist (Hall and McDonnell 1999). Überdies weisen ER α und ER β unterschiedliche Expressionsmuster auf. ER α wird vorwiegend in Brust, Uterus und Vagina exprimiert. Indessen wird ER β in Geweben wie dem zentralen Nervensystem, kardiovaskulärem System, Immunsystem, gastrointestinalem System, Nieren, Lungen, Knochen und Brust exprimiert (Kuiper et al. 1997).

Es wurden fünf spezifische Isoformen von ER β identifiziert, diese sind ER β 1 (Wildtyp), ER β 2 (identisch mit β cx), ER β 3, ER β 4 und ER β 5. Sie weichen allesamt in der LBD vom ursprünglich identifizierten ER β -Molekül ab (Moore et al. 1998). Über ihre biologische Rolle ist wenig bekannt.

1.12.2 Funktion von ER β

Die Funktion von ER β ist bis heute unklar. Versuche mit knockout (KO) Mäusen geben Hinweise für die Funktionen von ER α und ER β . α ERKO Mäuse entwickelten rudimentäre Brustdrüsen. β ERKO Mäuse prägten normale Brustdrüsen aus, die nach der Pubertät jedoch reduzierte Konzentrationen von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin, Connexin 32, Occludin und Integrin α 2 ohne histologisch nachweisbare zonae occludentes aufwiesen (Krege et al. 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ER α der vorherrschende Rezeptor zur Vermittlung der mitogenen Effekte von Östrogen ist, während ER β ausschlaggebend für den differenzierten Phänotyp ist. In Zelllinien rief 17 β -Estradiol (E₂) bei Vorhandensein von ER α Proliferation hervor, während es gemeinsam mit ER β proliferationshemmend wirkte (Strom et al. 2004). Diese duale Wirkung von E₂ wurde durch Versuche mit immortalisierten Zellen von laktierenden Brustdrüsen untermauert. Diese Zellen proliferieren nicht bei Expression beider ERs und Vorhandensein von E₂ (Faulds et al. 2004). Die Zugabe von selektiven ER α -Agonisten führt zu Proliferation, während selektive ER β -Agonisten Zellwachstum inhibieren. E₂ hingegen aktiviert beide ERs mit dem Resultat von ausbleibendem Wachstum (Helguero et al. 2005). Somit scheint eine wesentliche Funktion von ER β in der Modulation der proliferativen Effekte von ER α zu liegen. Folglich könnte ER β eine Bedeutung im Schutz der Zelle vor unkontrollierter Proliferation und maligner Transformation zukommen.

1.12.3 Regulation von ER β

Die genauen Regulationsmechanismen von ER β sind noch nicht bekannt, doch scheinen sich diese sowohl auf genetischer und epigenetischer als auch auf posttranskriptioneller Ebene abzuspielen. So gibt es Hinweise für den chromosomalen Verlust von 14q im Mammakarzinom, auf dem das ER β Gen lokalisiert ist (Burki et al. 2000; Loveday et al. 2000). Da solche Mutationen jedoch selten sind, hat der Mechanismus der DNA-Methylierung gesteigertes Interesse erlangt. Versuche an normalen Brustdrüsen- und Mammakarzinomzelllinien zeigten, dass eine Methylierung der ER β Promotorregion mit einem Expressionsverlust von ER β einherging, der durch die Behandlung mit DNA-Methyltransferaseinhibitoren wieder aufgehoben werden konnte (Skliris et al. 2003; Zhao et al. 2003). Durch Phosphorylierung wird zwar nicht die Expression von ER β beeinflusst, doch hat sie Auswirkungen auf die ER β Aktivität. Die Phosphorylierung von ER β an unterschiedlichen Stellen durch Kinasen kann sowohl seine transkriptionelle Aktivität als auch seine DNA-Bindungseigenschaften modifizieren (Weigel 1996). Zu Bedenken ist, dass die biologische Wirkung nicht nur ein Resultat aus der Konzentration und Aktivität des Hormons und seines Rezeptors ist, sondern dass ein komplexes System multipler Faktoren im Zusammenspiel das Ausmaß der transkriptionellen Aktivierung der Zielgene bestimmt. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem Coaktivatoren, Corepressoren und andere Transkriptionsfaktoren.

1.12.4 ER β und maligne Erkrankungen

ER β ist mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht worden. Ähnlich wie beim Mammakarzinom wurde an Prostatagewebe eine progressive Abnahme der ER β Expression vom normalen Gewebe bis zum Karzinom nachgewiesen (Horvath et al. 2001). β ERKO Mäuse entwickeln epitheliale Hyperplasien in der ventralen Prostata (Imamov et al. 2004). ER β ist somit ein möglicher Einflussfaktor in der Tumorgenese des Prostatakarzinoms. Auch in normaler Kolonschleimhaut wird ER β stark exprimiert, wohingegen es in Adenokarzinomen des Kolons parallel zum Differenzierungsverlust des Gewebes signifikant niedriger exprimiert wird (Konstantinopoulos et al. 2003). Auch in diesem Fall besteht die Möglichkeit eines tumorsuppressiven Einflusses von ER β .

1.12.5 ER β und Mammakarzinom

In normalem Brustgewebe ist ER β der dominante ER. Während ER α nur in den Zellkernen von luminalen Epithelzellen der Milchgänge und Drüsenläppchen nachweisbar ist, verfügt ER β über ein extensives Verteilungsmuster mit Expression in den Zellkernen von luminalen Epithelien,

myoepithelialen und endothelialen Zellen, in Fibroblasten und in Immuninfiltraten (Speirs et al. 2002). Einige Studien weisen darauf hin, dass die ER β Expression im Gegensatz zu ER α während der Tumorgenese abnimmt und somit eine potentielle tumorsuppressive Rolle innehat (Leygue et al. 1998; Roger et al. 2001; Skliris et al. 2003). In Zellen, die beide Östrogenrezeptortypen exprimieren, sind Heterodimere die dominante Spezies. In diesen fungiert ER β bei unterschätzten E₂-Konzentrationen als transdominanter Inhibitor von ER α . Bei gesättigten E₂-Konzentrationen interferiert ER β nicht mit ER α (Hall and McDonnell 1999; Pettersson et al. 2000).

Die Klärung der Rolle von ER β im Mammakarzinom wird durch die Entdeckung seiner Isoformen noch weiter kompliziert. Die ER β Spleißvariante ER β cx ist die am besten untersuchte Isoform. Strukturell ist sie weitgehend identisch mit dem ER β wildtyp, sie differiert jedoch von diesem im Exon 8 (Moore et al. 1998; Ogawa et al. 1998). Dadurch ist ER β cx unfähig zur Bindung von Liganden und zur Transkriptionsaktivierung von Östrogen-responsiven Genen. ER β cx heterodimerisiert bevorzugt mit ER α und übt einen dominant negativen Effekt auf dessen transkriptionelle Aktivität aus (Ogawa et al. 1998). Diese Funktion scheint sich nicht auf ER β cx zu beschränken: funktionelle Studien zeigten, dass die drei Isoformen ER β 1, ER β 2 und ER β 5 in der Lage sind die transkriptionelle Aktivität von ER α zu negieren (Peng et al. 2003). Eine Coexpression dieser Isoformen mit ER α könnte ein Mechanismus für Tamoxifenresistenz darstellen.

Während Tamoxifen über ER α antagonistische und agonistische Wirkungen entfaltet, bestehen Hinweise, dass es über ER β als reiner Antagonist fungiert (Barkhem et al. 1998; McDonnell 1998; Hall and McDonnell 1999).

1.13 Zielsetzung der Arbeit

Zellzyklusregulatoren haben eine entscheidende Rolle in der kontrollierten Balance aus Zellproliferationsförderung und –hemmung im gesunden Gewebe inne. Alterationen in der Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren können dieses Gleichgewicht stören und zu einer malignen Transformation der Zelle und möglicherweise zu einer Tamoxifenresistenz führen. Die Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und p27 sowie von ER β soll mittels der immunhistochemischen Färbung an 143 Fällen von archivierten, formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten Mammakarzinomen untersucht werden. Die genannten Marker sollen auf eine Assoziation mit klinischen und pathologischen Parametern untersucht werden. Des Weiteren ist zu eruieren, ob die Expression der untersuchten Proteine untereinander in einem Zusammenhang stehen.

Schließlich soll geprüft werden, ob die isolierte oder kombinierte Expression der genannten Marker einen prognostischen oder prädiktiven Wert in Bezug auf die Tamoxifentherapie hat.

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnen und klinische Daten

Das ursprünglich zusammengestellte Studienkollektiv umfasste 243 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom. Von diesen konnten 143 Mammakarzinompatientinnen in die vorliegende Studie aufgenommen werden, deren archiviertes Tumorgewebe verfügbar war. Diese Frauen wurden zwischen 1991 und 2004 in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Campus Virchow-Klinikum der Charité, Universitätsmedizin Berlin, operiert und anschließend in der ambulanten Tumornachsorge weiterbetreut. Einschlusskriterien waren die Hormonrezeptorpositivität des Tumors und die adjuvante antihormonelle Therapie mit Tamoxifen in der Standarddosis von 20 mg/d. Als hormonrezeptorpositiv galten alle Fälle, die eine Östrogenrezeptor- oder Progesteronrezeptorexpression von mindestens 10% aufwiesen. Patientinnen, die zunächst eine Chemotherapie mit folgender antihormoneller Therapie erhalten hatten, wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Das Alter der Patientinnen lag zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 47 und 87 Jahren. Der Median lag bei 63,00 das Durchschnittsalter bei 63,65 Jahren. 7 Patientinnen (5%) waren jünger als 50 Jahre, 41 Patientinnen (29%) waren im Alter zwischen 50 und 59 Jahren, 58 Patientinnen (40%) waren zwischen 60 und 69 Jahre alt und 37 Patientinnen (26%) waren älter als 69 Jahre. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren 8 (5,6%) Patientinnen prämenopausal und 135 (94,4%) Patientinnen postmenopausal. 87 Patientinnen (61%) wurden brusterhaltend operiert und 56 (39%) Patientinnen wurden operativ mit einer Mastektomie behandelt. Bei 136 Patientinnen (95%) wurde eine Lymphonodektomie durchgeführt, bei 7 Patientinnen (5%) nicht. In den besagten 7 Fällen wurde aufgrund des fortgeschrittenen Alters der Patientinnen, aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes und diverser Vorerkrankungen auf eine Lymphonodektomie verzichtet. Unter den Fällen, in denen eine Lymphonodektomie durchgeführt wurde, hatten 96 Patientinnen (70%) einen negativen Nodalstatus und bei 40 Patientinnen (30%) konnten Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Eine postoperative Radiatio erhielten 91 Patientinnen (64%). Bei 52 Patientinnen (36%) wurde darauf verzichtet. Von den 52 Patientinnen, bei denen keine Radiatio durchgeführt wurde, wurden 49 Patientinnen (94%) mastektomiert und 3 Patientinnen (6%) (pT1pN0, pT2pN0 und pT1pNx) brusterhaltend operiert.

Entsprechend den Empfehlungen der Konferenzen in Philadelphia 2002 (Schwartz et al. 2002) und St. Gallen 2003 (Goldhirsch et al. 2003) erhielten 15 (36%) von den 42 Patientinnen, die ab dem Jahre 2002 operiert wurden, eine Sentinel-Lymphknotenbiopsie. Alle Patientinnen wurden nach den Richtlinien der WHO im Sinne der TNM-Klassifikation eingeteilt. 86 Patientinnen (60%) waren im Stadium pT1, 51 (36%) im Stadium pT2, 4 (3%) im Stadium pT3 und 2 (1%) Patientinnen im Stadium pT4. 96 Patientinnen (67%) waren im Stadium pN0, 36 (25%) im Stadium pN1, 4 (3%) im Stadium pN2 und in 7 Fällen (5%) wurde keine Lymphonodektomie durchgeführt. In allen 143 Fällen (100%) konnten zum Zeitpunkt der Diagnose keine Fernmetastasen festgestellt werden (M0). In 41 Fällen (29%) lagen gut differenzierte (G1) Tumore, in 84 Fällen (59%) mittelgradig differenzierte (G2) und in 18 Fällen (12%) schlecht differenzierte (G3) Tumore vor. Als ER- bzw. PR-positiv gelten Mammakarzinome mit einer ER- bzw. PR-Expression von mindestens 10%. 140 von 143 Mammakarzinomen (98%) waren per definitionem ER α -positiv und 3 von 143 Fällen (2%) hatten einen negativen ER α -Status. 133 von 143 Patientinnen (93%) wiesen einen positiven PR-Status des Tumorgewebes auf, die übrigen 10 Fälle waren PR-negativ.

Alle Patientinnen erhielten eine adjuvante endokrine Therapie. 63 Patientinnen (44%) nahmen Tamoxifen über einen Zeitraum von mindestens 5 Jahren ein, 75 (53%) hatten Tamoxifen zum Zeitpunkt des letzten Kontaktes weniger als 5 Jahre eingenommen, 4 Patientinnen (3%) hatten im Rahmen der randomisierten, doppelblinden Tamoxifen-Exemestan-Studie nach zweijähriger Tamoxifeneinnahme ein Studienmedikament erhalten, dessen Zuordnung unbekannt ist. 61 Patientinnen (43%) setzten Tamoxifen nach der empfohlenen Einnahmedauer von 5 Jahren ab, in 12 Fällen (8%) wurde Tamoxifen nach der Diagnose eines Progresses der Mammakarzinomkrankung abgesetzt, in 25 Fällen (18%) wurde Tamoxifen aufgrund von Nebenwirkungen beendet, bei 2 Patientinnen (1%) wurde ein Endometriumkarzinom unter Tamoxifen diagnostiziert und Tamoxifen daraufhin abgesetzt, in 5 Fällen (3,5%) wurde im Sinne einer sequentiellen adjuvanten Therapie vor Ablauf der fünfjährigen Tamoxifeneinnahme auf einen Aromatasehemmer umgestellt, 2 Patientinnen (1%) nahmen Tamoxifen bis zu ihrem Tode, 4 Patientinnen (3%) nahmen Tamoxifen im Rahmen der randomisierten, doppelblinden Tamoxifen-Exemestan-Studie über einen unbekanntem Zeitraum, in 5 Fällen (3,5%) wurde Tamoxifen aus unbekanntem Grund frühzeitig abgesetzt und 27 Patientinnen (19%) nahmen zum Zeitpunkt des letzten Kontaktes Tamoxifen weiterhin ein (Abbildung 1). Eine der beiden Patientinnen, die unter Tamoxifen ein Endometriumkarzinom erlitten, entwickelte Metastasen und verstarb 3,5 Jahre nach der

Diagnose des Endometriumkarzinoms an dessen Folgen. Bei einer weiteren Patientin endete das Follow-up nach Diagnose des Endometriumkarzinoms.

Die Daten zum klinischen Verlauf wurden aus den Akten der ambulanten Tumornachsorge-sprechstunde der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Campus Virchow-Klinikum der Charité entnommen. Falls dies nicht möglich war, erhielten wir die erforderlichen Informationen über die/den betreuende/n Fach- oder Hausärztin/arzt. Informationen zum Todeszeitpunkt wurden außerdem vom Einwohnermeldeamt eingeholt. Der klinische Verlauf umfasste einen Zeitraum von 6-195 Monaten. Der Median des Beobachtungszeitraumes betrug 87 Monate. 110 Patientinnen (86%) lebten beim letzten Kontakt zwischen August und Dezember 2007. Verstorben waren 20 Frauen (14%). Davon starben 7 Frauen (35%) am Progress der Mammakarzinom-erkrankung, 7 (35%) aufgrund einer anderen Erkrankung und in 6 Fällen (30%) konnte die Todesursache nicht ermittelt werden. 13 Fälle (10%) waren nicht mehr im Follow-up. Beim letzten Kontakt gab es in 124 Fällen (87%) keine Anzeichen für ein Rezidiv. 19 Patientinnen (13%) hatten zu diesem Zeitpunkt ein Rezidiv erlitten. Von den Patientinnen mit Rezidiven ereigneten sich diese in 12 Fällen (63%) unter Tamoxifen, in 4 Fällen (21%) nach frühzeitigem Abbruch der Tamoxifentherapie und in 3 Fällen (16%) nach regulärem Absetzen des Tamoxifens, d.h. nach der empfohlenen Einnahmedauer von 5 Jahren.

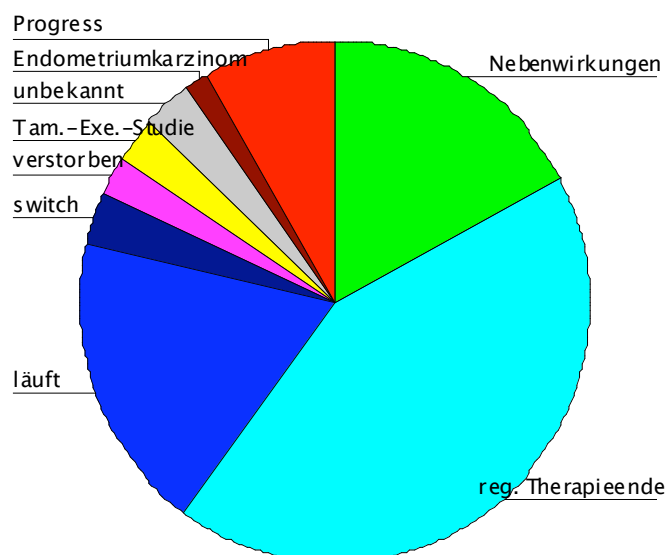


Abbildung 1: Verteilung der Ursachen für das Absetzen von Tamoxifen und der noch laufenden Einnahme

2.2 Tumorgewebe

Das Tumorgewebe stammte von den oben beschriebenen 143 Patientinnen. Die immunhistochemische Färbung wurde an archiviertem, formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt.

2.3 Konventionelle histologische Diagnostik

Um zu prüfen, ob Tumorgewebe in dem untersuchten Gewebe vorhanden war, wurden die histologischen Schnitte des Pathologischen Instituts der Charité verwendet.

2.4 Erstellung der tissue micro arrays (TMA)

Repräsentative Tumorareale wurden auf dem jeweiligen Schnitt markiert und das analoge Areal des dazugehörigen Paraffinblockes mithilfe eines manuellen tissue microarrayers (Model MTA 1725, Beecher) ausgestanzt und in einem neuen Paraffinblock in Form von tissue micro arrays (TMA) angeordnet.

2.5 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe der sogenannten markierten Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) durchgeführt. Diese Methode beinhaltet die Inkubation des zu untersuchenden Gewebes mit dem Primärantikörper, auf die die Auftragung eines biotinylierten Brückenantikörpers folgt. An diesen bindet im nächsten Reaktionsschritt enzymmarkiertes Streptavidin, welches aufgrund seiner inhärenten starken Affinität für Biotin eine hohe Sensitivität dieser Methode ermöglicht. Bei besagtem Enzym handelt es sich um die Meerrettichperoxidase. Die LSAB-Methode hat im Vergleich zur Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) eine etwa vier- bis achtmal höhere Sensitivität (Giorno 1984).

2.5.1 Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1

Die Technik der Immunhistochemie (IHC) hat sich für die Quantifizierung der Cyclin D1-Proteinexpression als ein probates Mittel herausgestellt. Die IHC ist eine sichere Methode zur Identifikation von Cyclin D1 überexprimierenden Tumorzellen, wobei die Färbintensität mit der DNA-Amplifikation korreliert (Michalides et al. 1996). Zusätzlich kann sie eine Cyclin D1-Proteinüberexpression auch an solchen Tumoren nachweisen, bei denen keine CCND1-Genamplifikation besteht. Die IHC ermöglicht die Untersuchung der Proteinüberexpression an archiviertem Tumorgewebe und an großen Fallzahlen (Bartkova et al. 1994; Gillett et al. 1994; Bartkova et al. 1995). Der monoklonale Antikörper (mAk) gegen Cyclin D1 (Klon DCS-6) bin-

det spezifisch an Cyclin D1 und nicht an seine Verwandten Cyclin D2 und D3 (Lukas et al. 1994). Der monoklonale Antikörper DCS-6 erwies sich in der Untersuchung der Cyclin D1 Expression als den polyklonalen Antikörpern gegen Cyclin D1 überlegen (Gillett et al. 1994). Verschiedene Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Vorbehandlungen gewählt, um die Antigenität des Cyclin D1 Proteins zu optimieren (Antigen-Demaskierung). Die histologischen Schnitte wurden mit Proteasen behandelt (Gillett et al. 1994), in EDTA-Puffer pH 8,0 im Schnellkochtopf gekocht (Chan et al. 1999) oder in Citratpuffer pH 6,0 in der Mikrowelle erhitzt (Umekita and Yoshida 2000).

2.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1 an Paraffingewebe in Form von tissue micro arrays

Von den tissue micro array Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms (Biocut 2035 von Reichert, Jung) 2-3µm dicke Schnitte angefertigt. Jeweils ein Schnitt wurde auf einen mit Aminosylane (Sigma) beschichteten Objektträger (Menzel) aufgetragen. Im Brutschrank (Mammert) wurden die Schnitte anschließend für 24 Stunden bei 60°C inkubiert.

Um die Schnitte zu entparaffinieren wurden sie zweimal für 5 Minuten in Xylol und je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%) belassen. Es folgte die Rehydrierung in aqua dest. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte 2,5 Minuten lang im Dampfkochtopf bei vollem Druck in EDTA-Puffer (pH 8,0) gekocht (Chan et al. 1999). Danach erfolgte ein kurzes Abschrecken der Schnitte in aqua dest. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 10 Minuten in 3%iges H₂O₂ gesetzt und im Anschluß in aqua dest. und Tris-Puffer (pH 7,4) gespült. Um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden, wurden die nächsten Schritte in einer feuchten Kammer (Lipshaw) durchgeführt. Vor dem Auftragen der Reagenzien wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen, SCI science services) umfahren. Dies verhinderte das Abfließen der verschiedenen Reagenzien von der jeweiligen Probe. Die Schnitte wurden mit einem serumfreien Proteinblock (DAKO) vorbehandelt, der die Expression von unspezifischen Proteinen vermindert. Anschließend wurde der monoklonale Primärantikörper von der Maus gegen Cyclin D1 (Klon: DCS-6) (DAKO) aufgetragen. Dieser wurde zuvor mit einem Verdünnungsmedium mit hintergrundreduzierenden Eigenschaften im Verhältnis 1:800 verdünnt. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 60 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Maus-Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse (IgG2a) mit nicht relevanter Antigenität (DAKO) in der gleichen Konzentration wie der Primärantikörper. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in Tris-Puffer gespült. Anschließend wurde für 15 Minuten der LSAB-Kit 1 (DAKO) auf die Proben gegeben, welcher

biotinylierte Brückenantikörper enthält. Nach erneutem Spülen in Tris-Puffer erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit dem LSAB-Kit 2 (DAKO). Dieser enthielt Streptavidin, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Die Schnitte wurden abermals dreimal für 5 Minuten in Tris-Puffer gespült.

Zur Anfärbung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde für 30 Minuten das Chromogen-Diaminobenzidin (DAKO) (10ml Tris-Puffer + 1 Tablette DAB + 15µl H₂O₂) aufgetragen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer. Zunächst wurden die Schnitte in aqua dest. gespült und anschließend für 60 Sekunden in Hämalaun-Lösung belassen. Es folgte die Spülung unter fließendem Leitungswasser, die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) für jeweils 5 Minuten und schließlich die dreimalige Spülung in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte aus dem Xylol mit Histokit (Vogel) eingedeckt.

2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von p27

Die IHC ist eine bewährte Methode, um den p27-Proteingehalt in Zellen nachzuweisen. Westernblot und IHC Ergebnisse sind vergleichbar. Die parallele Bestimmung von p27 an denselben Mammakarzinomproben mittels Westernblot und IHC resultierte in einer guten Korrelation der Ergebnisse dieser beiden Methoden. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass der immunhistochemisch nachgewiesene p27 Verlust ein Ausdruck echter Proteinexpressionsabnahme und nicht etwa das Resultat von Proteinkonformationsänderungen oder Epitopmaskierung ist (Catzavelos et al. 1997).

2.5.4 Immunhistochemischer Nachweis von p27 an Paraffingewebe in Form von tissue micro arrays

Von den tissue micro array Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms (Biocut 2035 von Reichert, Jung) 2-3µm dicke Schnitte angefertigt. Jeweils ein Schnitt wurde auf einen mit Aminosylane (Sigma) beschichteten Objektträger (Menzel) aufgetragen. Im Brutschrank (Mammert) wurden die Schnitte anschließend für 24 Stunden bei 60°C inkubiert.

Um die Schnitte zu entparaffinieren wurden sie zweimal für 5 Minuten in Xylol und je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%) belassen. Es folgte die Rehydrierung in aqua dest. Die Schnitte wurden 2 Minuten im Dampfkochtopf auf Stufe 1 in Citrat-Puffer (pH 6) gekocht. Danach erfolgte ein kurzes Abschrecken der Schnitte in aqua dest. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 10 Minuten in 3%iges H₂O₂ gesetzt und im Anschluß in aqua dest. und Tris-Puffer (pH 7,4) gespült. Um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden, wurden die nächsten Schritte in einer feuchten Kammer (Lipshaw)

durchgeführt. Vor dem Auftragen der Reagenzien wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen, SCI science services) umfahren. Dies verhinderte das Abfließen der verschiedenen Reagenzien von der jeweiligen Probe. Die Schnitte wurden mit einem serumfreien Proteinblock (DAKO) vorbehandelt, der die Expression von unspezifischen Proteinen vermindert. Anschließend wurde der monoklonale Primärantikörper von der Maus gegen p27/KIP1 (Klon 57, 250µg/ml, IgG1, BD Transduction Laboratories) aufgetragen. Dieser wurde zuvor mit einem Verdünnungsmedium mit hintergrundreduzierenden Eigenschaften im Verhältnis 1:400 verdünnt. Bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 60 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Maus-Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse (IgG2a) mit nicht relevanter Antigenität (DAKO) in der gleichen Konzentration wie der Primärantikörper. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in Tris-Puffer gespült. Anschließend wurde für 15 Minuten der LSAB-Kit 1 (DAKO) auf die Proben gegeben, welcher biotinylierte Brückenantikörper enthielt. Nach erneutem Spülen in Tris-Puffer erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit dem LSAB-Kit 2 (DAKO). Dieser enthielt Streptavidin, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Die Schnitte wurden abermals dreimal für 5 Minuten in Tris-Puffer gespült. Zur Anfärbung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde für 30 Minuten das Chromogen-Diaminobenzidin (DAKO) (10ml Tris-Puffer + 1 Tablette DAB + 15µl H₂O₂) aufgetragen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer. Zunächst wurden die Schnitte in aqua dest. gespült und anschließend für 60 Sekunden in Hämalaun-Lösung belassen. Es folgte die Spülung unter fließendem Leitungswasser, die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) für jeweils 5 Minuten und schließlich die dreimalige Spülung in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte aus dem Xylol mit Histokit (Vogel) eingedeckt.

2.5.5 Immunhistochemischer Nachweis von ERβ

Die Immunhistochemie hat sich als eine geeignete Methode zum Nachweis von ERβ in archiviertem, formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Mammakarzinomgewebe herausgestellt (Skloris et al. 2001). Ihr großer Vorteil liegt darin, dass sie eine Bestimmung der ERβ Proteinexpression in Mammakarzinomzellen erlaubt, die unabhängig von der ERβ Expression in anderen Zelltypen ist. Im Gegensatz zu ERα besteht allerdings noch kein allgemein anerkannter Konsens bezüglich eines standardisierten Versuchsprotokolls und Bewertungssystems (Carder et al. 2005).

2.5.6 Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptor β (ER β) an Paraffingewebe in Form von tissue micro arrays

Von den tissue micro array Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms (Biocut 2035 von Reichert, Jung) 2-3 μ m dicke Schnitte angefertigt. Jeweils ein Schnitt wurde auf einen mit Aminosylane (Sigma) beschichteten Objektträger (Menzel) aufgetragen. Im Brutschrank (Mammert) wurden die Schnitte anschließend für 24 Stunden bei 60°C inkubiert.

Um die Schnitte zu entparaffinieren wurden sie zweimal für 5 Minuten in Xylol und je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%) belassen. Es folgte die Rehydrierung in aqua dest. Die Schnitte wurden 5 Minuten im Dampfkochtopf auf Stufe 2 in Citrat-Puffer (pH 6) gekocht. Danach erfolgte ein kurzes Abschrecken der Schnitte in aqua dest. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 10 Minuten in 3%iges H₂O₂ gesetzt und im Anschluß in aqua dest. und Tris-Puffer (pH 7,4) gespült. Um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden, wurden die nächsten Schritte in einer feuchten Kammer (Lipshaw) durchgeführt. Vor dem Auftragen der Reagenzien wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen, SCI science services) umfahren. Dies verhinderte das Abfließen der verschiedenen Reagenzien von der jeweiligen Probe. Die Schnitte wurden mit einem serumfreien Proteinblock (DAKO) vorbehandelt, der die Expression von unspezifischen Proteinen vermindert. Anschließend wurde der monoklonale Primärantikörper von der Maus gegen Östrogenrezeptor β (anti-Estrogen Receptor beta, ab288, monoclonal mouse, IgG2b, 1.00 mg/ml, Abcam) aufgetragen. Dieser wurde zuvor mit einem Verdünnungsmedium mit hintergrundreduzierenden Eigenschaften im Verhältnis 1:200 verdünnt. Die Schnitte wurden bei einer Temperatur von 4°C über 10,5 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Maus-Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse (IgG2a) mit nicht relevanter Antigenität (DAKO) in der gleichen Konzentration wie der Primärantikörper.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in Tris-Puffer gespült. Anschließend wurde für 15 Minuten der LSAB-Kit 1 (DAKO) auf die Proben gegeben, welcher biotinylierte Brückenantikörper enthielt. Nach erneutem Spülen in Tris-Puffer erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit dem LSAB-Kit 2 (DAKO). Dieser enthielt Streptavidin, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Die Schnitte wurden abermals dreimal für 5 Minuten in Tris-Puffer gespült.

Zur Anfärbung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde für 30 Minuten das Chromogen-Diaminobenzidin (DAKO) (10ml Tris-Puffer + 1 Tablette DAB + 15 μ l H₂O₂) aufgetragen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer. Zunächst wurden die Schnitte in aqua

dest. gespült und anschließend für 60 Sekunden in Hämalun-Lösung belassen. Es folgte die Spülung unter fließendem Leitungswasser, die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 100%) für jeweils 5 Minuten und schließlich die dreimalige Spülung in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte aus dem Xylol mit Histokit (Vogel) eingedeckt.

2.6 Mikroskopische Auswertung

Die gefärbten Paraffinschnitte wurden mit einem Mikroskop der Firma Leitz, Typ Dialux 22, von zwei Personen (Dr. Schmider-Ross und Sandra Itzel) unabhängig voneinander ohne Kenntnis der klinischen Daten beurteilt. Dabei wurde bezüglich des ER β unter Auszählung von 200 Zellkernen der prozentuale Anteil positiver Zellkerne mithilfe der 20er- und 40er-Vergrößerung bestimmt und folgendermaßen eingeteilt: 0=keine positiven Zellkerne, 1=weniger als 10% positiver Zellkerne, 2=10-50% positiver Zellkerne, 3=51-80% positiver Zellkerne und 4=mehr als 80% positiver Zellkerne. Zudem wurde die Färbeintensität bestimmt und in eine von vier möglichen Kategorien eingeteilt: 1=negativ, 2=schwach positiv, 3=mäßig positiv, 4=stark positiv. Dies erlaubte die Beschreibung der Expression von ER β als rein prozentualen Anteil positiver Zellkerne, als Färbeintensität und als Immunreaktiver Score (IRS). Der IRS entspricht dem Produkt aus Färbeintensität und Anteil positiver Zellkerne nach oben genannter Aufteilung. Für die Auswertung der p27- und Cyclin D1-Färbungen wurde der sogenannte Histochemische Score (HScore) verwendet (McCarty et al. 1985). Dabei wurde unter Auszählung von jeweils 200 Zellkernen der prozentuale Anteil positiver Zellkerne mithilfe der 20er- und 40er-Vergrößerung bestimmt und die Färbeintensität in eine von vier möglichen Kategorien eingeteilt: negativ, schwach positiv, mäßig positiv, stark positiv. Dabei wurde unter Betrachtung des gesamten tissue micro arrays mithilfe der 10er- und 20er-Vergrößerung des Mikroskops der jeweilige prozentuale Anteil der vier möglichen Färbeintensitäten (negativ, schwach, mäßig, stark) ermittelt. Der HScore ergibt sich schließlich als Summe der Produkte aus Färbeintensität und jeweiligem prozentualen Anteil. Somit liegen die Werte des HScores in einer Spannbreite von 0-300. Dies erlaubte die Beschreibung der Expression von Cyclin D1 und p27 als prozentualen Anteil positiver Zellen, als dominierende Färbeintensität und als HScore. Diese Vorgehensweise sollte eine größtmögliche Flexibilität angesichts uneinheitlicher Auswertungsmethoden in der aktuellen Literatur gewährleisten. Als Positivkontrollen dienten ein jeweils als ER β -, p27- und Cyclin D1-positives bekanntes Gewebe. Für die hier untersuchten Marker liegen keine einheitlichen, anerkannten Grenzwerte zur Definition einer Überexpression vor. In der vorliegenden Studie wurde der Median angefärbter Zellkerne als Orientierungspunkt für die Bestimmung der Grenzwerte verwendet. Dieses Vorgehen wurde ebenfalls in einer der umfangreichsten Studien zur Expression von Cyclin D1 im

Mammakarzinom gewählt (Rudas et al. 2008). In der vorliegenden Studie wurden folgende Grenzwerte zur Beschreibung einer Expression bzw. Überexpression gewählt: jegliche Kernfärbung für Cyclin D1, >10% positiver Zellkerne für p27 und ein IRS>9 für ERβ.

2.7 Verwendete Reagenzien und Lösungen

Puffer

Tris-Puffer:

- 33,0g Tris-Hcl (Sigma)
- 4,5g Tris Base (Sigma)
- 43,9g Natriumchlorid (Merck)
- auf 5l aqua dest., (pH 7,4-7,7)

Citrat-Puffer:

- 10,5g Citronensäure (Merck)
- auf 5l aqua dest.
- mit 2 molarer Natronlauge (Merck) bis pH 6,0 titrieren

EDTA-Puffer:

- 1,86g EDTA (Sigma) auf 5l aqua dest.
- mit 2 molarer Natronlauge (Merck) bis pH 8,0 titrieren

Weitere Reagenzien:

- Xylol (Merck)
- 100% Ethanol (Herbeta Arzneimittel)
- H₂O₂ (Merck)
- Methanol (Merck)
- Fettstift, PAP-Pen (Daido Sangyo Co)
- Serumfreier Proteinblock (Dako)
- Mäuse IgG1, Negativkontrolle (DAKO)
- Antikörperverdünnungsmittel mit hintergrundreduzierenden Eigenschaften (DAKO)

- LSAB 2-Kit, HRP (DAKO)
- DAB-Chromogen (DAKO)
- Hämalun nach Mayer (Holborn)

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 11 und 16 durchgeführt. Das Gesamtüberleben (GÜ) in Monaten ist der Zeitraum vom Datum der Erstdiagnose bis zum Tod oder des letzten Kontaktes. Das rezidivfreie Überleben (RFÜ) in Monaten ist die Zeit von der Diagnosestellung bis zum dokumentierten Eintreten eines Rezidivs des Mammakarzinoms. Die Daten wurden entsprechend ihrer Skalierung mittels Häufigkeiten, Mittelwerten und Medianen bestimmt. Die Überlebensdaten wurden nach Kaplan-Meier berechnet und mit dem Log-rank-Test überprüft. Eine multivariate Analyse mittels Cox-Regression oder logistischer Regression ist zu diesem Zeitpunkt aufgrund der kurzen Beobachtungszeit und der sporadischen Ereignisse statistisch nicht möglich. Die Überlebensdaten wurden zum einen in Bezug auf das Gesamtkollektiv erhoben, zum anderen wurde eine Überlebensanalyse für die Subgruppe der Patientinnen durchgeführt, die Tamoxifen mindestens 5 Jahre eingenommen hatten oder unter der Tamoxifentherapie einen Progress der Mammakarzinomerkkrankung erlitten hatten. Diese Subgruppe wurde als Subgruppe der regulären Tamoxifeneinnahme bezeichnet. Der Zusammenhang zwischen zwei kategorialen Merkmalen wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests analysiert. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Alle Ergebnisse sind exploratorisch zu betrachten.

3 Ergebnisse

In Tabelle 3 ist der Zusammenhang zwischen den klinischen und pathologischen Parametern und dem Gesamtüberleben und dem rezidivfreien Überleben dargestellt.

Tabelle 3: Klinische und tumorbiologische Daten, Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben

	Gesamtüberleben				rezidivfreies Überleben			
	n	5-JÜR	95%-KI	P-Wert	n	5-JÜR	95%-KI	P-Wert
Alter bei Diagnosestellung	143			0,1950	143			0,2747
<50	7	100			7	100		
50-59	41	94	0,868-1,020		41	85	0,731-0,963	
60-69	58	98	0,937-1,020		58	96	0,901-1,017	
≥70	37	91	0,813-1,009		37	88	0,762-0,994	
Histologischer Subtyp	123			0,3953	123			0,5465
duktal	107	96	0,917-1,000		107	89	0,822-0,952	
lobulär	16	100			16	93	0,791-1,066	
Differenzierungsgrad	143			0,0149	143			0,0491
1 (gut differenziert)	41	100			41	100		
2 (mäßig differenziert)	84	95	0,894-0,998		84	91	0,847-0,975	
3 (schlecht differenziert)	18	89	0,741-1,037		18	72	0,510-0,934	
Tumorgröße	141			<0,0001	141			<0,0001
pT1	86	96	0,907-1,006		86	92	0,889-0,984	
pT2	51	98	0,939-1,020		51	89	0,799-0,984	
pT3	4	50	0,000-1,000		4	50	0,000-1,000	
Lymphknotenstatus	136			0,0039	136			0,0091
pN0	96	96	0,918-1,006		96	96	0,918-0,998	
pN1/pN2	40	92	0,829-1,009		40	78	0,646-0,918	
ERα-Fraktion	142			0,2801	142			0,1358
0%-80%	73	94	0,879-0,999		73	88	0,795-0,960	
>80%	69	96	0,914-1,015		69	92	0,850-0,989	
PR-Fraktion	141			0,0012	141			0,0440
0%-50%	44	84	0,719-0,962		44	83	0,712-0,948	
>50%	97	100			97	93	0,871-0,985	
Her2-Status	85			0,5016	85			0,0110
0 bis 2+	77	96	0,907-1,006		77	96	0,905-1,007	
3+	8	86	0,593-1,122		8	60	0,237-0,963	
Ki 67-Fraktion	108			0,2513	108			0,0044
≤20%	82	97	0,936-1,011		82	95	0,897-0,999	
>20%	26	96	0,886-1,037		26	73	0,557-0,905	
Cyclin D1-Status	141			0,6251	141			0,1557
negativ	93	96	0,923-1,005		93	92	0,862-0,985	
positiv	48	93	0,855-1,008		48	85	0,744-0,954	
Cyclin D1-Färbeintensität	140			0,0211	140			<0,0001
negativ	93	96	0,923-1,005		93	92	0,862-0,985	
schwach	40	98	0,926-1,024		40	92	0,839-1,008	
mäßig	7	69	0,313-1,058		7	43	0,055-0,803	
p27-Fraktion	142			0,3177	142			0,9018
0-10%	73	97	0,929-1,012		73	90	0,834-0,980	
>10%	69	93	0,862-0,998		69	89	0,807-0,968	
p27-Färbeintensität	142			0,4304	142			0,9683
negativ	44	95	0,886-1,018		44	87	0,761-0,981	
schwach	70	95	0,886-1,007		70	89	0,812-0,969	
mäßig	20	95	0,845-1,050		20	95	0,853-1,047	
stark	8	100			8	100		
ERβ-IRS	142			0,4203	142			0,1648
0	0				0			
1-4	25	92	0,808-1,029		25	83	0,670-0,986	
5-8	82	96	0,912-1,006		82	90	0,831-0,973	
9-12	35	96	0,886-1,037		35	94	0,850-1,024	
ERβ-IRS	142			0,1722	142			0,0582
0-9	111	94	0,888-0,988		111	88	0,813-0,946	
12	31	100			31	96	0,882-1,038	

n: Fälle, die bei der Überlebensberechnung miteinbezogen wurden; 5-JÜR: 5-Jahresüberlebensrate in Prozent; 95%-Ki: 95%-Konfidenzintervall; IRS: Immunreaktiver Score; ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor
Anmerkung: signifikante p-Werte rot

3.1 Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung

Die Altersverteilung des Patientinnenkollektivs zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ist Abbildung 2 zu entnehmen. Eine Korrelation des Alters mit klinischen oder pathologischen Daten konnte nicht festgestellt werden. In Bezug auf das Gesamtüberleben und rezidivfreie Überleben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Altersgruppen.

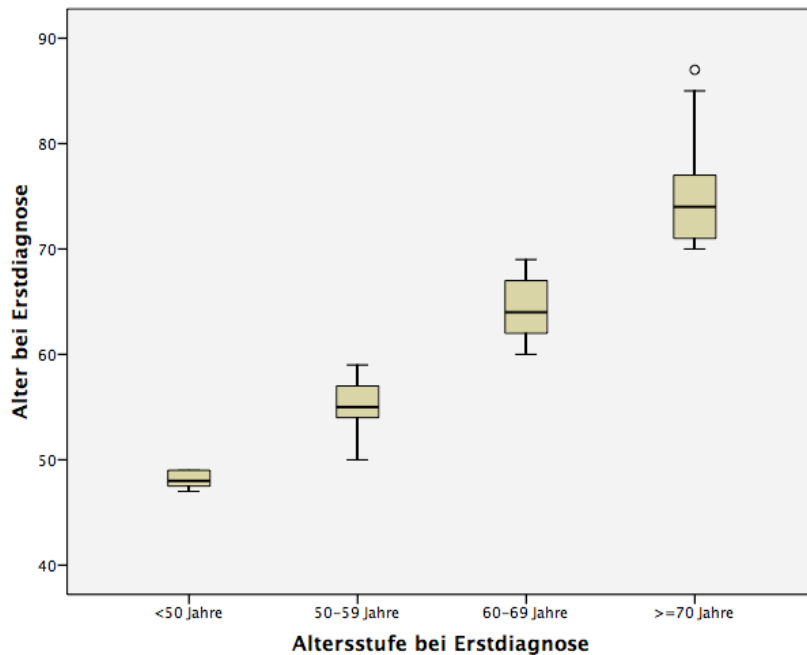


Abbildung 2: Boxplot-Darstellung der vier Altersgruppen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

3.2 Histologie

Die Anteile der histologischen Untergruppen des Patientinnenkollektivs sind in Abbildung 3 dargestellt.

Zur Analyse des Verhältnisses zu anderen klinischen und pathologischen Parametern sowie dem Überleben wurden ausschließlich die duktaalen und lobulären Mammakarzinome betrachtet. Eine Einbeziehung aller Subgruppen war aufgrund geringer Fallzahlen der anderen histologischen Typen nicht möglich. Die beiden Untergruppen der duktaalen und lobulären Mammakarzinome unterschieden sich nicht signifikant in Bezug auf das GÜ oder RFÜ (siehe Tabelle 3), noch war ein Zusammenhang zu anderen klinischen und pathologischen Daten erkennbar.

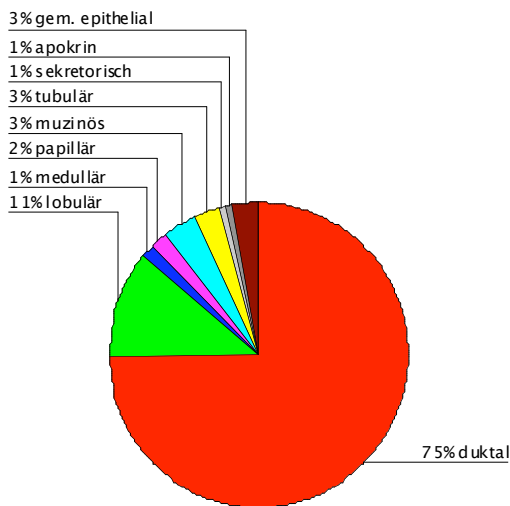


Abbildung 3: Histologische Subklassifikation des Patientinnenkollektivs

3.3 Differenzierungsgrad (G)

Von den 143 Mammakarzinomen waren 41 (28%) gut differenziert (GI), 84 (59%) mäßig differenziert (GII) und 18 (13%) schlecht differenziert (GIII) (siehe Abbildung 4).

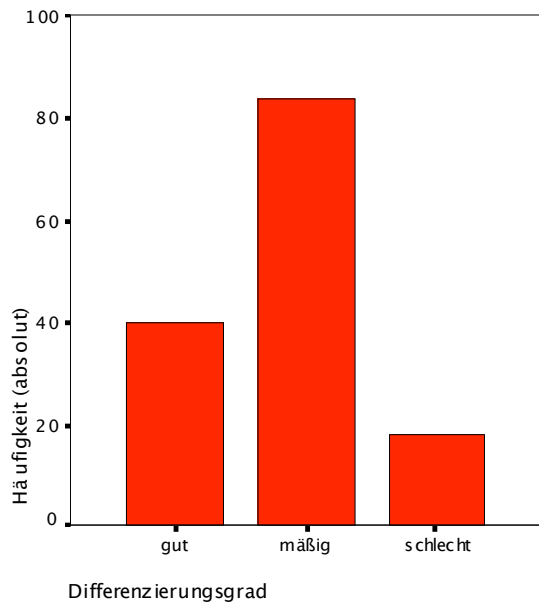


Abbildung 4: absolute Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Differenzierungsgrade des Patientinnenkollektivs

Je schlechter differenziert der Tumor war, desto häufiger war er mit einem hohen pathologischen Tumorstadium ($p=0,023$) oder einem Lymphknotenbefall ($p=0,009$) assoziiert. Auch gingen schlechtere Differenzierungsgrade mit niedrigeren Östrogenrezeptor- (Grenzwert: 50%) ($p=0,005$) und Progesteronrezeptoranteilen (Grenzwert: 80%) ($p=0,020$), sowie erhöhten Wachs-

tumsfraktionen (Grenzwert: 20%) ($p < 0,0001$) einher. In der univariaten Analyse stellte sich ein guter Differenzierungsgrad als günstiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben (GÜ) (Abbildung 5) dar. In Bezug auf das rezidivfreie Überleben war der Einfluss des Differenzierungsgrades nur knapp signifikant (Abbildung 6) (Tabelle 3).

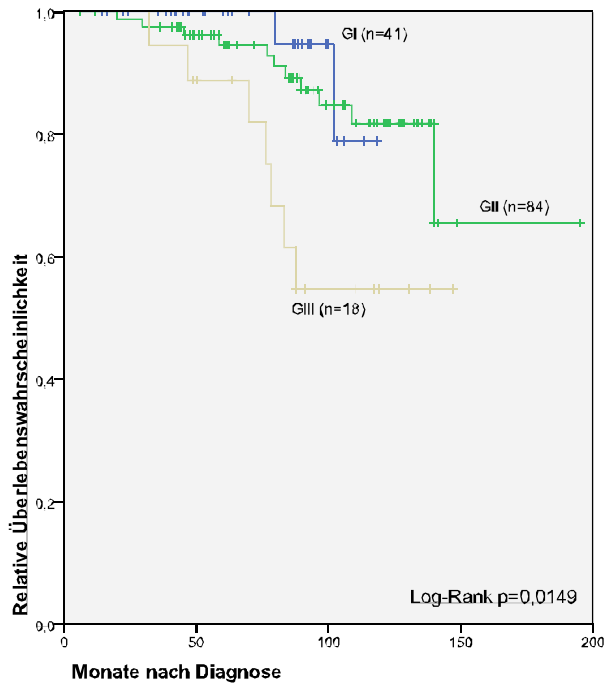


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (G)

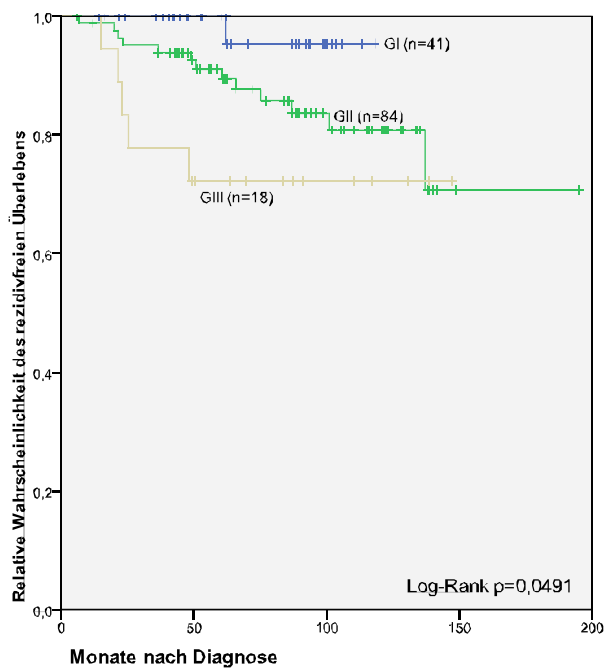


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (G)

3.4 Pathologisches Tumorstadium (pT)

In Abbildung 7 ist die prozentuale Verteilung der pathologischen Tumorstadien des Patientinnenkollektivs dargestellt. Die verschiedenen Untergruppen wurden wie folgt zusammengefasst: 86 Fälle (60%) entsprachen dem Stadium pT1, 51 Fälle (36%) dem Stadium pT2, 4 Fälle (3%) dem Stadium pT3 und 2 Fälle (1%) dem Stadium pT4. Aufgrund der geringen Fallzahl des Stadiums pT4 wurden diese Fälle von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Mit steigendem Tumorstadium nimmt die Wahrscheinlichkeit, Lymphknotenmetastasen zu entwickeln zu ($p=0,016$). Im Stadium pT1 hatten 17/83 (21%) Patientinnen eine Tumorabsiedlung in den Lymphknoten, im Stadium pT2 waren in 21/49 (43%) Fällen die Lymphknoten befallen und im Stadium pT3 2/4 (50%). Die univariate Analyse ergab erwartungsgemäß, dass Patientinnen im fortgeschrittenen Tumorstadium wahrscheinlich kürzer rezidivfrei bleiben und eher am Tumor versterben als Patientinnen mit niedrigem Tumorstadium (Tabelle 3).

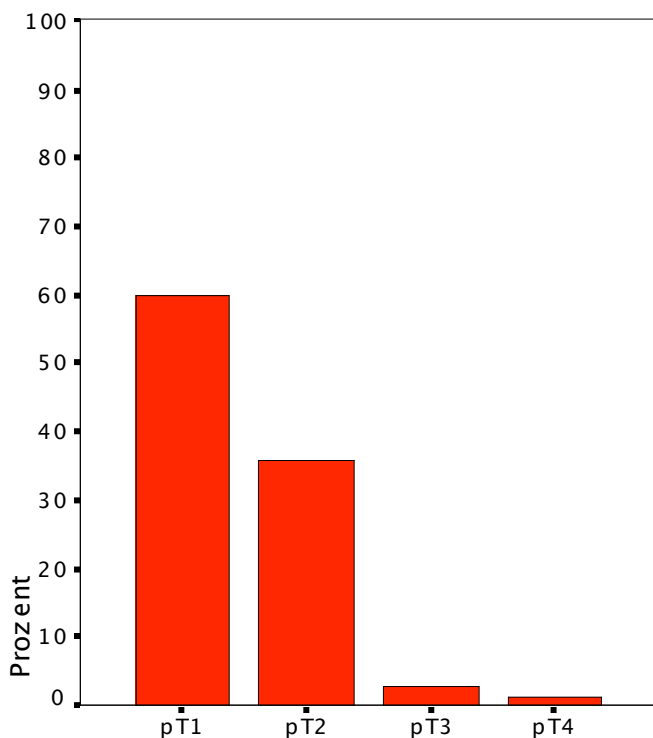


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung der pathologischen Tumorstadien

3.5 Lymphknotenbefall

96 Frauen (67%) waren zum Zeitpunkt der Operation frei von Lymphknotenmetastasen (pN0). Ein positiver Lymphknotenstatus lag in 40 Fällen - mit 36 Fällen (25%) im Stadium pN1 und 4 Fällen (3%) im Stadium pN2 - vor. In 7 Fällen (5%) wurde keine Lymphonodektomie durchgeführt (pNx). Bei der Untersuchung auf Assoziation mit anderen klinischen und pathologischen Daten und bei der Überlebensanalyse wurden Patientinnen mit Lymphknotenstatus pNx ausgeschlossen und die Untergruppen der Stadien pN1 und pN2 aufgrund der geringen Fallzahl von pN2 in eine Gruppe des positiven Lymphknotenstatus zusammengefasst. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen positivem Lymphknotenstatus und hoher Wachstumsfraktion (Ki 67>20%) ($p=0,021$). In der univariaten Analyse erwies sich ein negativer Lymphknotenstatus erwartungsgemäß als günstiger Prognosefaktor für Gesamtüberleben ($p=0,0039$) (Abbildung 8) und rezidivfreies Überleben ($p=0,0091$) (Abbildung 9) (Tabelle 3).

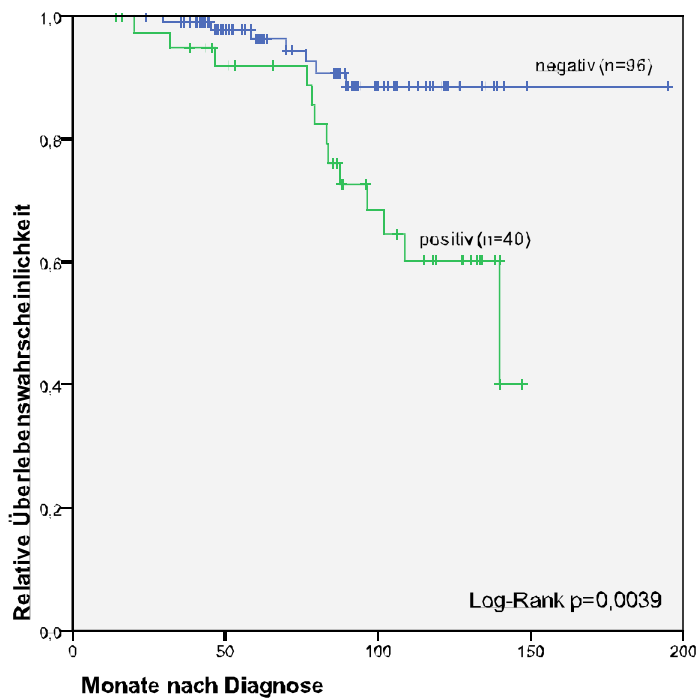


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

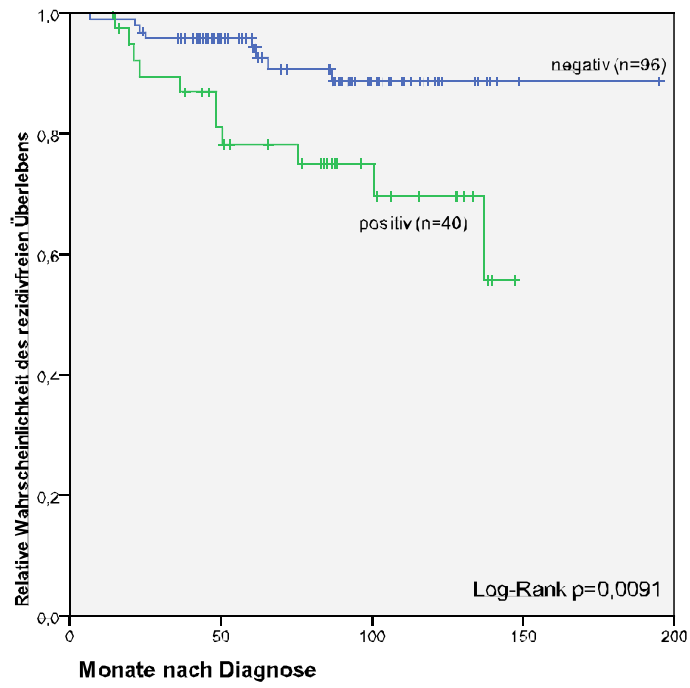


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

3.6 Östrogenrezeptor alpha (ER α)

Die Verteilung der prozentualen ER α -Expression des Patientinnenkollektivs ist Abbildung 10 zu entnehmen.

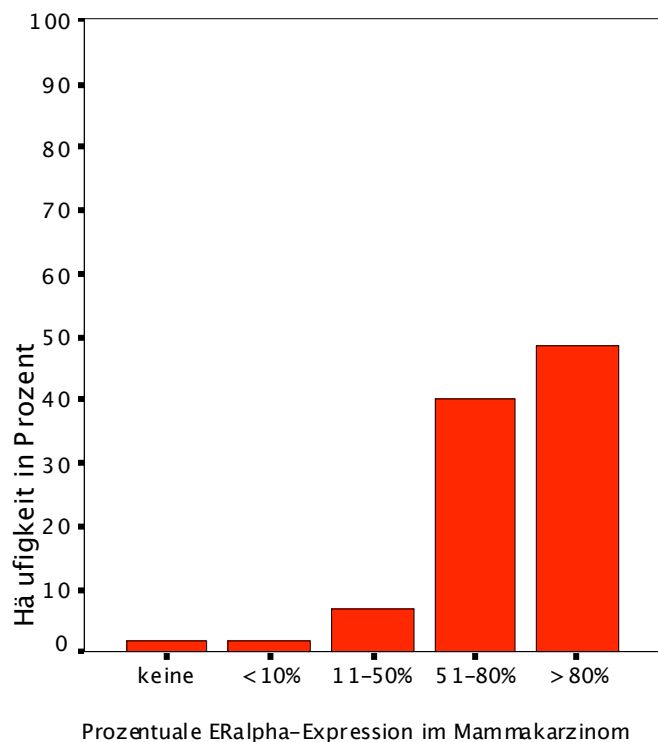


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der ER α -Expression im Patientinnenkollektiv

Zur Analyse des Verhältnisses einer starken ER α -Expression zu anderen klinischen und pathologischen Parametern wurden die ER α -Fraktionen in zwei Untergruppen eingeteilt. Die eine Untergruppe beinhaltet alle Mammakarzinome mit einer ER α -Expression von bis zu 80%, die andere diejenigen mit einem positiven ER α -Anteil von über 80%. Dieser Grenzwert wurde in der Analyse ermittelt und orientierte sich am Median der ER α -Expression im vorliegenden Patientinnenkollektiv. Diese Untersuchung zeigte, dass mit steigender Progesteronrezeptor(PR)-Fraktion der Anteil stark ER α -positiver Tumore zunimmt ($p=0,011$). In der univariaten Analyse konnte kein signifikanter Einfluss der ER α -Expressionsstärke auf Gesamtüberleben oder rezidivfreies Überleben ermittelt werden (Tabelle 3), doch zeigen die Abbildungen 11 und 12 eine Tendenz zu einem besseren outcome bei starker ER α -Expression im Mammakarzinomgewebe.

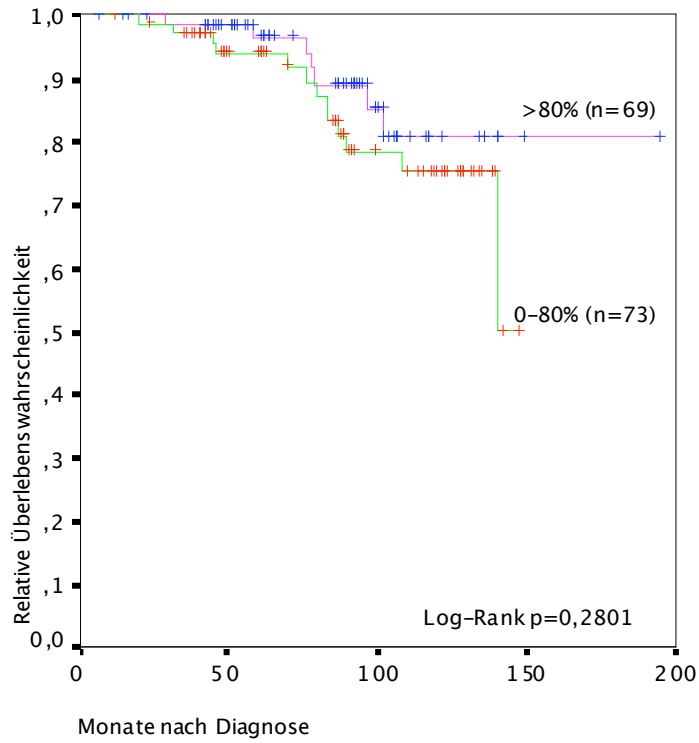


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der ER α -Expressionsstärke

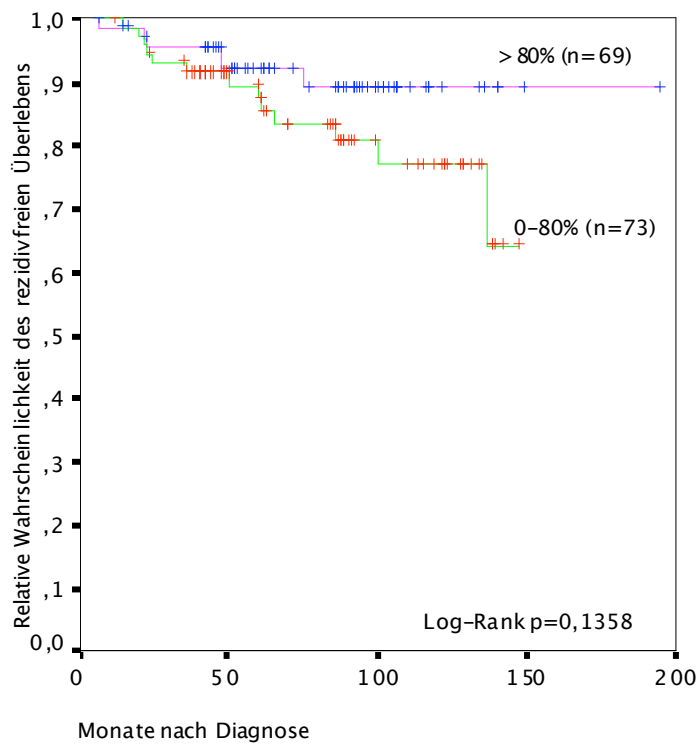


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der ER α -Expressionsstärke

3.7 Progesteronrezeptor (PR)

In Abbildung 13 ist die Aufgliederung des Patientinnenkollektivs nach der Progesteronrezeptor-Expressionsstärke in Prozent dargestellt. Im Rahmen der Untersuchung auf eine mögliche Korrelation zu anderen klinischen und pathologischen Kenngrößen und zur Analyse von Gesamtüberleben und Rezidivfreiheit wurde die prozentuale PR-Expression in zwei Untergruppen aufgeteilt, so dass PR-Fractionen zwischen 0% und 50% (n=44) mit solchen über 50% (n=97) verglichen wurden (Tabelle 3). Hier zeigte sich ein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben und in der Rezidivfreiheit zugunsten der Untergruppe starker PR-Expression (Abbildungen 14 und 15).

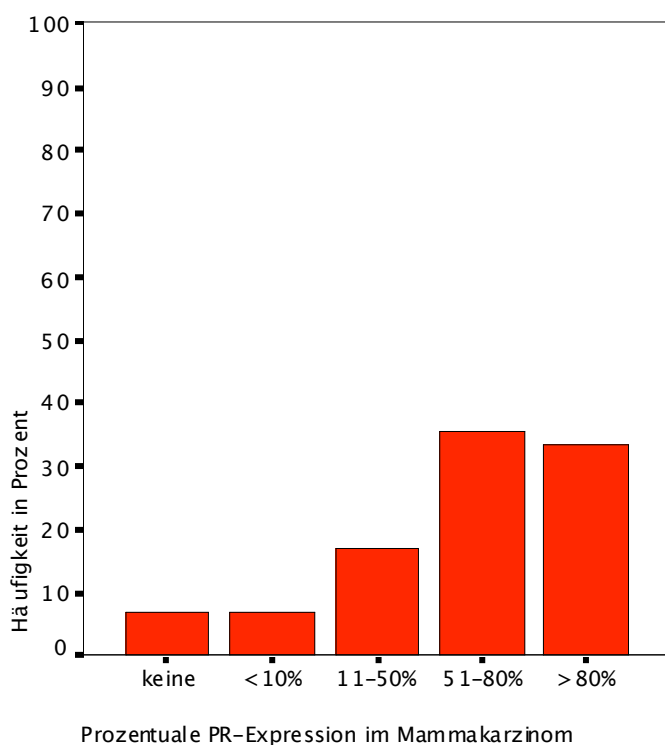


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der Progesteronrezeptor-Expression im Patientinnenkollektiv

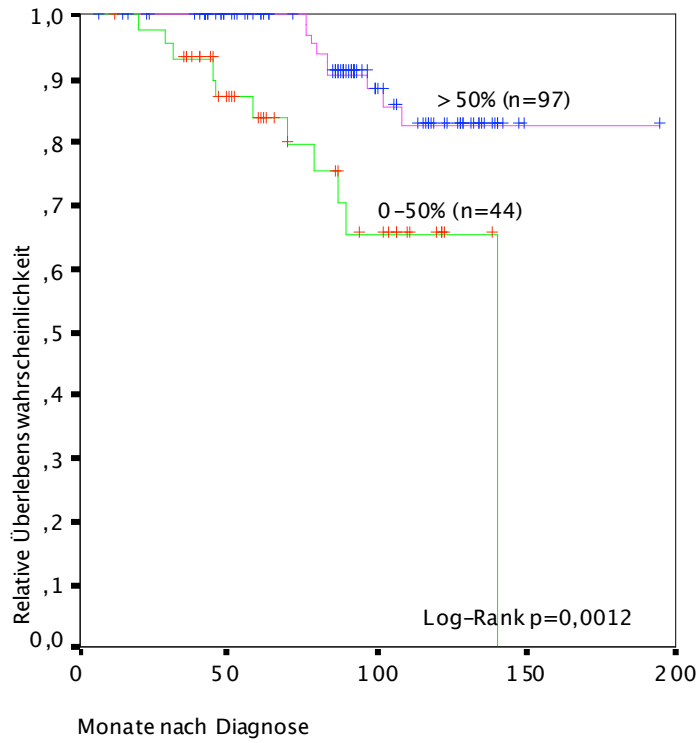


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der PR-Expressionsstärke

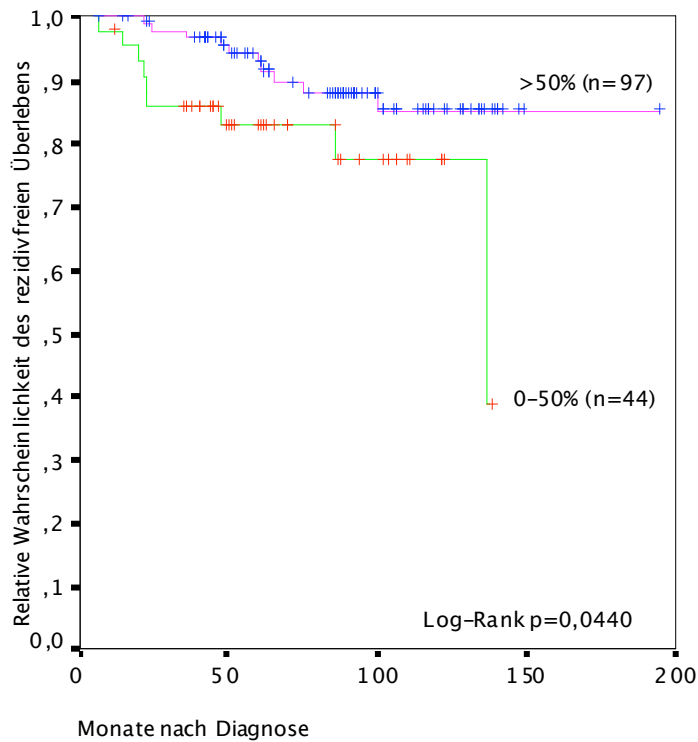


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der PR-Expressionsstärke

3.8 Wachstumsfraktion Ki 67

In 108 (76%) Fällen des Kollektivs wurde der Proliferationsmarker Ki 67, der die Wachstumsfraktion angibt, bestimmt. Die Wachstumsfraktionen wurden in drei Gruppen wie folgt eingeteilt: niedrig-proliferative Karzinome mit Ki 67 $\leq 20\%$ (n=82), mäßig-proliferative Karzinome mit Ki 67 von 21-60% (n=25) und hoch-proliferative Karzinome mit einer Wachstumsfraktion von über 60% (n=1). Abbildung 16 zeigt die Häufigkeiten der jeweiligen Wachstumsfraktionsgruppen.

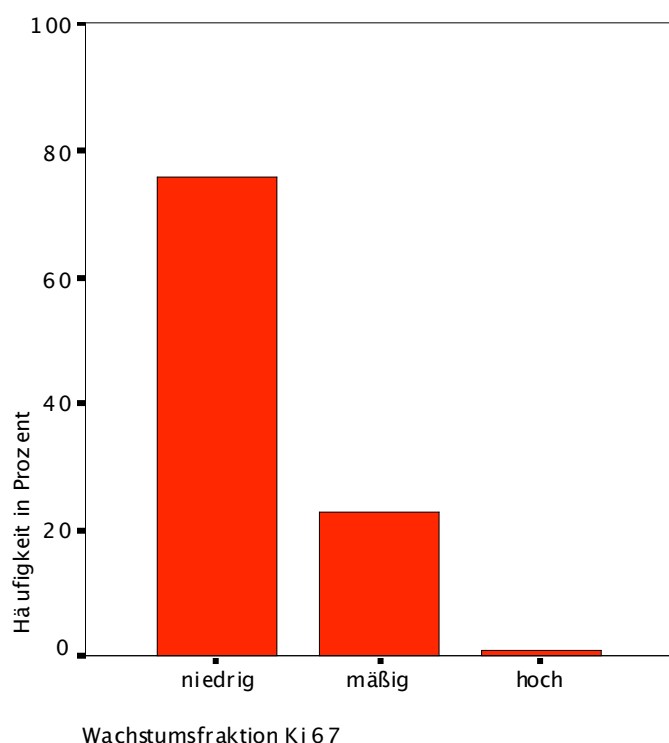


Abbildung 16: Verteilung der Wachstumsfraktionen im Patientinnenkollektiv

Angesichts der geringen Fallzahl in der Gruppe der hoch-proliferativen Mammakarzinome, wurden diese zum Zwecke der statistischen Analyse mit der Gruppe der mäßig-proliferativen Fälle zusammengefasst. In der Untersuchung auf Zusammenhänge mit weiteren klinischen und pathologischen Parametern zeigte sich, dass stark ER α -positive Fälle, definiert durch eine Rezeptorexpression über 50%, mit einer niedrigen Proliferationsrate assoziiert waren (p=0,044). Gleichmaßen korrelierte eine hohe PR-Expression über 80% mit einer geringeren Wachstumsfraktion (p=0,033). Auf das Gesamtüberleben hatte die Wachstumsfraktion keinen signifikanten Einfluss, wohingegen die Wahrscheinlichkeit für ein längeres rezidivfreies Überleben in der Untergruppe der niedrig-proliferativen Mammakarzinome signifikant (p=0,0044) höher war (Abbildung 17, Tabelle 3).

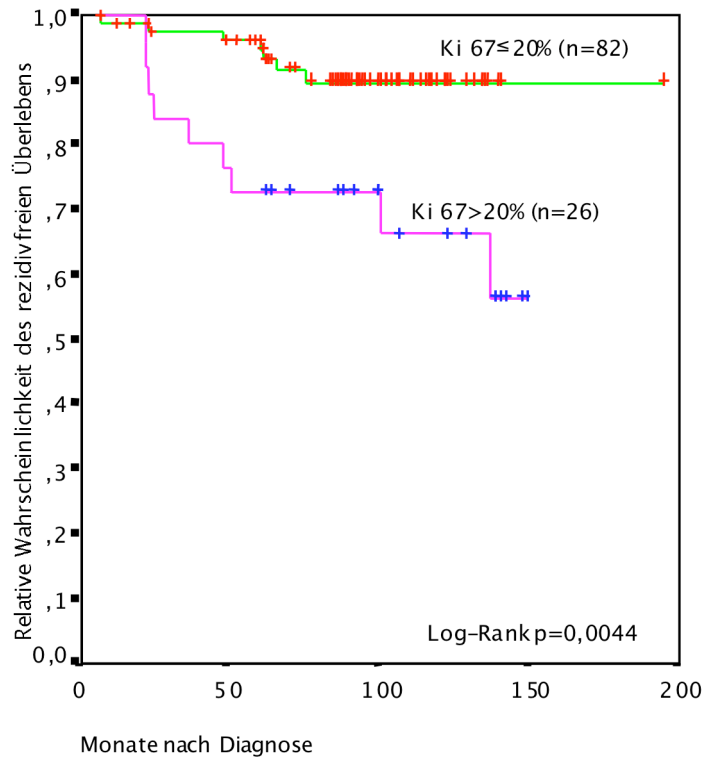


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Wachstumsfraktion

3.9 Her-2/neu-Status

Zur statistischen Auswertung wurde der Her-2/neu-Status in eine Gruppe der Her-2/neu-Überexpression (+3) und eine Gruppe der niedrigen Her-2/neu-Expression (0 bis +2) aufgeteilt. Der Her-2/neu-Status wurde in 85 (59%) von 143 Fällen bestimmt. Er hatte in dieser Subgruppe keinen Einfluss auf das GÜ. In Bezug auf das RFÜ hatten Fälle mit einem Her-2/neu-Status von 3+ einen signifikanten Nachteil (Abbildung 18) (Tabelle 3). Ein Zusammenhang mit anderen klinischen oder pathologischen Parametern konnte nicht ermittelt werden.

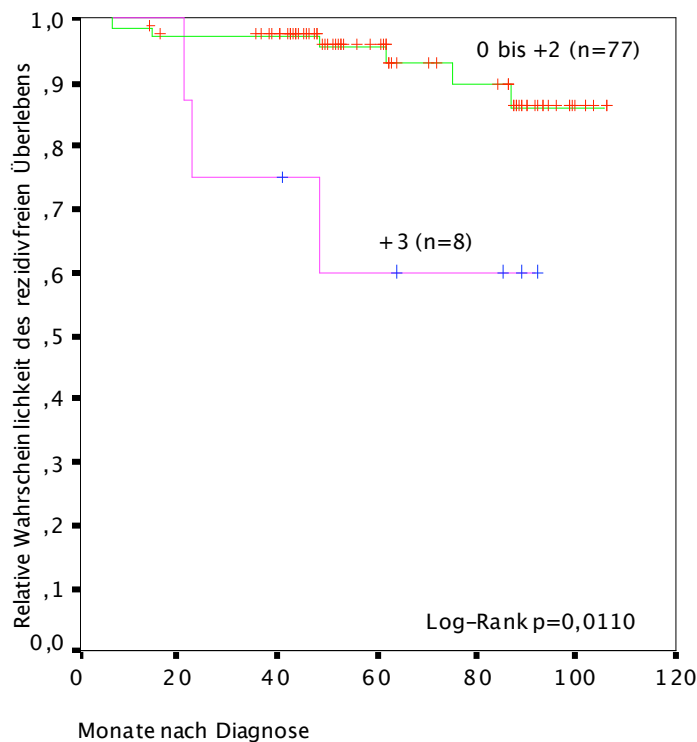


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Her-2/neu-Status

3.10 Immunhistochemische Färbung von Cyclin D1

Immunhistochemische Färbungen von Cyclin D1 an Mammakarzinomgewebe liegen in 141 von 143 Fällen (99%) vor. In zwei Fällen (1%) war das Färbeergebnis nicht verwertbar, da sich die entsprechenden TMAs im Rahmen des Färbeprozesses vom Objektträger gelöst hatten. Der Median liegt bei 0% und das Maximum bei 79% positiver Zellkerne. Der Median des histochemischen Scores für Cyclin D1 lag bei 0 und das Maximum bei 214. 93/141 Fälle (66%) zeigten keinerlei Kernfärbung für Cyclin D1, und 48/141 Fälle (34%) waren positiv für Cyclin D1 (Abbildung 19). Jegliche Kernfärbung für Cyclin D1 wurde als positiver Cyclin D1 Status gewertet. Bezüglich der durchschnittlichen Färbeintensität waren neben den 93 negativen Fällen (66%) 40 Fälle schwach positiv (28%), 7 Fälle mäßiggradig positiv (5%) und 1 Fall stark positiv für Cyclin D1 (1%) (Abbildung 20). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass der Zellkern die wesentliche Lokalisation der regulatorischen und onkogenen Funktionen von Cyclin D1 ist (Gladden and Diehl 2005) und dass im Zytoplasma der proteasomale Abbau von Cyclin D1 stattfindet (Alao 2007). Folglich wurden für die Bewertung der Cyclin D1 Expression ausschliesslich eindeutig positive Kernfärbungen berücksichtigt.

Die Korrelation der Cyclin D1-Expression mit klinischen und pathologischen Parametern ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Cyclin D1-Expression war signifikant mit dem Differenzierungsgrad assoziiert ($p=0,002$). Mit zunehmend schlechter Differenzierung nahm die Häufigkeit der Cyclin D1-positiven Fälle zu. Bei einer Aufteilung der ER α -Expression in prozentuale Anteile positiver Zellkerne $>80\%$ versus $0-80\%$ ($p=0,017$) und in immunreaktive Scores von 12 versus $0-9$ ($p=0,006$) ergab sich ein Zusammenhang mit dem Cyclin D1-Status. Bei beiden Aufteilungen war die Gruppe der starken ER α -Expression mit einem positiven Cyclin D1-Status assoziiert. Eine Cyclin D1-Expression war mit hoher p27-Expression assoziiert ($p=0,021$). Zwischen der Expression von Cyclin D1 und ER β besteht kein statistisch erfassbarer Zusammenhang. Auf das RFÜ und GÜ hatte die durchschnittliche Färbeintensität für Cyclin D1 einen signifikanten Einfluss: mit steigender Färbeintensität nahmen rezidivfreies ($p<0,0001$) und Gesamtüberleben ($p=0,0211$) ab (Tabelle 3, Abbildung 21 und 22). Es ist zu erkennen, dass sich die Fälle mit mäßiger Cyclin D1 Färbeintensität im Krankheitsverlauf deutlich von den Fällen schwacher und negativer Cyclin D1 Färbung absetzen. Da deren Fallzahl mit 7 allerdings klein ist, wurden die klinischen und pathologischen Parameter zu diesen einzelnen Fällen in Tabelle 5 aufgelistet, um zu demonstrieren, dass diese Untergruppe nicht durch die Anhäufung anderer schlechter prognostischer Kenngrößen gekennzeichnet ist.

Zwar konnte für den Cyclin D1-Status kein signifikanter Einfluss auf GÜ und RFÜ ermittelt werden, doch lässt sich an den jeweiligen Kaplan-Meier-Kurven eine sichtbare Tendenz zu einem besseren GÜ und RFÜ bei fehlender Cyclin D1 Expression ablesen (Abbildung 23 und 24). Um die reine prädiktive Bedeutung der Cyclin D1 Expression im Hinblick auf Tamoxifen in diesem Kollektiv zu ermitteln, wurde in Bezug auf GÜ und RFÜ eine Subgruppenanalyse durchgeführt, die ausschließlich diejenigen Patientinnen beinhaltete, die Tamoxifen fünf Jahre eingenommen hatten oder unter der Tamoxifeneinnahme ein Rezidiv erlitten hatten. Hier zeigte sich für die Fälle stärkerer Cyclin D1 Färbeintensität eine Tendenz zu einem Überlebensnachteil (Abbildung 25) und ein signifikanter Nachteil ($p=0,0059$) im rezidivfreien Überleben (Abbildung 26).

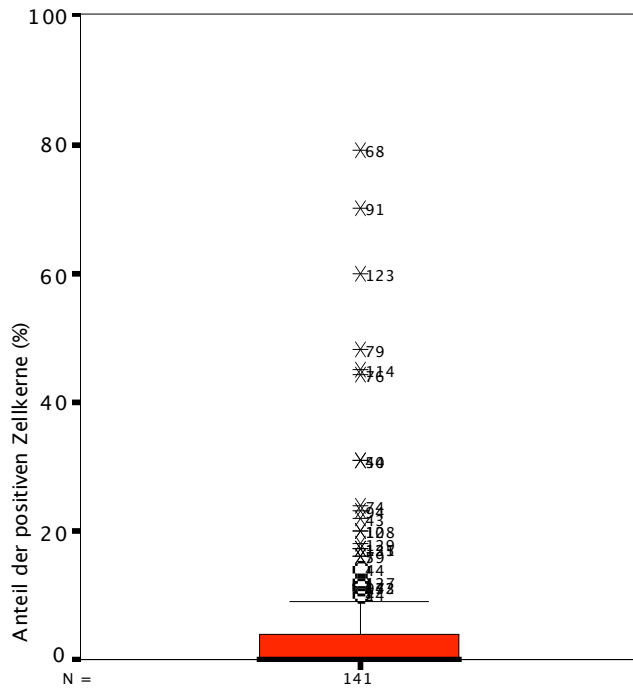


Abbildung 19: Verteilung der Cyclin D1-Anfärbung im Patientinnenkollektiv

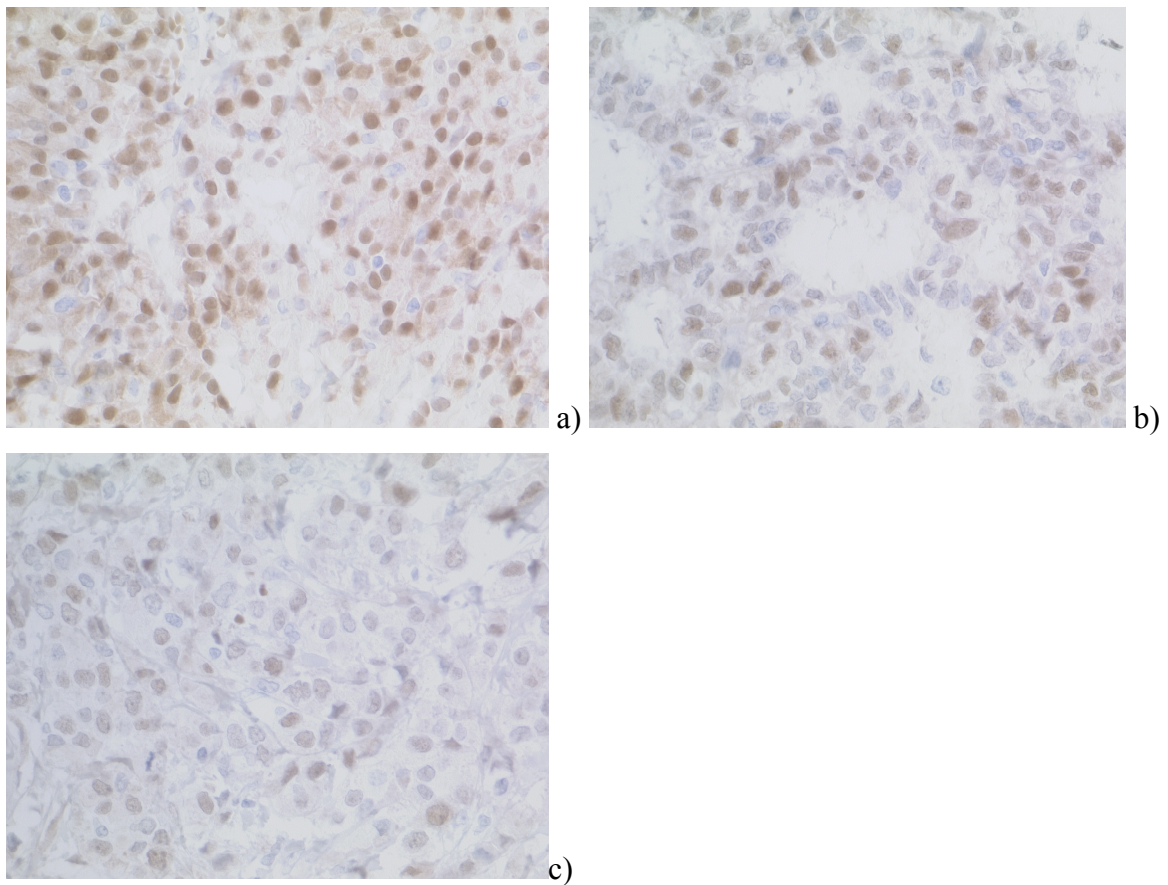


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbbeispiele von Cyclin D1 an invasivem Mammakarzinomgewebe mit a) starker, b) mäßiger und c) schwacher nukleärer Färbintensität

Tabelle 4: Klinische und pathologische Parameter korreliert mit der Cyclin D1-Expression

	Cyclin D1 Expression			p-Wert
	n	ZK negativ n (%)	ZK positiv n (%)	
Alter bei Diagnose	141	93 (66)	48 (34)	0,448
<50		5 (71)	2 (29)	
50-59		23 (56)	18 (43)	
60-69		39 (68)	18 (32)	
≥70		26 (72)	10 (28)	
Histologischer Subtyp	121			0,381
duktal		67 (64)	38 (36)	
lobulär		12 (75)	4 (25)	
Differenzierungsgrad	141			0,002
1 (gut differenziert)		34 (87)	5 (13)	
2 (mäßig differenziert)		51 (61)	33 (39)	
3 (schlecht differenziert)		8 (44)	10 (56)	
Tumorgröße	141			0,286
pT1		59 (69)	26 (31)	
>pT1		34 (61)	22 (39)	
Lymphknotenstatus	134			0,453
negativ		65 (69)	29 (31)	
positiv		25 (63)	15 (37)	
ERα-Fraktion	140			0,017
0-80%		54 (75)	18 (25)	
>80%		38 (56)	30 (44)	
ERα-IRS	115			0,006
0-9		46 (78)	13 (22)	
12		30 (54)	26 (46)	
PR-Fraktion	139			0,406
0-50%		26 (61)	17 (39)	
>50%		65 (68)	31 (32)	
PR-IRS	115			0,219
0-9		50 (63)	30 (37)	
12		26 (74)	9 (26)	
Her2-Status	84			0,339
0		34 (83)	7 (17)	
1+		17 (65)	9 (35)	
2+		7 (78)	2 (22)	
3+		5 (63)	3 (37)	
Ki 67-Fraktion	106			0,138
≤20%		53 (66)	27 (34)	
>20%		13 (50)	13 (50)	
p27-Fraktion	141			0,021
0-10%		54 (75)	18 (25)	
>10%		39 (56)	30 (44)	
p27-Färbeintensität	141			0,085
negativ		35 (81)	8 (19)	
schwach		41 (59)	29 (41)	
mäßig		12 (60)	8 (40)	
stark		5 (63)	3 (37)	
ERβ-IRS	141			0,848
0-9		73 (66)	37 (34)	
12		20 (65)	11 (35)	
Tamoxifen	74			0,059
responsiv		37 (64)	21 (36)	
non-responsiv		6 (37)	10 (63)	

n: Anzahl miteinbezogener Fälle; ZK: Zellkerne; ER: Östrogenrezeptor;
 PR: Progesteronrezeptor; IRS: Immunreaktiver Score
 Anmerkung: signifikante p-Werte rot

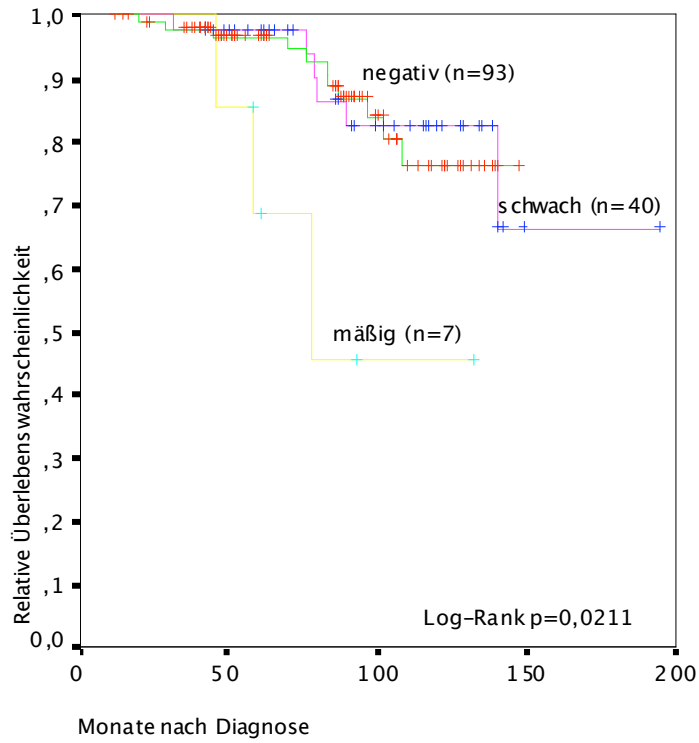


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Cyclin D1-Färbeintensität

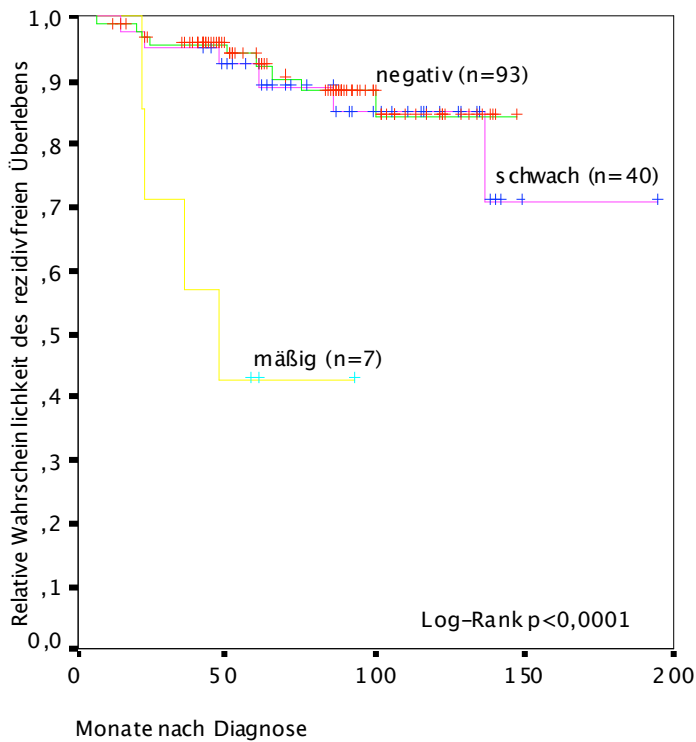


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Cyclin D1-Färbeintensität

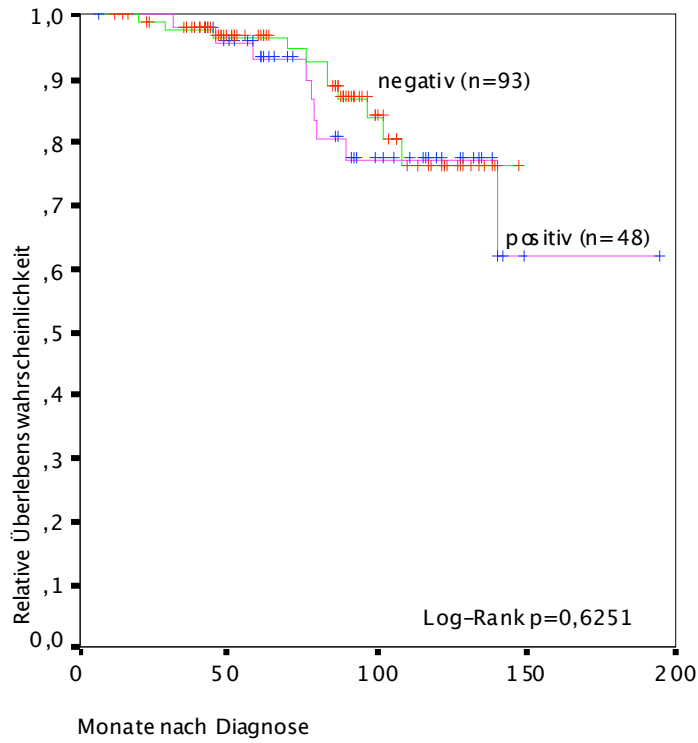


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit vom Cyclin D1-Status im Gesamtkollektiv

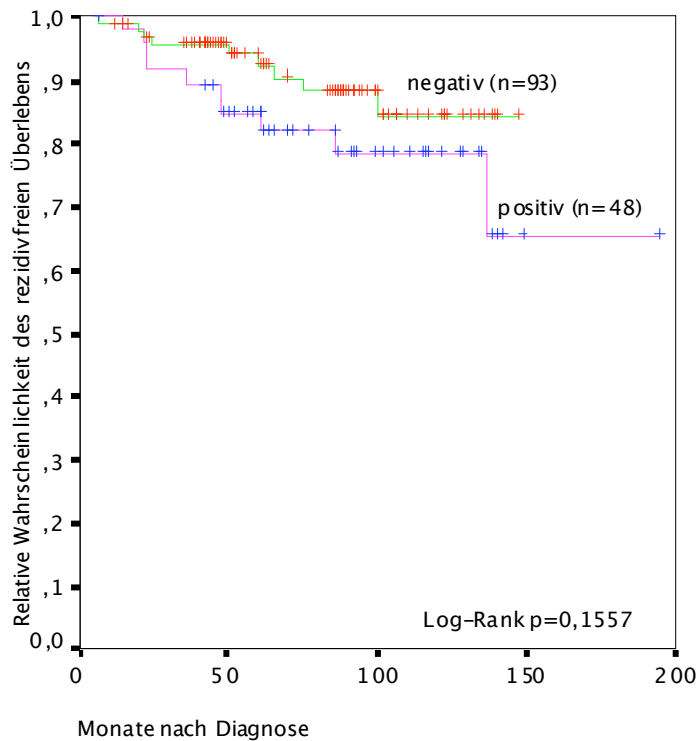


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Cyclin D1-Status im Gesamtkollektiv

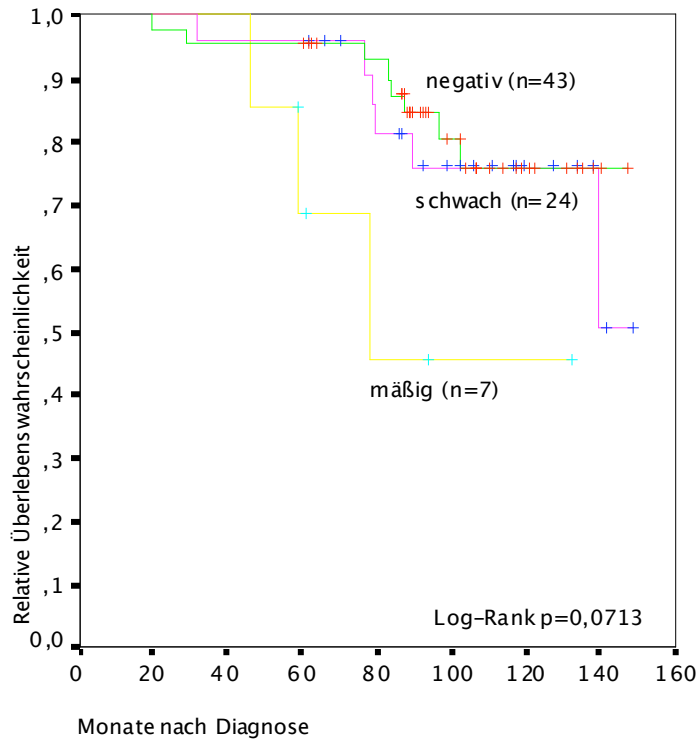


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Cyclin D1 Färbeintensität in der Subgruppe der Tamoxifeneinnahme für 5 Jahre

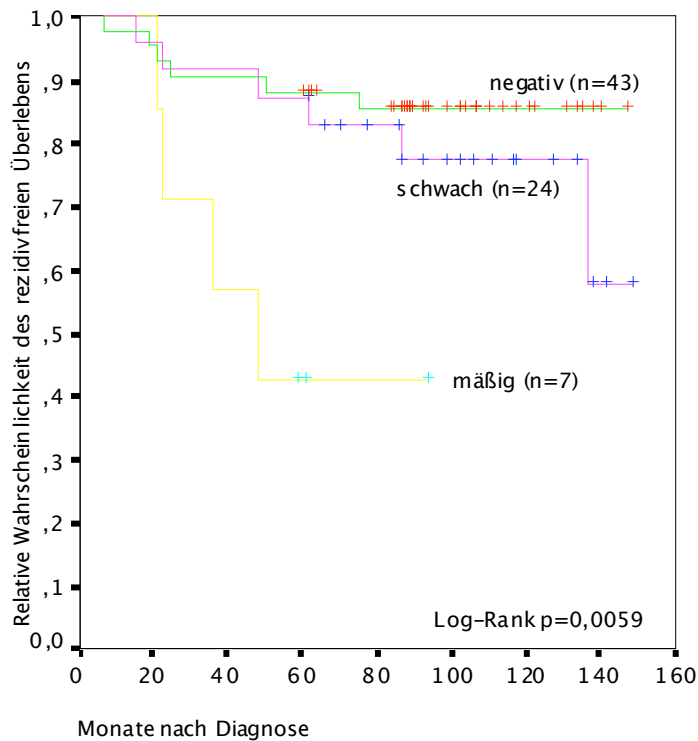


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Cyclin D1 Färbeintensität in der Subgruppe der Tamoxifeneinnahme für 5 Jahre

Tabelle 5: Klinische und pathologische Daten der sieben Patientinnen mit mäßiger Cyclin D1 Färbeintensität

Pat.	Alter	Meno	Histotyp	pT	pN	M	G	ERα	PR	Ki-67	Her-2	Rez.	RFÜ	Rez.-lok.	Met.-lok.
1	59	post	gem.-ep.	1	1	0	3	0	10	60	nb	ja	21	ipsilat. Mamma	Lk, Kn
2	57	post	duktal	1	0	0	2	90	30	15	3+	ja	23	ipsilat. Mamma	Lk, Lu, Kn, Leb, Mm
3	54	post	duktal	1	0	0	1	90	90	10	1+	nein	93		
4	47	prae	duktal	1	0	0	2	81	81	20	2+	nein	58		
5	74	post	duktal	1	2	0	3	81	81	50	0	ja	48	ipsilat. Mamma	Lk
6	57	post	duktal	2	0	0	2	70	20	5	1+	nein	61		
7	51	post	duktal	2	1	0	2	70	80	35	nd	ja	36	ipsilat. Mamma	

Pat.: Patientin; Meno: Menopausenstatus; post: postmenopausal; prae: prämenopausal;
gem.-ep.: gemischt-epithelial; pT: Tumorgrosse; pN: Lymphknotenstatus;
M: Fernmetastasen; G: Differenzierungsgrad; ER: Östrogenrezeptorfraction;
PR: Progesteronrezeptorfraction (alle vorhergehenden Daten beziehen sich auf die Erstdiagnose
bzw. das Primärkarzinom).
Rez: Rezidiv; RFÜ: rezidivfreies Überleben im Monaten; Rez.-lok.: Rezidivlokalisierung;
Met.-lok.: Metastasenlokalisierung; Lk: Lymphknoten; Kn: Knochen; Lu: Lunge; Leb: Leber;
Mm: Skelettmuskulatur; nb: nicht bestimmt

3.11 Immunhistochemische Färbung von p27

Immunhistochemische Färbungen von p27 an Mammakarzinomgewebe liegen in 142 von 143 Fällen (99%) vor. In einem Fall (1%) war das Färbeergebnis nicht verwertbar, da sich der entsprechende TMA im Rahmen des Färbeprozesses vom Objektträger gelöst hatte. Der Median des prozentualen Anteils p27-positiver Zellkerne über das gesamte Kollektiv betrug 10% mit einem Maximum von 99% angefärbter Zellkerne (Abbildung 27). Der Median des histochemischen Scores für p27 lag bei 12 mit einem Maximum von 200. 44 Fälle (31%) waren negativ für p27, 70 Fälle (49%) waren schwach, 20 (14%) mäßiggradig und 8 (6%) stark angefärbt (Abbildung 28). 73 Fälle (51%) wurden einer niedrigen p27-Expression mit $\leq 10\%$ positiven Zellkernen zugeordnet und 69 Fälle (49%) wurden mit $>10\%$ angefärbten Zellkernen als hoch eingestuft. Dieser Grenzwert wurde im Rahmen der Analyse ermittelt und orientierte sich am Median der p27 Expression im untersuchten Patientinnenkollektiv.

Tabelle 6 gibt Aufschluss über den Zusammenhang der p27-Expression mit anderen klinischen und pathologischen Parametern. Eine hohe Expression von p27 korrelierte mit einer starken ER α -Expression (bei IRS 0-9 vs. 12) ($p=0,016$), einem positiven Cyclin D1 Status ($p=0,021$) und einer hohen Färbeintensität (SI) für Cyclin D1 ($p=0,034$). Eine Assoziation zwischen einer hohen p27-Expression und einem niedrigen pT-Stadium verfehlte knapp die Signifikanz ($p=0,051$).

Auf das GÜ und das RFÜ hat p27 im vorliegenden Kollektiv keine signifikanten Auswirkungen (Tabelle 3) (Abbildung 29 und 30). Die Überlebensanalyse in der Subgruppe der regulären Tamoxifeneinnahme ergab keine signifikanten Unterschiede der verschiedenen p27 Expressionsstärken im GÜ und RFÜ (Abbildung 31 und 32).

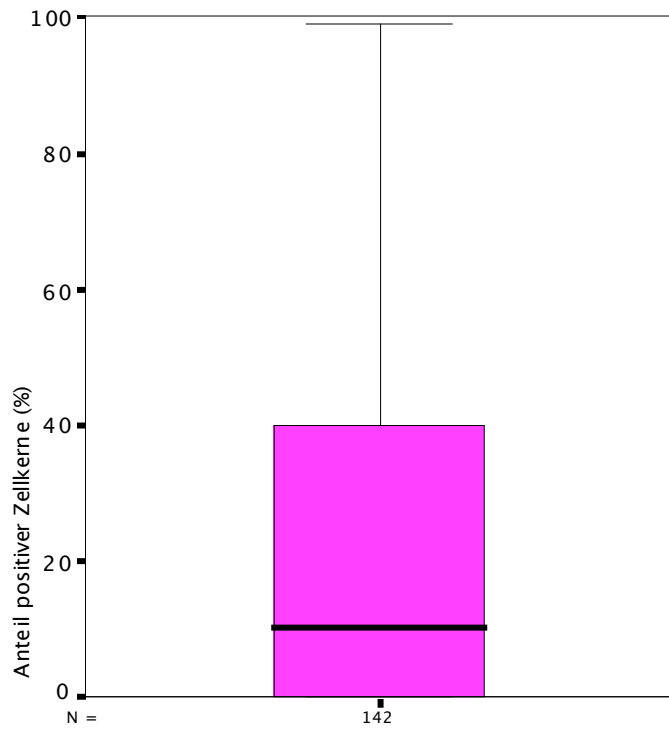
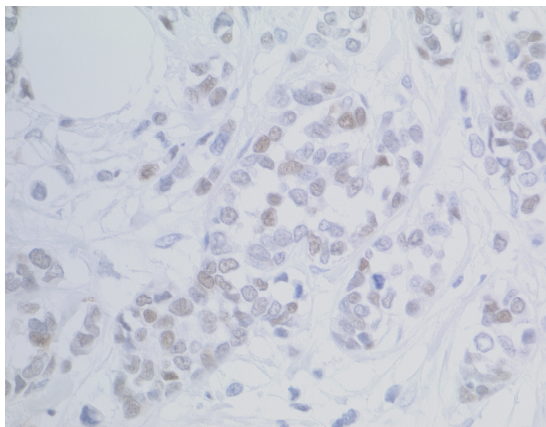
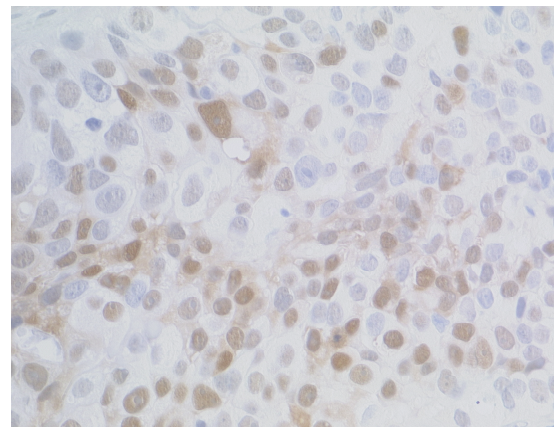


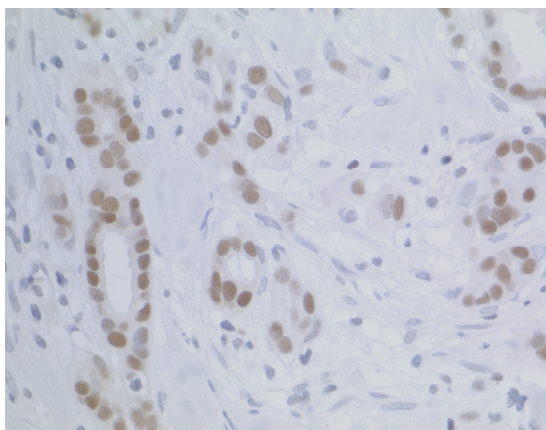
Abbildung 27: Verteilung der prozentualen p27-Anfärbung im Patientinnenkollektiv



a)



b)



c)

Abbildung 28: Immunhistochemische Färbbeispiele von p27 an invasivem Mammakarzinomgewebe mit a) schwacher, b) mäßiger und c) starker Färbintensität

Tabelle 6: Klinische und pathologische Parameter korreliert mit der p27 Expression

	p27 Expression			p-Wert
	n	niedrig ($\leq 10\%$) n (%)	hoch ($> 10\%$) n (%)	
Alter bei Diagnose	142	73 (51)	69 (49)	0,661
<50		4 (57)	3 (43)	
50-59		19 (46)	22 (54)	
60-69		28 (49)	29 (51)	
≥ 70		22 (60)	15 (40)	
Histologischer Subtyp	122			0,692
duktal		54 (51)	52 (49)	
lobulär		9 (56)	7 (44)	
Differenzierungsgrad	142			0,059
1 (gut differenziert)		15 (38)	25 (62)	
2 (mäßig differenziert)		50 (60)	34 (40)	
3 (schlecht differenziert)		8 (44)	10 (56)	
Tumorgroße	142			0,051
pT1		38 (45)	47 (55)	
>pT1		35 (61)	22 (39)	
Lymphknotenstatus	135			0,074
negativ		54 (57)	41 (43)	
positiv		16 (40)	24 (60)	
ERα-Fraktion	141			0,111
0-80%		42 (58)	31 (42)	
>80%		30 (44)	38 (56)	
ERα-IRS	116			0,016
0-9		37 (62)	23 (38)	
12		22 (39)	34 (61)	
PR-Fraktion	140			0,767
0-50%		21 (49)	22 (51)	
>50%		50 (52)	47 (48)	
PR-IRS	116			0,498
0-9		39 (49)	41 (51)	
12		20 (56)	16 (44)	
Her2-Status	84			0,863
0		20 (49)	21 (51)	
1+		14 (54)	12 (46)	
2+		4 (44)	5 (56)	
3+		5 (63)	3 (37)	
Ki 67-Fraktion	107			0,956
$\leq 20\%$		40 (49)	41 (51)	
>20%		13 (50)	13 (50)	
Cyclin D1-Status	141			0,021
negativ		54 (58)	39 (42)	
positiv		18 (38)	30 (62)	
Cyclin D1-Färbeintensität	140			0,034
0		54 (58)	39 (42)	
1		17 (42)	23 (58)	
2		1 (14)	6 (86)	
ERβ-IRS	142			0,666
0-9		56 (50)	55 (50)	
12		17 (55)	14 (45)	
Tamoxifen	75			0,952
responsiv		30 (51)	29 (49)	
non-responsiv		8 (50)	8 (50)	

n: Anzahl miteinbezogener Fälle; ER: Östrogenrezeptor;

PR: Progesteronrezeptor; IRS: Immunreaktiver Score.

Anmerkung: signifikante p-Werte rot

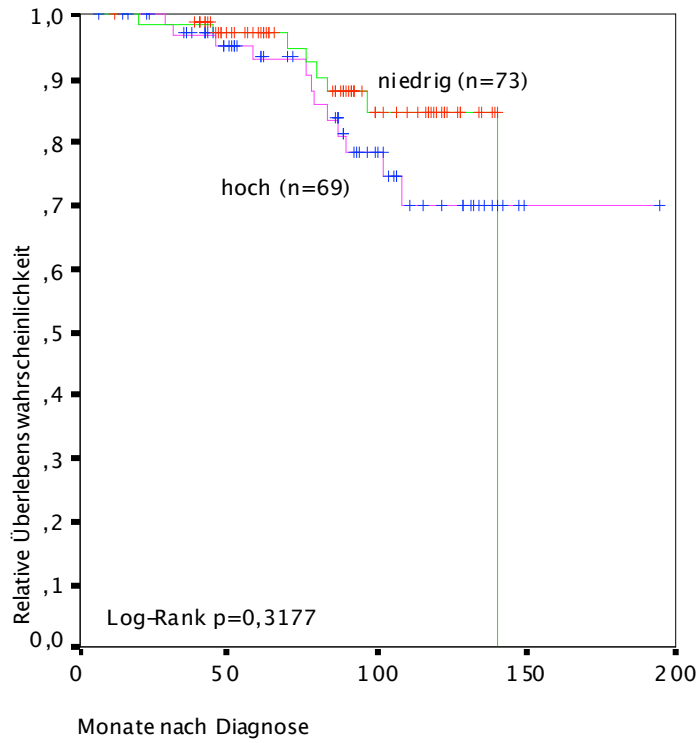


Abbildung 29: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der p27-Expression im Gesamtkollektiv

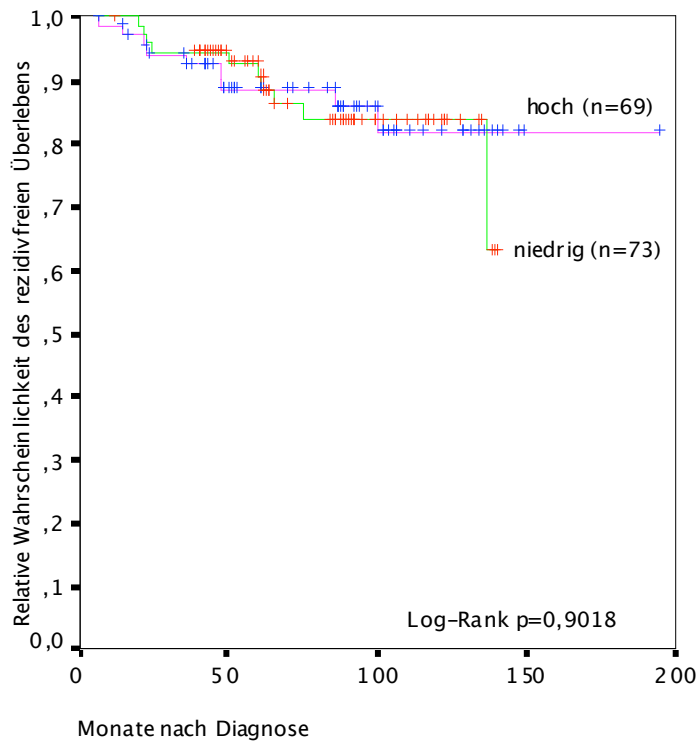


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der p27-Expression im Gesamtkollektiv

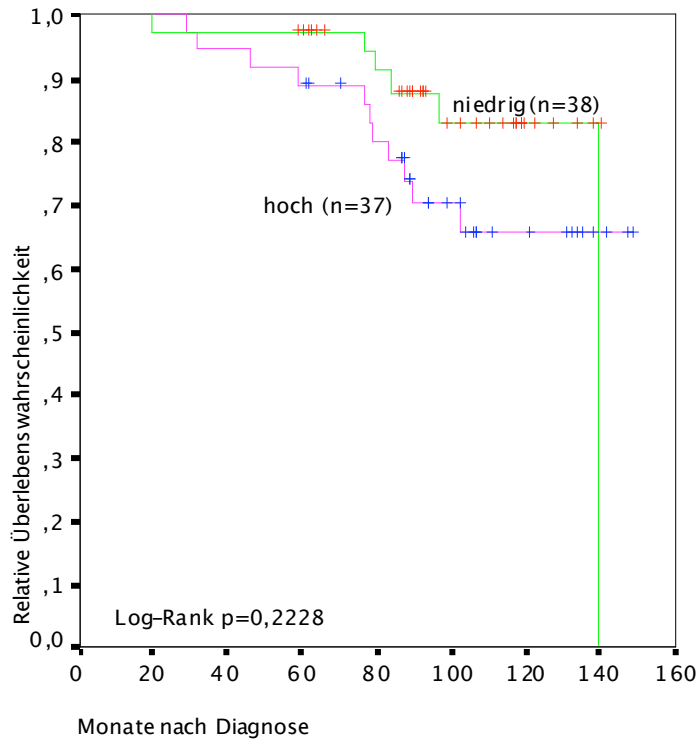


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der p27 Expression im Subkollektiv der regulären Tamoxifeneinnahme

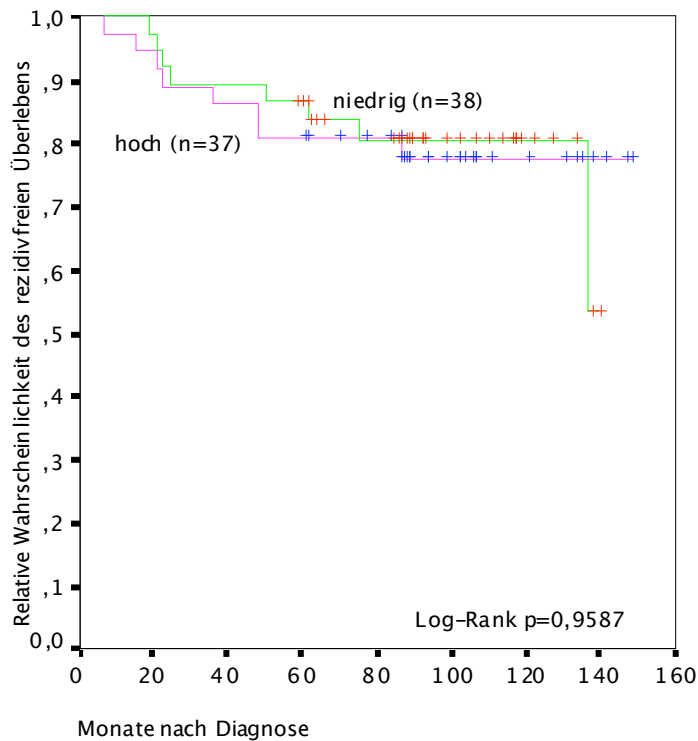


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der p27 Expression im Subkollektiv der regulären Tamoxifeneinnahme

3.12 Immunhistochemische Färbung von ERβ

Immunhistochemische Färbungen für die Expression von ERβ in Mammakarzinomgewebe liegen in 142 von 143 Fällen (99%) vor. In einem Fall war das Färbeergebnis nicht verwertbar, da sich die entsprechenden TMAs im Rahmen des Färbeprozesses vom Objektträger gelöst hatten. Der Median der Fraktion ERβ-positiver Zellkerne lag bei 99% mit einem Minimum von 50% und einem Maximum von 100% angefärbter Zellkerne. Der Median des immunreaktiven Scores (IRS) für ERβ lag bei 8, das Minimum bei 2 und das Maximum bei einem IRS von 12 (Abbildung 33). Die Färbeintensität für ERβ war im Median mäßig (2) bei mindestens schwacher (1) Kernfärbung und höchstens starker (3) Kernfärbung im Gesamtkollektiv (Abbildung 34). 111 Fälle (78%) entsprachen einer mäßig bis starken ERβ-Expression innerhalb einer IRS-Spanne von 0 bis 9 und 31 Fälle (22%) waren mit einem IRS von 12 sehr stark positiv für ERβ. In welchem Zusammenhang die ERβ Expression mit klinischen und pathologischen Kenngrößen steht, gibt Tabelle 7 wieder.

Es zeigte sich keine Korrelation der ERβ Expression mit klinischen oder pathologischen Parametern.

Das GÜ und RFÜ waren bei oben erwähnter IRS-Einteilung nicht signifikant von der ERβ-Expression beeinflusst. Es besteht jedoch ein erkennbarer Trend zu einem vorteilhafteren Krankheitsverlauf bei sehr starker ERβ Expression (Abbildung 35 und 36). Im Rahmen der Untersuchung der prädiktiven Relevanz von ERβ zeigte sich in der Subgruppenanalyse der Patientinnen mit regulärer Tamoxifeneinnahme eine Tendenz zu einem günstigeren Krankheitsverlauf bei sehr starker ERβ Expression (Abbildung 37 und 38).

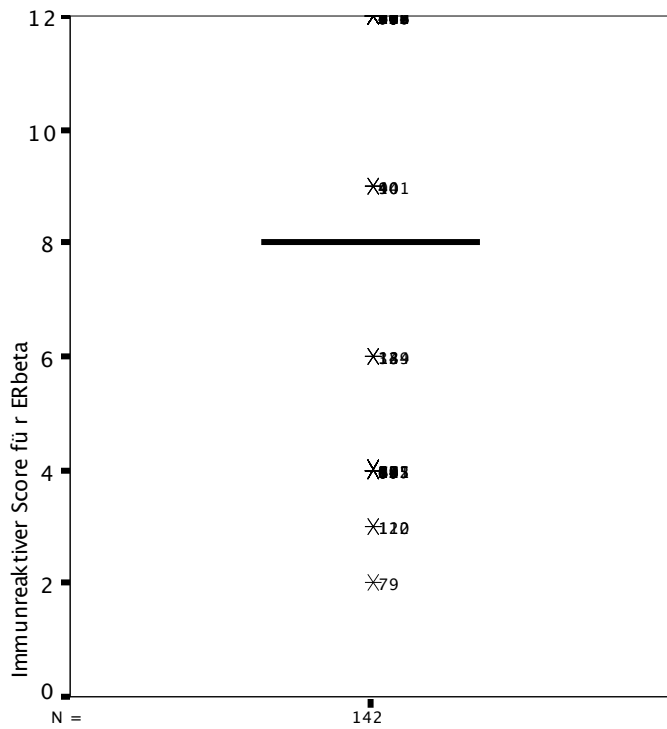
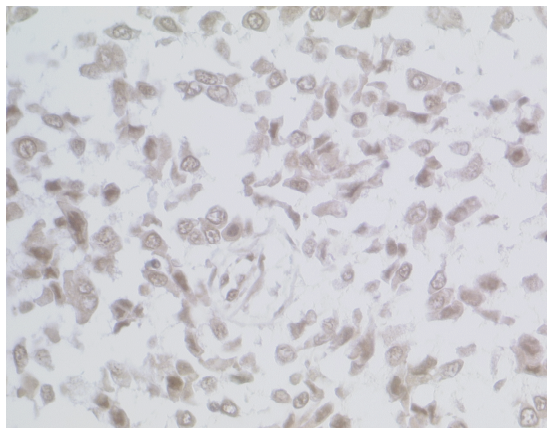
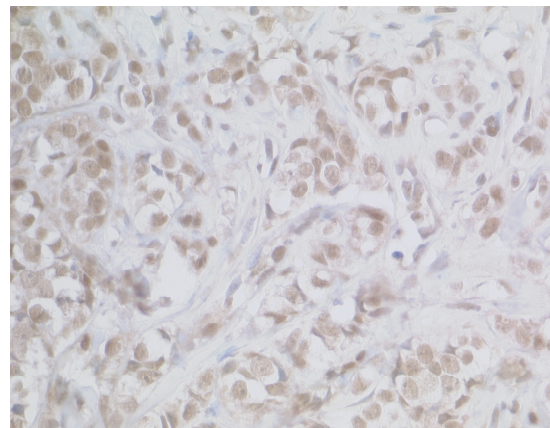


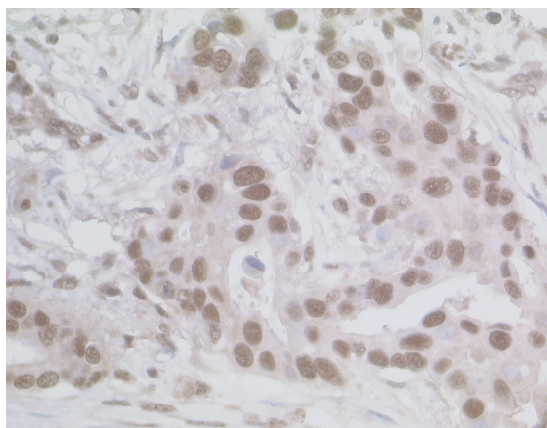
Abbildung 33: Verteilung des immunreaktiven Scores für ERβ im Patientinnenkollektiv



a)



b)



c)

Abbildung 34: Immunhistochemische Färbbeispiele von ERβ an invasivem Mammakarzinomgewebe mit a) schwacher, b) mäßiger und c) starker Färbeintensität

Tabelle 7: Klinische und pathologische Daten korreliert mit der ERβ Expression

	n	ERβ-Expression (IRS)		p-Wert
		mäßig bis stark (0-9) n (%)	sehr stark (12) n (%)	
Alter bei Diagnose	142	111 (78)	31 (22)	0,386
<50		5 (71)	2 (29)	
50-59		29 (71)	12 (29)	
60-69		45 (79)	12 (21)	
≥70		32 (87)	5 (13)	
Histologischer Subtyp	122			0,901
duktal		81 (76)	25 (24)	
lobulär		12 (75)	4 (25)	
Differenzierungsgrad	142			0,148
1 (gut differenziert)		34 (85)	6 (15)	
2 (mäßig differenziert)		61 (73)	23 (27)	
3 (schlecht differenziert)		16 (89)	2 (11)	
Tumorgroße	142			0,550
pT1		65 (77)	20 (23)	
>pT1		46 (81)	11 (19)	
Lymphknotenstatus	135			0,715
negativ		74 (78)	21 (22)	
positiv		30 (75)	10 (25)	
ERα-Fraktion dichotom	141			0,699
0-80%		56 (77)	17 (23)	
>80%		54 (79)	14 (21)	
ERα-IRS dichotom	116			0,842
0-9		47 (78)	13 (22)	
12		43 (77)	13 (23)	
PR-Fraktion dichotom	140			0,274
0-50%		31 (72)	12 (28)	
>50%		78 (80)	19 (20)	
PR-IRS dichotom	116			0,974
0-9		62 (78)	18 (22)	
12		28 (78)	8 (22)	
Her2-Status	84			0,811
0		32 (78)	9 (22)	
1+		19 (73)	7 (27)	
2+		7 (78)	2 (22)	
3+		5 (63)	3 (37)	
Ki 67-Fraktion dichotom	107			0,062
≤20%		61 (75)	20 (25)	
>20%		24 (92)	2 (8)	
Cyclin D1-Status	141			0,848
negativ		73 (79)	20 (21)	
positiv		37 (77)	11 (23)	
Cyclin D1-Färbeintensität	140			0,794
0		73 (79)	20 (21)	
1		30 (75)	10 (25)	
2		6 (86)	1 (14)	
p27-Status	142			0,666
0-10%		56 (77)	17 (23)	
>10%		55 (80)	14 (20)	
Tamoxifen	75			0,097
responsiv		44 (75)	15 (25)	
non-responsiv		15 (94)	1 (6)	

n: Anzahl miteinbezogener Fälle; ZK: Zellkerne; ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; IRS: Immunreaktiver Score

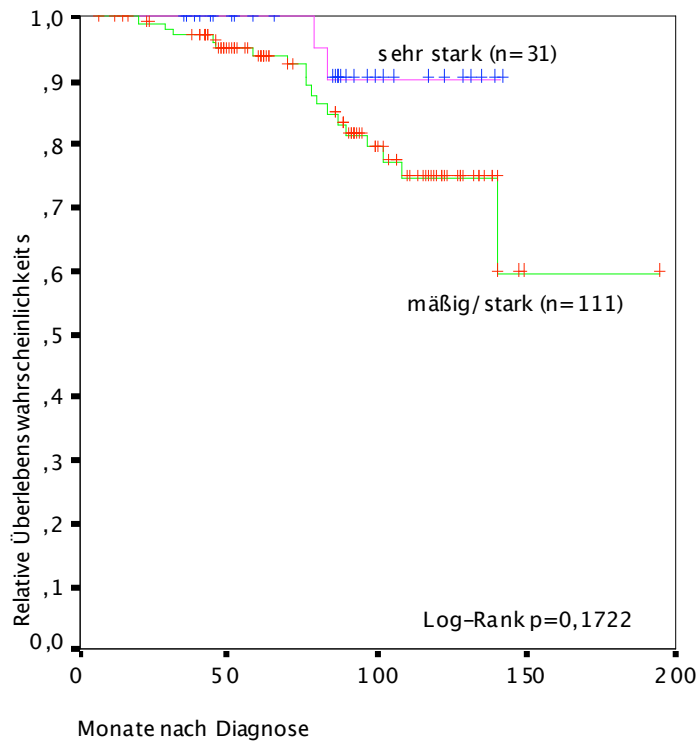


Abbildung 35: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der ER β Expression im Gesamtkollektiv

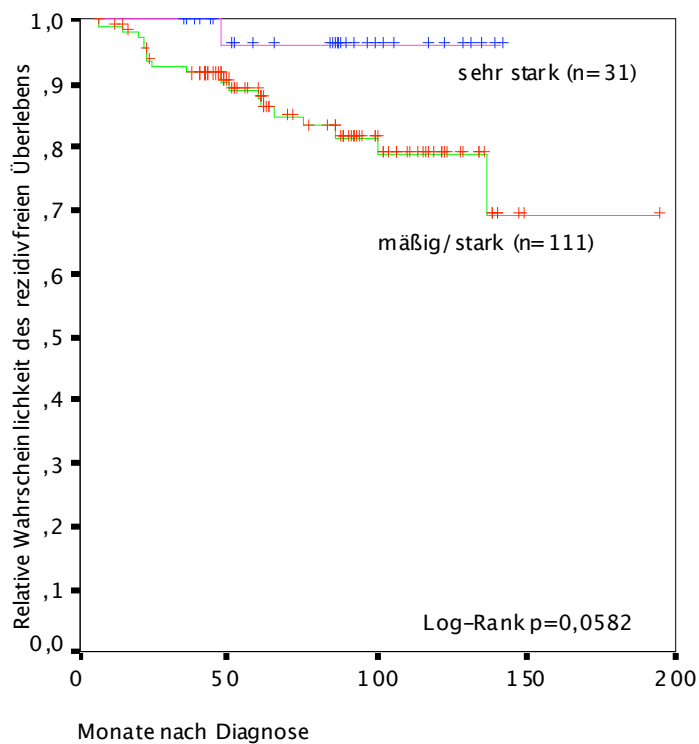


Abbildung 36: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der ER β -Expression im Gesamtkollektiv

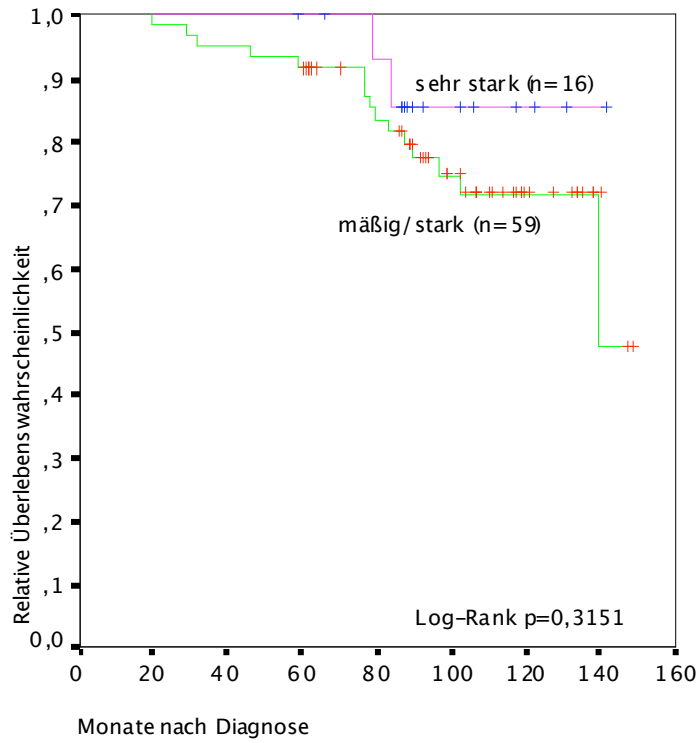


Abbildung 37: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der ERβ Expression im Subkollektiv der regulären Tamoxifeneinnahme

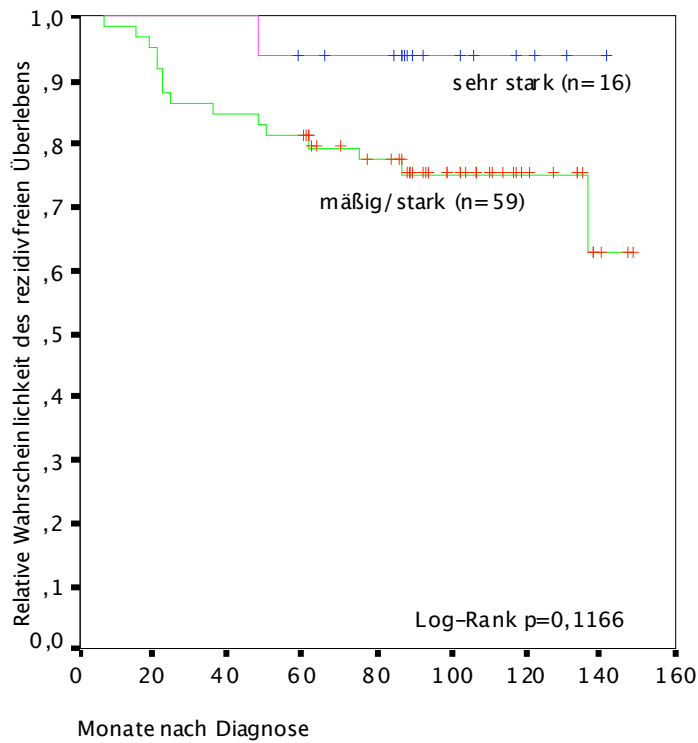


Abbildung 38: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der ERβ Expression im Subkollektiv der regulären Tamoxifeneinnahme

3.13 Kombinationen aus Cyclin D1, p27 und ERβ

Verschiedene Kombinationen der Expressionsmuster von Cyclin D1, p27 und ERβ wurden im Hinblick auf das GÜ und RFÜ, sowie auf das Ansprechen auf die Tamoxifentherapie untersucht. Dabei ergab sich keine Kombination, die den Krankheitsverlauf oder das Überleben im Gesamtkollektiv signifikant beeinflusste (Tabelle 8). Jedoch zeigte sich in der Subgruppe mit regulärer Tamoxifeneinnahme ein Nachteil im RFÜ ($p=0,0181$) für Fälle mit niedrig bis mäßiger ERβ Expression kombiniert mit positivem Cyclin D1 Status (Tabelle 9 und Abbildung 39).

Tabelle 8: Unterschiedliche Markerkombinationen und Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben im Gesamtkollektiv

Ak-Kombination	Gesamtüberleben				Rezidivfreies Überleben			
	n	5-JÜR	95%-KI	p-Wert	n	5-JÜR	95%-KI	p-Wert
CD1/p27 Expression	141			ns	141			ns
p27/ERβ Expression	142			ns	142			ns
CD1/ERβ Expression	141			ns	141			ns

Ak: Antikörper; CD1: Cyclin D1; 5-JÜR: 5-Jahresüberlebensrate;
95%-KI: 95%-Konfidenzintervall; ns: nicht signifikant

Tabelle 9: Unterschiedliche Markerkombinationen und Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben im Subkollektiv der regulären Tamoxifeneinnahme

Ak-Kombination	Gesamtüberleben				Rezidivfreies Überleben			
	n	5-JÜR	95%-KI	p-Wert	n	5-JÜR	95%-KI	p-Wert
CD1/p27 Expression	74			ns	74			ns
p27/ERβ Expression	75			ns	75			ns
CD1/ERβ Expression	74			ns	75			0,0181
CD1 positiv/ERβ niedrig bis mäßig	23	87	0,7292-1,01		23	74	0,5559-0,9223	
übrige Kombinationen	51	96	0,9064-1,0152		51	88	0,7922-0,9726	

Ak: Antikörper; CD1: Cyclin D1; 5-JÜR: 5-Jahresüberlebensrate in Prozent;
95%-KI: 95%-Konfidenzintervall; ns: nicht signifikant

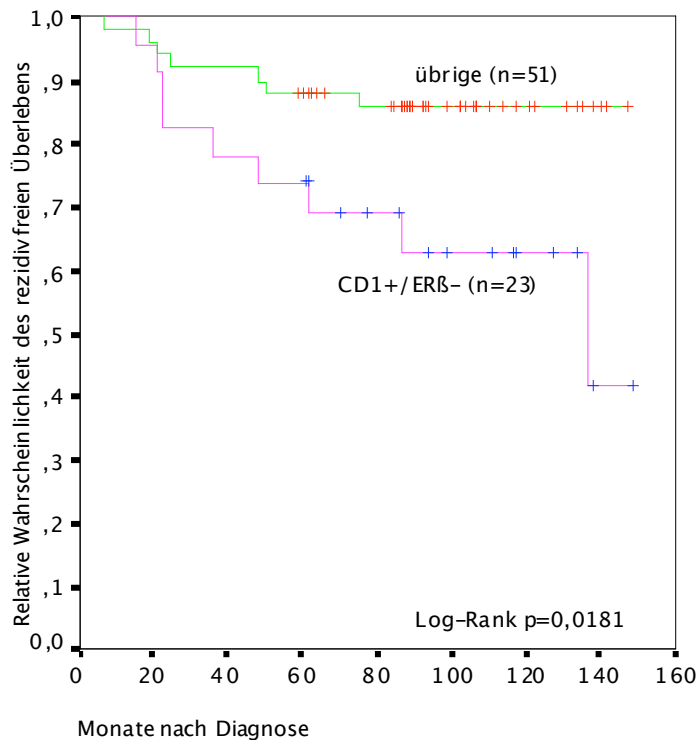


Abbildung 39: Kaplan-Meier-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Expressionskombination aus Cyclin D1 und ERβ

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und p27 sowie des Östrogenrezeptors β immunhistochemisch an 143 Fällen von archivierten, formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Mammakarzinomen untersucht. 52% der Patientinnen hatten Tamoxifen als adjuvante, endokrine Therapie über einen Zeitraum von mindestens 5 Jahren eingenommen oder erlitten unter der Therapie mit Tamoxifen einen Progress des Mammakarzinoms. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen wurden auf eine mögliche Korrelation mit dem Ansprechen auf Tamoxifen sowie mit anderen klinischen und pathologischen Parametern getestet. Zudem wurden klinische Verlaufsdaten der Patientinnen in Bezug auf das Mammakarzinom erhoben, um Cyclin D1, p27 und ER β auf ihre prognostische und prädiktive Relevanz hin zu untersuchen.

4.1 Klinische und histologische Daten als Prognosefaktoren

In Übereinstimmung mit den anerkannten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom der Konsensuskonferenz von St. Gallen (Goldhirsch et al. 2009) und der bestehenden Literatur erwiesen sich in dem hier untersuchten Patientinnenkollektiv der Differenzierungsgrad (Henson et al. 1991), die Tumorgröße (Carter et al. 1989), der Lymphknotenstatus (Carter et al. 1989), die Wachstumsfraktion (Brown et al. 1996; Molino et al. 1997; Viale et al. 2008), der Her2-Status (Yamauchi et al. 2001; Ross et al. 2003) und eine starke Progesteronrezeptorpositivität (Ferno et al. 2000) als signifikante Prognosefaktoren. Da es sich bei dem hier untersuchten Kollektiv um Mammakarzinompatientinnen mit adjuvanter endokriner Therapie handelt, ist der signifikante Einfluss der starken Progesteronrezeptorpositivität auf das outcome vordergründig im Rahmen seiner etablierten prädiktiven Funktion zu werten.

4.2 Untersuchung der Zellzyklusregulatoren

4.2.1 Cyclin D1

4.2.1.1 Cyclin D1 Expression beim Mammakarzinom

Alterationen von unterschiedlichen Komponenten des Zellzyklus wie Zyklinen, CDKs oder inhibitorischen Proteinen spielen eine wichtige Rolle in Malignomen verschiedener Gewebetypen (Hunter and Pines 1994). Dabei zählt die Überexpression von Cyclin D1 zu den häufigsten Alterationen in Karzinomen des Menschen. Untersuchungen an Tumorgewebe verschiedenen Ursprungs zeigten, dass im Kolonkarzinom (Bartkova et al. 1995), im Harnblasenkarzinom (Yang et al. 2002), in Karzinomen der Lunge (Yamanouchi et al. 2001), im Ösophaguskarzinom (Jiang et al. 1993) und im hepatozellulären Karzinom (Zhang et al. 1993) verglichen mit dem jeweiligen normalen, gutartig proliferativen oder präinvasiven Gewebe Cyclin D1 vermehrt exprimiert war. In Mammakarzinomgewebe wurde eine erhöhte Cyclin D1 Expression in 23-81% und durchschnittlich in 51% der untersuchten Fälle nachgewiesen (Buckley et al. 1993; Bartkova et al. 1994; Gillett et al. 1994; Zukerberg et al. 1995; Michalides et al. 1996; Barbareschi et al. 2000).

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 141 Fälle auf eine Cyclin D1 Expression untersucht. Davon waren 66% Cyclin D1 negativ und 34% Cyclin D1 positiv. Ausschließlich eindeutig positive Zellkerne wurden ausgewertet. Der hier ermittelte Anteil Cyclin D1 positiver Zellen steht mit anderen Studien in Einklang (Gillett et al. 1994; Zukerberg et al. 1995; Gillett et al. 1996; Michalides et al. 1996; Umekita et al. 2002). Einige Arbeitsgruppen fanden einen deutlich

höheren Anteil an Cyclin D1 positiven Zellen (Zhang et al. 1994; Pelosio et al. 1996; van Diest et al. 1997; Bilalovic et al. 2005). In der bisher zweitgrößten Studie an 512 Mammakarzinomen war die Fraktion Cyclin D1 positiver Fälle niedriger (Barbareschi et al. 2000) (Tabelle 10). Die uneinheitliche mikroskopische Klassifikation in den verschiedenen Studien liefert eine Erklärungsmöglichkeit für diese unterschiedlichen Ergebnisse und schränkt gleichzeitig die Vergleichbarkeit ein. So nutzten einige Arbeitsgruppen die nukleäre Färbeintensität (Gillett et al. 1994; Pelosio et al. 1996), um das Maß der Cyclin D1 Expression zu beschreiben, während andere den Anteil gefärbter Zellkerne ungeachtet der jeweiligen Färbeintensität gebrauchten (Bartkova et al. 1994; van Diest et al. 1997). Zusätzlich besteht kein einheitlicher Gebrauch eines Grenzwertes zur Klassifikation einer Cyclin D1 Überexpression bzw. einer negativen, schwachen oder starken Cyclin D1 Expression. In der vorliegenden Studie wurde sowohl die Intensität der nukleären Cyclin D1 Färbung, als auch der prozentuale Anteil gefärbter Zellkerne der jeweiligen Färbeintensität bestimmt. Dies ermöglichte eine Beschreibung der Cyclin D1 Expressionsstärke als Fraktion angefarbter Zellkerne, als nukleäre Färbeintensität oder unter Berechnung des histochemischen Scores als eine Kombination aus den beiden genannten Komponenten. In Bezug auf den Anteil gefärbter Zellkerne wurde als Grenzwert für eine positive Cyclin D1 Expression in Einklang mit der zum Zeitpunkt der Auswertung vorliegenden umfangreichsten Studie jegliche Kernfärbung gewählt (Barbareschi et al. 2000). Dieser Grenzwert wurde auch von anderen Arbeitsgruppen angewandt (Zhang et al. 1994; Zukerberg et al. 1995; Pelosio et al. 1996; Barbareschi et al. 2000; Umekita et al. 2002). In drei Studien wurde die Grenze bei 5% positiver Zellkerne gezogen (Michalides et al. 1996; van Diest et al. 1997; Hwang et al. 2003), in drei weiteren bei 10% (Bartkova et al. 1994; Bilalovic et al. 2005; Lee et al. 2007). Eine Arbeitsgruppe wählte einen Grenzwert von 50% angefarbter Zellkerne (Oyama et al. 1998). Hinzu kommt, dass der Vergleich der verschiedenen Studien durch die Anwendung unterschiedlicher Anti-Cyclin D1 Antikörper erschwert wird. In dieser Studie wurde der monoklonale Anti-Cyclin D1 Antikörper des Klons DCS-6 verwendet, der spezifisch ist für Cyclin D1 und nicht an seine Verwandten Cyclin D2 und Cyclin D3 bindet. In einer vergleichenden Untersuchung verschiedener Anti-Cyclin D1 Antikörper für die Immunhistochemie erzielte er die besten Ergebnisse (Gillett et al. 1994). So wurde er in mehr als der Hälfte der Studien zur immunhistochemischen Bestimmung der Cyclin D1 Expression in Mammakarzinomgewebe verwendet (Tabelle 10). Andere Arbeitsgruppen setzten polyklonale Antikörper (Zhang et al. 1994; Zukerberg et al. 1995; Michalides et al. 1996; van Diest et al. 1997) oder monoklonale Antikörper eines anderen Klons ein (Bilalovic et al. 2005; Lee et al. 2007).

Die Häufigkeit der Cyclin D1 Überexpression in Mammakarzinomgewebe erhärtet gemeinsam mit Erkenntnissen aus Zellkulturexperimenten (Musgrove et al. 1994) und Versuchen an Mäusen (Wang et al. 1994) die Vermutung einer wesentlichen Rolle von Cyclin D1 in der Entstehung und der Progression des Mammakarzinoms.

Mögliche ursächliche Mechanismen für eine Cyclin D1 Überexpression stellen chromosomale Translokationen, Genamplifikationen sowie transkriptionale und post-transkriptionale Dysregulationen dar. Eine Inversion auf Chromosom 11 in Adenomen der Nebenschilddrüse führte zur Entdeckung des Cyclin D1 Genlocus, der durch diese Neuordnung aktiviert wird (Motokura et al. 1991). In ca. 70% aller Mantelzelllymphome ist die chromosomale Translokation t11;14(q13;q32) für eine konsekutive Cyclin D1 Überexpression verantwortlich (Williams et al. 1993). Dieselbe Translokation wurde in 15-20% multipler Myelome gefunden (Bergsagel and Kuehl 2003). Eine weitere mögliche Ursache für eine Überexpression von Cyclin D1 besteht in der Genamplifikation. Tatsächlich wird eine Vielfalt von Karzinomen mit einer Amplifikation von 11q13 assoziiert, darunter nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches, Pankreaskarzinome, Ösophaguskarzinome und auch das Mammakarzinom (Jiang et al. 1993; Bartkova et al. 1995; Gansauge et al. 1997; Barnes and Gillett 1998; Yamanouchi et al. 2001). Die relative Häufigkeit der Proteinüberexpression von Cyclin D1 übersteigt jedoch die der entsprechenden Genamplifikation (Gillett et al. 1994). Im Falle des Mammakarzinoms werden Genamplifikationen in 13-20% der Tumore beobachtet, während eine Überexpression von Cyclin D1 in durchschnittlich 51% vorliegt. Ähnlich verhält es sich beispielsweise beim Kolonkarzinom und beim Sarkom (Bartkova et al. 1995). Dies legt nahe, dass zusätzliche Mechanismen auf transkriptionaler, translationaler oder posttranslationaler Ebene involviert sein müssen. Da die Cyclin D1 Proteinsynthese durch Steroide und Wachstumsfaktoren via Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) induziert wird (Musgrove et al. 1993), ist eine Deregulation der RTKs, insbesondere der erbB-Familie, oder derer Signalwege eine mögliche Ursache für eine Cyclin D1 Überexpression (Caldon et al. 2006). Sowohl der RAS/RAF/MAPK-Signalweg als auch der RAS/PI3K/AKT-Signalweg werden durch RTKs aktiviert und führen zu gesteigerter Cyclin D1 Transkription bzw. erhöhter Stabilität des Cyclin D1 Proteins. Tatsächlich zeigten durch die Onkogene Ras und Neu/erbB2 erzeugte Mammakarzinome in Mäusen eine erhöhte Cyclin D1 Expression, während Cyclin D1 defiziente Mäuse gegenüber einer Ras- oder ErbB2-induzierten Tumorgenese resistent waren (Yu et al. 2001). Jedoch ist die Beziehung zwischen Cyclin D1 Überexpression und erbB2 Amplifikation im Mammakarzinom des Menschen noch unklar (Arnold and Papanikolaou 2005). Ein weiterer Weg, der zu einer Cyclin D1 Akku-

mulation führen kann, besteht in einer Steigerung der Stabilität und einem verminderten Abbau des Cyclin D1 Proteins. Denkbar wäre eine verminderte Aktivität der Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β), die mittels Phosphorylierung von Cyclin D1 dessen Export aus dem Zellkern und damit dessen Proteolyse fördert. Da GSK3 β durch die Protein Kinase B via Phosphorylierung in seiner Aktivität gehemmt wird, besteht auch hier eine Verbindung zwischen der Stabilität des Cyclin D1 Proteins und den mitogenen Signalwegen (Alao 2007). Ebenso könnte eine deregulierte Ubiquitinierung zu erhöhter Cyclin D1 Stabilität führen. Das F-box Protein FBX4 wurde als Mediator der Cyclin D1 Ubiquitinierung identifiziert (Lin et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass FBX4 in Kombination mit α B Crystallin zu einem schnellen ubiquitin-abhängigen Abbau von Cyclin D1 führt und ein Fehlen einer dieser beiden Komponenten zu einer erhöhten Stabilität und Akkumulation von Cyclin D1 führt. Untersuchungen an menschlichen Tumorzelllinien mit hoher Cyclin D1 Expression ergaben keine Expression von α B Crystallin. In Mammkarzinomzelllinien führte eine exogene α B Crystallin Expression zu einer Wiederherstellung des schnellen Cyclin D1 Abbaus. Somit könnten FBX4 und/oder α B Crystallin eine Rolle in der Cyclin D1 Akkumulation in einigen Tumorgeweben spielen. In vitro Versuche demonstrierten, dass die Expression einer Cyclin D1 Mutation, die aufgrund ausbleibender Phosphorylierung durch GSK3 β nicht aus dem Zellkern exportiert werden kann, unabhängig von anderen Onkogenen Zelltransformation und Tumorwachstum fördert (Alt et al. 2000). Dieser Sachverhalt deutet auf eine entscheidende Rolle der subzellulären Lokalisation von Cyclin D1 für dessen Funktion in der Karzinogenese hin.

Tabelle 10: Cyclin D1 Expression im

Autoren	n Ak	Grenzwert und Einteilung	Cyclin D1 Expression: n (%)
Gillett et al., 1994	63 DCS-6	schwach; moderat; stark; sehr stark*	36 (57); 8 (13); 11 (17); 8 (13)
Bartkova et al., 1994	167 DCS-6	0-10% vs. 10-50%; >50%	71 (42); 50 (30); 46 (28)
Zhang et al., 1994	43 pAK	negativ vs. moderat; intensiv*	8 (19); 35 (81)
Bartkova et al., 1995	83 DCS-6	schwach; moderat; stark*	37 (44); 24 (29); 22 (27)
Zukerberg et al., 1995	48 pAK	definitive' nukleäre Anfärbung	31 (65); 17 (35)
Gillett et al., 1996	187 DCS-6	negativ; schwach vs. moderat/stark*	74 (40); 32 (17); 81 (43)
Michalides et al., 1996	248 pAK	negativ; <5% vs. 5-50%; 50%	163 (66); 85 (34)
Peloso et al., 1996	167 DCS-6	negativ vs. schwach/moderat; stark*	50 (30); 55 (33); 49 (29); 13 (8)
Gillett et al., 1996	158 DCS-6	negativ; schwach vs. moderat/stark*	23 (15); 33 (21); 102 (64)
van Diest et al; 1997	148 pAK	<5% vs. \geq 5%	61 (41); 87 (59)
Barbareschi et al., 1997	60 DCS-6	negativ; schwach vs. moderat; stark*	36 (60); 24 (40)
Oyama et al; 1998	27 mAK(5D4); pAK(Ab19)	<50%; \geq 50%	mAK: 7 (26); 20 (74); pAK:5 (19); 22 (81)
Kenny et al.; 1999	253 mRNA	niedrig vs. hoch (definiert durch Median)	126 (50); 127 (50)
Leong et al.; 2000	148 DCS-6	negativ; schwach vs. moderat; stark*	39 (26); 37 (25); 44 (30); 28 (19)
Barbareschi et al., 2000	512 DCS-6	negativ/positiv	393 (77); 119 (23)
Umekita et al; 2002	173 DCS-6	negativ/positiv	100 (58); 73 (42)
Han et al.; 2003	66	negativ/positiv	20 (30); 46 (70)
Hwang et al., 2003	175 DCS-6	<5% vs. 5-25%; 25-50%; >50%	57 (33); 118 (67)
Stendahl et al.; 2004	167 DCS-6	negativ; schwach; moderat vs. stark*	1 (1); 9 (5); 98 (59); 59 (35)
Jirström et al.; 2005	463 DCS-6	negativ; schwach; moderat vs. stark*	unbekannt
Bilalovic et al; 2005	48 mAK (P2D11F11)	<10% vs. 10-50%; 50-100%	13 (27); 21 (44); 14 (29)
Lee et al.; 2007	327 mAK (P2D11F11)	0; 1-5%; 6-10% vs. 11-25%; 26-50%; 51-100%	118 (36); 209 (64)
Rudas et al.; 2008	253 mAK (SP4)	\leq 10% vs. >10%	113 (45); 140 (55)
Rudas et al.; 2008	948 mAK (SP4)	\leq 10% vs. >10%	379 (40); 569 (60)

*nukleäre Färbintensität; **bei Cyclin D1 Überexpression; n: Fallzahl; Ak: Antikörper; nb: nicht bestimmt; ns: nicht signifikant; vs: versus; prämeno: prämenopausal; GÜ: Gesamtüberleben; RFÜ: (rezidivfreies Überleben); mAK: monoklonaler Antikörper; pAK: polyklonaler Antikörper; sub: Subgruppenanalyse; Primär-Ca: primäres Mammakarzinom; Rez: Rezidiv; Knochenmet: Knochenmetastase; M1: Fernmetastasen; adj: adjuvant; postmeno: postmenopausal; HR-positiv: Hormon-Rezeptor positiv

4.2.1.2 Cyclin D1 Expression und klinische und pathologische Parameter

Die vorliegende Studie ergab eine Assoziation zwischen der Cyclin D1 Expression und einem schlechteren Differenzierungsgrad ($p=0,002$; Tabelle 4). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer umfangreichen Studie an 1348 Mammakarzinomen, welche zeigte, dass eine starke Cyclin D1 Expression in ER α -positiven Fällen mit schlechter Differenzierung assoziiert ist ($p<0,0005$). Gleichzeitig wurde dort gezeigt, dass eine starke Cyclin D1 Expression in ER α -negativen Fällen mit guter Differenzierung des Tumorgewebes einhergeht ($p=0,05$) (Aaltonen et al. 2008). Dieser Sachverhalt liefert eine mögliche Erklärung für gegenteilige Ergebnisse mancher Studien, welche eine inverse Korrelation der Cyclin D1 Expression mit dem Differenzierungsgrad ermittelten (Gillett et al. 1996; van Diest et al. 1997; Hwang et al. 2003). Letztere untersuchten nämlich unselektierte Kollektive invasiver Mammakarzinome und beinhalteten somit ER α -positive und ER α -negative Fälle, während ein Einschlusskriterium der vorliegenden Studie die Hormonrezeptorpositivität des Tumorgewebes war. Die meisten Studien zeigten eine Korrelation von starker Cyclin D1 Expression mit ER α -Positivität des Tumorgewebes (Zuckerberg et al. 1995; Gillett et al. 1996; Michalides et al. 1996; Pelosio et al. 1996; van Diest et al. 1997; Kenny et al. 1999; Barbareschi et al. 2000; Leong et al. 2000; Umekita et al. 2002; Hwang et al. 2003; Stendahl et al. 2004; Bilalovic et al. 2005; Jirstrom et al. 2005). Da die große Mehrheit der Patientinnen (98%) der vorliegenden Studie aufgrund des Einschlusskriteriums der Hormonrezeptorpositivität einen positiven ER α -Status aufwiesen, ist eine solche Korrelationsanalyse hinfällig. Die Untersuchung eines Zusammenhangs der Expressionsstärken der beiden Parameter ergab jedoch, dass ein positiver Cyclin D1 Status signifikant ($p=0,017$) mit einer hohen ER α Expression (Grenzwert 80%) assoziiert ist (Tabelle 4). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den gängigen Modellen, die von einer starken Interaktion und Interdependenz dieser beiden molekularen Marker ausgehen. Zum einen induziert der mit Östrogen gebundene ER α die Transkription des Cyclin D1 Gens über ein cAMP-responsives Element und AP-1 (Liu et al. 2002), zum anderen kann Cyclin D1 ER α in Abwesenheit eines Liganden transaktivieren und als eine Art Brücke zwischen ER α und dessen Koaktivatoren fungieren (Neuman et al. 1997; Zwijsen et al. 1997; Zwijsen et al. 1998). Die vorliegende Studie zeigte außerdem eine Assoziation zwischen positivem Cyclin D1 Status und starker p27 Expression ($p=0,021$) (Tabelle 4). Dies steht in Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen der Expression dieser beiden Zellzyklusregulatoren im Mammakarzinomgewebe ermittelten (Fredersdorf et al. 1997; Gillett et al. 1999; Barbareschi et al. 2000). Eine Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass überexprimiertes Cyclin D1 die Expression von p27 induziert (Han et al. 1996). Eine weitere mögliche Ursache könnte in Überschneidungen der

könnte in Überschneidungen der Proteindegradationswege liegen, da sowohl Cyclin D1 als auch p27 via Ubiquitinierung und durch Proteasomen abgebaut werden (Diehl 2002; Caldon et al. 2006). Auch Alterationen in den Signalwegen, die die subzelluläre Lokalisation der Zellzyklusregulatoren steuern, könnten zu einer nukleären Akkumulation beider Marker führen. So wie die vorliegende Studie konnte keine der in Tabelle 11 aufgeführten Studien eine signifikante Korrelation der Cyclin D1 Expression mit dem Proliferationsmarker Ki 67 feststellen. Auch Messungen der Proliferation mithilfe der Durchflusszytometrie ergaben keinen Zusammenhang mit Cyclin D1 Färbungen (Barnes and Gillett 1998). Dieser Sachverhalt stellt die CDK-abhängige proliferationsfördernde Funktion von Cyclin D1 als Effektorweg seines onkogenen Potentials in Frage und lässt insbesondere in Anbetracht der starken Korrelation mit ER α die modulatorische Funktion von Cyclin D1 auf ER α an Bedeutung gewinnen.

4.2.1.3 Cyclin D1 als Prognosefaktor

Unterschiedliche Studien brachten eine CCND1 Genamplifikation im Mammakarzinomgewebe in Zusammenhang mit kürzerer Rezidivfreiheit und schlechter Prognose, insbesondere in ER α -positiven Fällen (Dickson et al. 1995; Michalides et al. 1996; Seshadri et al. 1996; Bieche et al. 2002). Auch auf mRNA-Niveau konnte an einem ER α -positiven Kollektiv eine Korrelation von Cyclin D1 Überexpression mit schlechter Prognose festgestellt werden (Kenny et al. 1999). Das Cyclin D1 Protein wird im Mammakarzinom und in anderen Malignomen häufig überexprimiert.

In dieser Studie untersuchten wir daher die Hypothese, dass eine hohe Cyclin D1 Expression im hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Unsere Ergebnisse bestätigten diese Hypothese und zeigten in univariater Analyse eine signifikante Korrelation zwischen hoher Färbeintensität für Cyclin D1 und kürzerem Gesamtüberleben ($p=0,0211$) und kürzerem rezidivfreien Überleben ($p<0,0001$). Bei der Betrachtung jeglicher Kernfärbung für Cyclin D1 ohne Berücksichtigung der Färbeintensität zeigte sich in der Überlebensanalyse ein Trend zu einem besseren Krankheitsverlauf bei negativem Cyclin D1 Status. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der bisher umfangreichsten Studie zu diesem Thema. Rudas et al. untersuchten die Cyclin D1 Expression mittels Immunhistochemie an Patientinnenkollektiven aus dem ABCSG-Trial 05 und 06. Diese schlossen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie 253 prä- und 948 postmenopausale hormonrezeptorpositive Mammakarzinompatientinnen ein, welche für einen Zeitraum von 5 Jahren Tamoxifen einnahmen. Der Anteil prämenopausaler Patientinnen erhielt zusätzlich Goserelin, während ein Teil der postmenopausalen Patientinnen im Rahmen des randomisierten und doppelblinden ABCSG-Trials 06 zusätzlich

zu Tamoxifen Aminoglutethimid einnahmen. Mittels Cox-Regression konnte in multivariater Analyse sowohl in der prä-, als auch in der postmenopausalen Kohorte ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben (prämenopausal: $p=0,001$, postmenopausal: $0,005$) und Gesamtüberleben (prämenopausal: $p=0,03$, postmenopausal: $p<0,0001$) bei einer medianen Nachbeobachtungsdauer von 11 Jahren bei Cyclin D1 Überexpression gezeigt werden (Rudas et al. 2008). Durch die Verabreichung von Tamoxifen konnte jedoch wie in der vorliegenden Studie keine Trennung des prognostischen Wertes vom prädiktiven Wert von Cyclin D1 erfolgen. Andere, weniger umfangreiche Studien kamen zu gegenteiligen Ergebnissen. In ihren Kollektiven war eine Cyclin D1 Überexpression mit längerer Rezidivfreiheit und/oder längerem Gesamtüberleben assoziiert (Gillett et al. 1996; Pelosio et al. 1996; Bilalovic et al. 2005) (Tabelle 11). Diese Resultate konnten durch die vorliegende Studie nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse der zuletzt genannten Studien waren angesichts des erwarteten onkogenen Potentials von Cyclin D1 aufgrund von sowohl *in vitro* und *in vivo* Versuchen als auch von klinischen Studien in Bezug auf die Cyclin D1 Genamplifikation überraschend. Auch vor dem Hintergrund der progressionsfördernden Rolle von Cyclin D1 im Zellzyklus und seiner transaktivierenden Funktion auf ER α waren diese Ergebnisse schwer nachvollziehbar. Interessanterweise fanden zwei der genannten Studien eine inverse Korrelation der Cyclin D1 Expression mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (Gillett et al. 1996; Bilalovic et al. 2005) und in allen drei aufgeführten Arbeiten war die Cyclin D1 Expression signifikant mit ER α -Positivität assoziiert. Da sowohl ein niedriger Differenzierungsgrad als auch ER α -Positivität mit einer besseren Prognose einhergehen, könnte dieser Zusammenhang eine Rolle in dem besseren Krankheitsverlauf bei hoher Cyclin D1 Expression in den genannten Studien gespielt haben. Die im Verhältnis dazu abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Studie können auch in der Art der Patientinnenselektion begründet liegen. Während zwei der erwähnten Studien an unselektierten Kollektiven invasiver Mammakarzinome und die dritte an einem nodalpositiven Patientinnengut durchgeführt wurden und in allen drei Fällen vollkommen unterschiedliche bzw. keine adjuvanten Therapien angewendet wurden, untersuchte die vorliegende Studie die Expression von Cyclin D1 an einem ausschließlich hormonrezeptorpositiven Patientinnenkollektiv, das eine adjuvante endokrine Therapie und keine Chemotherapie erhielt. Somit ist der prognostische Wert der Ergebnisse der vorliegenden Studie zumindest zum Teil – nicht alle Patientinnen nahmen das Tamoxifen fünf Jahre lang ein – durch die prädiktive Bedeutung in Bezug auf Tamoxifen überlagert.

Tabelle 11: Cyclin D1 Expression und Prognose bzw. Prädiktion beim Mammakarzinom

Autoren	Patientinnen	n	Prognose (p-Wert)	Therapie
Gillett et al., 1994	unselektiert	63	nb	unselektiert
Bartkova et al., 1994	unselektiert	167	nb	unselektiert
Zhang et al., 1994	unselektiert	43	nb	unselektiert
Bartkova et al., 1995	unselektiert	83	nb	unselektiert
Zukerberg et al.; 1995	unselektiert	48	nb	unselektiert
Gillett et al.; 1996	M1 o. Rez.	158	längeres GÜ (0,001)**	Tamoxifen
Gillett et al.; 1996	unselektiert	187	längeres RFÜ (0,007) und GÜ (0,0029)**	unselektiert
Michalides et al.; 1996	unselektiert	248	ns	unselektiert
Peloso et al., 1996	nodalpositiv	167	längeres RFÜ (0,004)**	CMF o. Tam
van Diest et al.; 1997	unselektiert	148	ns	keine adj. Therapie
Barbareschi et al., 1997	unselektiert	60	nb	unselektiert
Oyama et al.; 1998	lobulär	27	nb	unselektiert
Kenny et al.; 1999	unselektiert	253	ns	unselektiert
	sub: ERa positiv	182	höheres Rezidiv- (0,0016) und Sterberisiko (0,025)**	unselektiert
	sub: ERa positiv, Tam	23	kürzere Ansprechdauer auf Tam (0,04)**	Tamoxifen
Leong et al.; 2000	GI duktal	148	ns	unselektiert
Barbareschi et al., 2000	unselektiert	512	ns	unselektiert
Umekita et al.; 2002	unselektiert	173	ns	unselektiert
	sub: ERa negativ	75	kürzeres GÜ (0,018) und RFÜ (0,014)**	unselektiert
Han et al.; 2003	ERa positiv, Knochenmet.	66	ns; Tendenz zu besserer Tam-Responsivität**	Tamoxifen
Hwang et al., 2003	unselektiert	175	ns; Tendenz zu längerem GÜ**	unselektiert
Stendahl et al.; 2004	postmeno., >55 Jahre	167	ns	rand.: Tam vs. keine adj. Th.
	sub. ERa positiv, Cyclin D1 niedrig		ns; Tendenz zu längerem GÜ unter Tam	rand.: Tam vs. keine adj. Th.
	sub. ERa>90%, Cyclin D1 niedrig	101	längeres GÜ (0,0211) bei Tam-Therapie	rand.: Tam vs. keine adj. Th.
	sub. keine adj. Therapie	89	ns	keine adj. Therapie
	sub. keine adj. Therapie, ERa>90%	50	längeres GÜ (0,0265)**	keine adj. Therapie
Jirström et al.; 2005	prämeno., stage II	463	ns	Tam vs. kein Tam
	sub: ERa positiv, Cyclin D1 niedrig	269	längeres RFÜ (0,004) bei Tam-Therapie	Tam vs. kein Tam
	sub: ERa positiv, CCND1 nicht amplifiziert	151	längeres RFÜ (<0,0001) und GÜ (0,004) bei Tam-Therapie	Tam vs. kein Tam
Bilalovic et al.; 2005	unselektiert	48	längeres RFÜ (0,037) und GÜ (0,014)**	unselektiert
Lee et al.; 2007	unselektiert	327	ns	unselektiert
Rudas et al.; 2008	prämeno., HR-positiv, stage I or II	253	kürzeres RFÜ (0,001) und GÜ (0,03)**	Tamoxifen und Goserelin
Rudas et al.; 2008	postmeno., HR-positiv, early stage	948	kürzeres RFÜ (0,005) und GÜ (<0,0001)**	rand.: Tam vs. Tam + Aminogl.

**bei Cyclin D1 Überexpression; n: Fallzahl; nb: nicht bestimmt; ns: nicht signifikant; sub: Subgruppenanalyse; G: Differenzierungsgrad; inv: invers; Rez: Rezidiv; postmeno: postmenopausal; prämeno: prämenopausal; vs: versus; GÜ: Gesamtüberleben; RFÜ: (rezidivfreies Überleben); Th.: Therapie; rand.: randomisiert; CMF: Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil Chemotherapie; Tam: Tamoxifen; adj: adjuvant; Aminogl: Aminoglutethimid; M1: Fernmetastasen;

4.2.1.4 Cyclin D1 als prädiktiver Faktor für Tamoxifen

Neben seiner potentiellen ungünstigen prognostischen Rolle scheint Cyclin D1 einen wesentlichen Einfluss auf das ER α -vermittelte Ansprechen auf antiöstrogene Therapien zu haben. Unterschiedliche Studien belegen wiederholt die enge Korrelation zwischen der Expression von ER α und Cyclin D1 im Mammakarzinom (Tabelle 10). Die Entdeckung einer CDK-unabhängigen Funktion von Cyclin D1, die in der Ligand-unabhängigen Potenzierung der transkriptionellen Aktivität von ER α besteht, führte zu der Hypothese, dass Cyclin D1 über diesen Mechanismus die Wirksamkeit endokriner Therapien beeinflussen könnte (Zwijnen et al. 1997). Diese Vermutung wurde durch Versuche an Mammakarzinomzellen, die durch Antiöstrogene im Zellzyklus arretiert waren, erhärtet. Die Induktion einer Cyclin D1 Überexpression in diesen Zellen hob die Antiöstrogen-vermittelte Wachstumshemmung auf (Musgrove et al. 1994; Wilcken et al. 1997). Eine konstitutive Überexpression von Cyclin D1 in Mammakarzinomzelllinien ging mit akuter Resistenz gegenüber Antiöstrogenen einher (Hui et al. 2002). Es wurde allerdings auch über widersprüchliche Ergebnisse berichtet (Pacilio et al. 1998).

In der vorliegenden Studie sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass die Cyclin D1 Expression in hormonrezeptorpositivem Mammakarzinomgewebe mit einer beeinträchtigten Tamoxifenresponsivität einhergeht. Für diese Untersuchung kamen lediglich 74 von 143 Fällen (52%) in Frage, da nur dieser Anteil des Gesamtkollektivs bei Abschluss der Studie die fünfjäh-

rige Tamoxifeneinnahme eingehalten hatte beziehungsweise ein Rezidiv unter Tamoxifen erlitt. In der univariaten Korrelationsanalyse zwischen Cyclin D1 Expression und Tamoxifenresponsivität mittels Chi-Quadrat-Test ließ sich kein signifikanter Zusammenhang ermitteln ($p=0,059$) (Tabelle 4). Die Überlebensanalyse dieses Subkollektivs zeigte eine signifikante Korrelation ($p=0,0059$) hoher Cyclin D1 Färbeintensität mit kürzerem rezidivfreiem Überleben (Abbildung 26) und einen deutlichen Trend zu kürzerem Gesamtüberleben bei hoher Färbeintensität für Cyclin D1 (Abbildung 25). Diese Ergebnisse sprechen für einen negativen prädiktiven Wert der Cyclin D1 Expression in Bezug auf eine Tamoxifentherapie. Dieses Resultat steht im Einklang mit drei anderen Studien, die eine Assoziation zwischen starker Cyclin D1 Expression und beeinträchtigtem Ansprechen auf Tamoxifen zeigten (Stendahl et al. 2004; Jirstrom et al. 2005; Rudas et al. 2008). Eine Arbeitsgruppe ermittelte gegenteilige Ergebnisse (Gillett et al. 1996), doch stammten diese aus einem Kollektiv von metastasierten primären Mammakarzinomen bzw. Mammakarzinomrezidiven. Zwei weitere Studien konnten keinen signifikanten Unterschied im Ansprechen auf die Tamoxifentherapie in Abhängigkeit von der Cyclin D1 Expression feststellen (Han et al. 2003; Hwang et al. 2003).

4.2.2 p27

4.2.2.1 p27 Expression beim Mammakarzinom

Während p27 in normalem Epithelgewebe von Brust, Prostata, Ovar, Haut, Mundschleimhaut, Ösophagus, Magen, Kolon und Lunge in hohen Konzentrationen exprimiert wird (Slingerland and Pagano 2000), wird sein Expressionsverlust in Karzinomen dieser Gewebearten häufig beobachtet. Da p27 Genalterationen selten sind, geht man davon aus, dass der Expressionsverlust in Karzinomen auf eine gesteigerte Proteolyse zurückzuführen ist. So wurde an Zelllysaten unterschiedlicher Tumorarten eine gesteigerte proteolytische Aktivität gegen p27 beobachtet (Alkarain and Slingerland 2004). Wie schon oben erwähnt spielt im Rahmen des proteolytischen Abbaus von p27 das F-Box Protein SKP2 (S-Phase Kinase-assoziiertes Protein 2) eine wesentliche Rolle. In verschiedenen Karzinomen beispielsweise des Kolons oder des Magens war eine reduzierte p27 Expression mit erhöhter SKP2 Konzentration assoziiert (Hershko et al. 2001; Masuda et al. 2002). Aber auch Alterationen anderer Komponenten des molekularen Degradationsapparates von p27 sind als ursächliche Mechanismen für die verminderte Expression in Karzinomen denkbar. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht in der zytoplasmatischen Mislokalisierung von p27, die dessen Wirkung auf nukleäre Cyclin-CDK-Komplexe verhindern würde. Tatsächlich wurde zytoplasmatisches p27 in nicht geringen Anteilen von Ovarial-, Schilddrüsen- und Kolonkarzinomen detektiert. Im Mammakarzinom fand sich eine zytoplasma-

tische Mislokalisierung von p27 in bis zu 40% untersuchter Fälle (Alkarain and Slingerland 2004)). Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist, wurde eine verminderte Expression von p27 in 19-86% aller untersuchten Mammakarzinome beobachtet (Tabelle 12). In Zusammenschau mit seiner inhibitorischen Funktion auf die Progression des Zellzyklus wurde eine Bedeutung als Tumorsuppressor postuliert.

In der vorliegenden Studie wurde die Expression von p27 an 142 Fällen bestimmt. Davon zeigten 51% eine schwache und 49% eine starke p27 Expression bei einem Grenzwert von 10% positiver Zellkerne. Dieser Grenzwert wurde im Rahmen der Analyse ermittelt, da der Median positiver Zellkerne bei 10% lag. Um einen Vergleich dieser Werte mit der aktuellen Studienlage zu ermöglichen, mußte der Grenzwert auf 50% positiver Zellen erhöht werden, da dieser Grenzwert von der Mehrheit der Arbeitsgruppen verwendet wurde. Bei einer derartigen Anpassung des Grenzwertes lag der Anteil niedriger p27 Expression in der vorliegenden Studie bei 83%, was mit den Ergebnissen einer weiteren Studie übereinstimmt (Volpi et al. 2000). Die Mehrheit der Arbeitsgruppen ermittelte jedoch einen deutlich geringeren Anteil von niedriger p27 Expression im Mammakarzinom (Catzavelos et al. 1997; Fredersdorf et al. 1997; Sgambato et al. 1997; Tan et al. 1997; Gillett et al. 1999; Reed et al. 1999; Tsuchiya et al. 1999; Chappuis et al. 2000; Leong et al. 2000; Leivonen et al. 2001; Pohl et al. 2003; Spataro et al. 2003; Ravaioli et al. 2008) (Tabelle 12). Die Variabilität in den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen mag in der unterschiedlichen Patientinnenselektion, der variablen Lagerungszeit der Tumorblöcke, den teilweise eher kleinen Studienpopulationen, in der Wahl verschiedener Antikörper und in Abweichungen im immunhistochemischen Färbeprozess begründet liegen (Tabelle 12). In dem Großteil der Studien wurde der prozentuale Anteil positiver Zellkerne unabhängig von der jeweiligen Färbeintensität zur Beschreibung der p27 Expressionsstärke verwendet. Lediglich zwei Arbeitsgruppen berücksichtigten die nukleäre Färbeintensität für p27 (Sgambato et al. 1997; Gillett et al. 1999). Die vorliegende Studie nutzte beide Komponenten zur Auswertung der Färbeergebnisse. Dabei erwies sich der prozentuale Anteil nukleärer Färbung als am ehesten geeignet, um Unterschiede im Krankheitsverlauf aufzudecken. Obwohl die meisten Studien einen Grenzwert von 50% zur Einteilung niedrig und hoch exprimierender Mammakarzinome in Bezug auf p27 wählten, wurde in der vorliegenden Studie die Grenze bei 10% positiver Zellkerne gezogen, da der Median positiver Zellen bei 10% lag. Auch in Studien über die p27 Expression in Prostatakarzinomen wurde mit 25% ein deutlich niedrigerer Grenzwert gewählt (Tsihlias et al. 1998; Yang et al. 1998). Wie auch die vorliegende Studie verwendete die Mehrheit der Arbeitsgruppen den monoklonalen p27 Antikörper des Klons 57 (Tabelle 12).

Tabelle 12: p27 Expression im Mammakarzinom

Autoren	n Ak (Klon)	Grenzwert (%)	p27-Expression n (%)
Tan et al.; 1997	202 mAB (57)	<50%; ≥50%	100 (50); 102 (50)
Catzavelos et al.; 1997	168 mAB (57)	<50%; ≥50%	94(56); 74 (44)
Porter et al.; 1997	278 pAK	niedrig vs. mäßig; stark	175 (63); 103 (37)
Fredersdorf et al.; 1997	84 mAB (53G8)	negativ vs. positiv	31 (37) ;53 (63)
Sgambato et al.; 1997	52 pAK (C-19)	negativ; schwach vs. moderat; stark*	29 (56); 23 (44)
Wu et al.; 1999	181 mAB	<50%; ≥50%	(69); (31)
Tsuchiya et al.; 1999	102 mAB (57)	<50%; ≥50%	43 (42); 59 (58)
Chu et al.; 1999	169 mAB (57)	<5%; 5-30%; >30%	58 (34); 64 (38); 47 (28)
Han et al.; 1999	68 mAB (G173-524)	<20%; ≥20%	45 (66); 23 (34)
Gillett et al.; 1999	189 mAB (53G8)	quick score' 0-5 vs. 6-7	106 (56); 83 (44)
Reed et al.; 1999	77 mAB (57)	0; <25% vs. 25-75%; >75%	10 (13); 24 (31); 33 (43); 10 (13)
Barbareschi et al.; 2000	512 mAB (57)	<50%; ≥50%	338 (66); 174 (34)
Volpi et al.; 2000	286 mAB (57)	≤60%; >60%	218 (86); 36 (14)
Leong et al.; 2000	148 mAB (53G8)	quick score' 0-5 vs. 6-7	51 (33); 97 (67)
Chappuis et al.; 2000	174 mAB (57)	≤50%; >50%	110 (63); 64 (37)
Leivonen et al.; 2001	197 mAB (57)	≤50%; >50%	114 (58); 83 (42)
Spataro et al.; 2003	461 mAB (57)	<50%; ≥50%	201 (44); 260 (56)
Pohl et al.; 2003	512 mAB (57)	<50%; ≥50%	99 (19); 413 (81)
Ravaioli et al.; 2007	1057 mAB	<50%; ≥50%	875 (55); 723 (45)

*Färbeintensität; pT: Tumorgrösse; nodalpos.: nodalpositiv; N0: nodalnegativ; M0: keine Fernmetastasen; GI: gut differenziert; Ashk: Ashkenazi Jüdische Frauen; sub: Subgruppe; prämeno: prämenopausal; HR: Hormonrezeptor; mAK: monoklonaler Antikörper; pAK: polyklonaler Antikörper; vs: versus; unpub: nicht publiziert

4.2.2.2 p27 Expression und klinische und pathologische Parameter

Die überwiegende Zahl der Studien, die die Expression von p27 an Tumorgewebe der Mamma untersuchten, fanden eine Korrelation zwischen verminderter p27 Expression und höherem Differenzierungsgrad, negativem Östrogenrezeptorstatus und niedriger Cyclin D1 Expression (Catzavelos et al. 1997; Chu et al. 1999; Gillett et al. 1999; Barbareschi et al. 2000; Ravaioli et al. 2008). Einige zeigten auch einen Zusammenhang zwischen niedriger p27 Expression und erhöhtem Ki 67 oder hoher S-Phase Fraktion (Gillett et al. 1999; Leivonen et al. 2001; Spataro et al. 2003; Ravaioli et al. 2008). Diese Zusammenhänge unterstützen die Annahme einer Funktion von p27 in der Differenzierung und Proliferation von Geweben (Cariou et al. 1998). Desweiteren wurde eine Assoziation zwischen zunehmender Tumorgröße und niedriger p27 Expression ermittelt (Gillett et al. 1999; Chappuis et al. 2000; Leivonen et al. 2001; Ravaioli et al. 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen zum Teil mit diesen häufig ermittelten Korrelationen überein. In univariater Analyse zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher p27 Expression und einem positiven Cyclin D1 Status ($p=0,021$) und einem hohen IRS für $ER\alpha$ ($p=0,016$). Eine Korrelation mit dem Proliferationsmarker Ki 67 konnte nicht ermittelt werden. In der vorliegenden Studie ging eine hohe Expression von p27 häufig mit einer kleineren Tumorgröße einher. Dieser Zusammenhang erreichte jedoch keine Signifikanz ($p=0,051$) (Tabelle 6).

4.2.2.3 p27 als Prognosefaktor

p27 spielt eine Schlüsselrolle im Rahmen des Zellzyklusprogresses von der G1- in die S-Phase. Durch seine inhibierende Wirkung auf Cyclin E-CDK2-Komplexe ist es in der Lage, den Zellzyklus in der G1-Phase anzuhalten. Aufgrund dieser Funktion wurden tumorsuppressive Eigenschaften von p27 postuliert, und dessen Expressionsstärke in Tumorgewebe als potentieller prognostischer Faktor in Erwägung gezogen. Tatsächlich zeigten Untersuchungen an Karzinomen unterschiedlicher Gewebetypen, dass die Expressionsstärke von p27 mit dem Krankheitsverlauf assoziiert war. So erwies sich eine Unterexpression von p27 im Rahmen multivariater Analysen als unabhängiger prognostischer Marker in primären Karzinomen der Brust, der Lunge, des Kolons, der Prostata, in Lymphomen, Gliomen und Melanomen (Slingerland and Pagano 2000). In Bezug auf das Mammakarzinom stellte sich eine verminderte Expression von p27 in unterschiedlichen Studien nach multivariater Analyse als unabhängiger ungünstiger prognostischer Faktor dar (Catzavelos et al. 1997; Porter et al. 1997; Tan et al. 1997; Chu et al. 1999; Tsuchiya et al. 1999; Wu et al. 1999; Chappuis et al. 2000). Während die meisten dieser Arbeiten ihre Untersuchungen an unselektierten Patientinnenkollektiven durchführten, konzentrierte sich eine Arbeitsgruppe ausschließlich auf Tumore, dessen Durchmesser einen Zentimeter nicht überschritten hatte (Tan et al. 1997). In einer weiteren Arbeit wurden lediglich nodalpositive Fälle einbezogen (Tsuchiya et al. 1999) und eine Arbeitsgruppe berücksichtigte ausschließlich Patientinnen, die jünger als 45 Jahre waren (Porter et al. 1997) (Tabelle 13). Allerdings blieb die prognostische Bedeutung von p27 im Mammakarzinom aufgrund von widersprüchlichen Studienergebnissen umstritten. Einige Studien ermittelten zwar einen signifikanten Einfluss von p27 auf das Gesamtüberleben und/oder das rezidivfreie Überleben, doch blieb diese Signifikanz auf die univariate Analyse beschränkt (Gillett et al. 1999; Han et al. 1999). In einer Studie zeigte sich in univariater Analyse ein signifikanter Einfluss der p27 Expression auf das Überleben nach fünf Jahren Beobachtungszeit, jedoch konnte dies nach längerer Beobachtungszeit nicht mehr festgestellt werden (Leivonen et al. 2001). Die Ergebnisse weiterer Studien zu diesem Thema konnten weder in multivariater, noch in univariater Analyse eine Signifikanz erzielen (Reed et al. 1999; Leong et al. 2000; Volpi et al. 2000; Spataro et al. 2003). Eine Arbeitsgruppe untersuchte die prognostische Relevanz der p27 Expression an 512 Mammakarzinompatientinnen und kam in Bezug auf das Gesamtkollektiv auf kein signifikantes Ergebnis (Barbareschi et al. 2000). Interessanterweise ergab sich in der Subgruppenanalyse der nodalnegativen Fälle, dass eine starke p27 Expression mit einer schlechteren Prognose einherging.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, dass eine hohe p27 Expression mit einer günstigen Prognose im hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom assoziiert ist. Die vorliegende Studie bestätigte diese Hypothese nicht und konnte weder unter Auswertung des Anteils p27 positiver Zellkerne, der Färbeintensität noch des histochemischen Scores einen signifikanten Einfluss der p27 Expressionsstärke auf den Krankheitsverlauf objektivieren. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Resultaten der bisher umfangreichsten Studie zu diesem Thema. Ravaioli et al. untersuchten die Expression von p27 an Mammakarzinomgewebe von 1598 nodalnegativen, post- und prämenopausalen Patientinnen, welche im Rahmen der randomisierten International Breast Cancer Study Group Trials (IBCSG) VIII und IX entweder ausschließlich eine endokrine Therapie oder eine Chemotherapie mit sequenzieller endokriner Therapie erhalten hatten. In der genannten Studie konnte nach einer medianen Beobachtungszeit von 10 Jahren keine prognostische oder prädiktive Relevanz von p27 ermittelt werden (Ravaioli et al. 2008).

Tabelle 13: p27 Proteinexpression und Prognose bzw. Prädiktion

Autoren	Patientinnen	n	Prognose bei p27 Unterexpression	Therapie
Tan et al.; 1997	pT<1cm	202	schlechteres GÜ (multivariat)	unselektiert
Catzavelos et al.; 1997	unselektiert	168	schlechteres RFÜ (multivariat)	unselektiert
Porter et al.; 1997	<45 Jahre	278	schlechteres GÜ (multivariat)	unselektiert
Fredersdorf et al.; 1997	unselektiert	84	nb	unselektiert
Sgambato et al.; 1997	unselektiert	52	nb	unselektiert
Wu et al.; 1999	unselektiert	181	schlechteres GÜ und RFÜ (multivariat)	unselektiert
Tsuchiya et al.; 1999	nodalpos.	102	schlechteres GÜ und RFÜ (multivariat)	unselektiert
Chu et al.; 1999	unselektiert	169	schlechteres GÜ (multivariat)	unselektiert
Han et al.; 1999	unselektiert	68	schlechteres RFÜ (univariat)	Chemo
Gillett et al.; 1999	unselektiert	189	schlechteres GÜ und RFÜ (univariat)	unselektiert
Reed et al.; 1999	N0	77	ns	kein Tam
Barbareschi et al.; 2000	unilateral, M0	512	ns	unselektiert
	sub: N0	249	besseres RFÜ (univariat)	
Volpi et al.; 2000	N0	286	ns	keine adj. Therapie
Leong et al.; 2000	GI, duktal	148	ns	unselektiert
Chappuis et al.; 2000	N0, Ashk., <65 Jahre	174	schlechteres RFÜ (multivariat)	unselektiert
Leivonen et al.; 2001	unselektiert	197	schlechteres GÜ nach 5 Jahren (univariat)	unselektiert
Spataro et al.; 2003	unselektiert	461	ns	rand.: periop., adj. o. keine Chemo
	sub: N0	198	ns	rand.: periop. Chemo o. keine Chemo
	sub: nodalpos.	129	ns	rand.: periop. Chemo, adj. Chemo o. beide
Pohl et al.; 2003	prämeno., HR pos., stage I, II	512	schlechteres GÜ und RFÜ (multivariat)	rand.: Tam + Gos. o. Chemo (adj.)
	sub: endokrine Therapie	251	schlechteres GÜ und RFÜ (multivariat)	endokrine Therapie
Ravaioli et al.; 2007	N0	1598	ns	rand.: endokrine Th. vs. chemo-endokrine Th.

pT: Tumorgrosse; nodalpos.: nodalpositiv; N0: nodalnegativ; sub: Subgruppe;
M0: keine Fernmetastasen; GI: gut differenziert; ns: nicht signifikant; nb: nicht bestimmt; adj: adjuvant;
prämeno: prämenopausal; HR: Hormonrezeptor; unpub: nicht publiziert; periop: perioperativ;

4.2.2.4 p27 als prädiktiver Faktor für Tamoxifen

Neben seinem prognostischen Potential im Mammakarzinom deuten Ergebnisse aus präklinischen Studien auf eine prädiktive Relevanz des Zellzyklusregulators p27 hin. Versuche an Mammakarziomzellkulturen zeigten, dass die Hochregulation von p27 ein wichtiger Schritt in der Mediation der Tamoxifenwirkung ist. Interessanterweise führte eine Hemmung der p27 Ex-

pression in Zellen, die durch Tamoxifen im Zellzyklus arretiert waren, zu einer Aufhebung dieses zytostatischen Effektes (Cariou et al. 2000). Diese Erkenntnisse führten zu der Hypothese, dass der Verlust der p27 Expression in invasivem Mammakarzinomgewebe zu Tamoxifenresistenz führt. Pohl et al. untersuchten die Expression von p27 an Mammakarzinomgewebe von 251 prämenopausalen hormonrezeptorpositiven Patientinnen, die im Rahmen des ABCSG Trials 5 zu fünfjähriger Tamoxifeneinnahme kombiniert mit dreijähriger Goserelineinnahme randomisiert worden waren. In diesem Kollektiv zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen p27 Expression und einem besseren Gesamtüberleben und rezidivfreien Überleben in multivariater Analyse (Pohl et al. 2003).

Die vorliegende Studie sollte die Hypothese überprüfen, dass eine verminderte p27 Expression im hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom mit einer Tamoxifenresistenz assoziiert ist. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Es konnte kein signifikanter Einfluss der p27 Expression auf den Krankheitsverlauf der Patientinnen mit regulärer Tamoxifeneinnahme gezeigt werden. Auch in der univariaten Korrelationsanalyse mittels Chi-Quadrat ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von p27 und der Tamoxifenresponsivität. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der bereits erwähnten umfangreichsten Studie zu diesem Thema. Ravaioli et al. untersuchten die Expression von p27 an 647 prämenopausalen Patientinnen, die im Rahmen des randomisierten IBCSG Trials VIII eine endokrine Therapie mit Goserelin oder eine sequenzielle Therapie mit Goserelin nach Chemotherapie erhielten, und an 984 postmenopausalen Patientinnen, die im Rahmen des randomisierten IBCSG Trials IX eine 5-jährige endokrine Therapie mit Tamoxifen oder eine sequenzielle Tamoxifentherapie nach Chemotherapie erhielten. Weder in der gesamten Studienpopulation, noch in Subgruppenanalysen konnte nach einer medianen Beobachtungszeit von 10 Jahren ein prädiktiver Wert von p27 ermittelt werden (Ravaioli et al. 2008).

4.2.3 ER β

4.2.3.1 ER β Expression beim Mammakarzinom

Ähnlich wie an Prostata- (Horvath et al. 2001) und Kolongewebe (Konstantinopoulos et al. 2003) konnte bei der Mamma eine sukzessive Abnahme der ER β Expression vom gesunden zum neoplastischen Gewebe hin gezeigt werden (Leygue et al. 1998; Roger et al. 2001; Skliris et al. 2003). Eine immunhistochemische Studie an 283 Mammagewebeproben fand mit einem Median von 94% die höchste ER β Expressionsfraktion in normalem Brustdrüsengewebe, während diese über die duktales Hyperplasie (Median 77%) und das duktales carcinoma in situ (Median 70%) bis

hin zum invasiven Mammakarzinom (Median 60%) signifikant niedriger wurde (Shaaban et al. 2003). Diese Beobachtung nährte die Hypothese, dass ER β tumorsuppressive Eigenschaften hat. Beide Östrogenrezeptoren fungieren als ligandabhängige Transkriptionsfaktoren. Bei dem ER α wird von einer wesentlichen Rolle als Mediator der mitogenen Wirkungen von Östrogen ausgegangen. So wiesen ER α -knockout Mäuse zwar alle nötigen strukturellen Komponenten für eine normale Brustdrüsenentwicklung auf, doch entwickelten sie nur rudimentäre Mammæ (Krege et al. 1998). Die Schlüsselfunktion von ER α in der Entwicklung sowohl der normalen Brustdrüse als auch des Mammakarzinoms entspringt aus dessen regulatorischer Aktivität auf die Expression unterschiedlicher Zielgene. Zu diesen Zielgenen gehören Gene, die Proteine mit Einfluss auf die DNA-Synthese, die Zellzykluskontrolle (Cyclin D1, c-myc) und das Zellüberleben (Bcl-2/BclX_L) kodieren. Betroffen sind auch einige Wachstumsfaktoren, wachstumsfaktorbindende Proteine, Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) und deren Rezeptoren), andere Rezeptoren wie der Progesteronrezeptor, Proteasen (Cathepsin D, Plasminogen, Kollagenasen, angiogenetische Faktoren) und viele andere Proteine (Schiff 2002). Trotz großer Homologien der beiden Östrogenrezeptoren, geht man beim ER β von einer differierenden Funktion im Mammakarzinom aus. Zwar ist diese Funktion bislang nicht eindeutig geklärt, doch deuten verschiedene *in vitro* und *in vivo* Versuche auf eine tumorsuppressive Rolle hin. In Mammakarzinomzelllinien führte eine induzierte Expression von ER β bei simultaner Coexpression von ER α auf gleichem Niveau zu einer Proliferationshemmung trotz Östrogenstimulation (Strom et al. 2004). Eine mögliche Erklärung liefern unterschiedliche Arbeiten, die eine negative regulatorische Aktivität von ER β auf ER α postulieren (Ogawa et al. 1998; Hall and McDonnell 1999; Pettersson et al. 2000). Es wird angenommen, dass bei Vorhandensein beider Östrogenrezeptoren bevorzugt ER α /ER β -Heterodimere gebildet werden (Giguere et al. 1998). Dies könnte die molekulare Grundlage der inhibitorischen Wirkung von ER β auf ER α darstellen, da die Bildung von Homo- und Heterodimeren jeweils spezifische Konformationsänderungen nach sich ziehen, die wiederum bestimmte Interaktionen mit Zielgenen oder Proteinen ermöglichen. Obwohl die DNA-Bindungsdomänen von ER α und ER β zu 96% homolog sind, besteht die Möglichkeit einer differierenden Genexpressionsregulation im Mammakarzinom. Zellkulturexperimente mit Osteosarkomzellen fanden eine Anzahl von östrogenregulierten Genen, deren Expression sowohl über ER α als auch über ER β stimuliert wurde. Es fanden sich aber auch ER α - bzw. ER β -selektive östrogenresponsive Gene (Stossi et al. 2004). Ein weiterer Aspekt, der möglicherweise zu der unterschiedlichen Aktivität der beiden Östrogenrezeptoren beiträgt, ist die ligandenabhängige Interaktion mit AP1-responsiven Elemen-

ten von Zielgenen. Eine Studie an Zellkulturen aus menschlichen Cervixkarzinom- und Mammakarzinomzellen zeigte, dass E_2 in Verbindung mit $ER\alpha$ transkriptionsfördernd und in Verbindung mit $ER\beta$ transkriptionshemmend über AP1 wirkt (Paech et al. 1997). Die Entdeckung von $ER\beta$ Isoformen trägt zusätzlich zur Komplexität der Bedeutung von $ER\beta$ bei. So sind unterschiedliche und/oder gemeinsame Wirkungen der $ER\beta$ Subtypen möglich. Es konnte gezeigt werden, dass $ER\beta_2$ (identisch mit $ER\beta_{cx}$) unfähig zur Bindung von Liganden und somit auch unfähig zur Aktivierung östrogen-responsiver Elemente (ERE) ist. Es bildet bevorzugt Heterodimere mit $ER\alpha$ und inhibiert dadurch dessen Bindung an DNA (Ogawa et al. 1998). Versuche an $ER\alpha$ positiven MCF-7 Mammakarzinomzellen zeigten, dass $ER\alpha/ER\beta_2$ Heterodimere keine Bindung mit ERE eingingen, während $ER\alpha/ER\beta_1$ Komplexe dies taten (Omoto et al. 2003). Diese Beobachtungen weisen möglicherweise darauf hin, dass beide Isoformen $ER\beta_1$ und $ER\beta_2$ die Funktion von $ER\alpha$ via Heterodimerisation hemmen, dass jedoch der jeweilige Mechanismus der Hemmung ein anderer ist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass $ER\alpha$ und $ER\beta$ sowohl synergistische also auch antagonistische Funktionen haben.

In der vorliegenden Studie wurden 142 Mammakarzinome immunhistochemisch auf die Expression von $ER\beta$ untersucht. Da in allen Fällen eine Anfärbung von Zellkernen vorlag und der Median des immunreaktiven Scores bei 8 lag, wurde ein immunreaktiver Score von 9 als Grenzwert zur Trennung sehr starker von schwächerer $ER\beta$ -Positivität gewählt. Bei dieser Grenze zeigten 111 Fälle (78%) eine moderate und 31 Fälle (22%) eine sehr starke $ER\beta$ Expression. Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist schwierig. Viele Studien untersuchten die Expression von $ER\beta$ an kleinen Fallzahlen im zweistelligen Bereich (Jarvinen et al. 2000; Mann et al. 2001; Omoto et al. 2001; Murphy et al. 2002; Omoto et al. 2002; Iwase et al. 2003; Esslimani-Sahla et al. 2004; Fleming et al. 2004; Palmieri et al. 2004). In einigen Studien wurden lediglich die Isoformen 1 bzw. 2 des $ER\beta$ immunhistochemisch nachgewiesen (Jarvinen et al. 2000; Omoto et al. 2001; Omoto et al. 2002; Iwase et al. 2003; Esslimani-Sahla et al. 2004; Fleming et al. 2004; O'Neill et al. 2004; Sugiura et al. 2007; Vinayagam et al. 2007). Die vorliegende Studie hingegen ermittelte mithilfe des monoklonalen Antikörpers 14C8 die Expression aller Isoformen des Östrogenrezeptors β . Ein großes Problem liegt zudem darin, dass es zum aktuellen Zeitpunkt keinen anerkannten Konsens für die Auswertung und den Grenzwert einer Überexpression von $ER\beta$ gibt. So wurde von vielen Arbeitsgruppen der Allred Score zur Quantifizierung der $ER\beta$ Expression gewählt (Omoto et al. 2001; Iwase et al. 2003; Fleming et al. 2004; Myers et al. 2004; Sugiura et al. 2007; Vinayagam et al. 2007), während andere den Histochemi-

schen Score (Murphy et al. 2002), Internationale Einheiten (Hopp et al. 2004) und den prozentualen Anteil angefärbter Zellen nutzten (Jarvinen et al. 2000; Mann et al. 2001; Omoto et al. 2002; Esslimani-Sahla et al. 2004; Nakopoulou et al. 2004; O'Neill et al. 2004). In der vorliegenden Studie wurde der immunreaktive Score zur Beschreibung der ER β Expression gewählt, da sich dieser auch zur Quantifizierung der ER α Expression bewährt hat. Weiterhin ist die Vergleichbarkeit mit anderen Studien durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper eingeschränkt. So wurden teils polyklonale und teils monoklonale Antikörper gegen das C-terminale Ende oder das N-terminale Ende von ER β eingesetzt (Tabelle 14). Einige Studien untersuchten die Expression von ER β mithilfe der Westernblot-Analyse (Hopp et al. 2004; Palmieri et al. 2004). Ein weiterer Aspekt fehlender Uniformität ist die unterschiedliche Auswahl der Patientinnenkollektive. Während einige Studien lediglich ER α positive Fälle (Murphy et al. 2002; Esslimani-Sahla et al. 2004) oder Patientinnen in einem frühen Tumorstadium einschlossen (Fleming et al. 2004; Hopp et al. 2004; Myers et al. 2004), wurden in vielen Studien unselektierte Patientinnenkollektive untersucht (Jarvinen et al. 2000; Mann et al. 2001; Omoto et al. 2002; Fuqua et al. 2003; Palmieri et al. 2004; Sugiura et al. 2007) (Tabelle 14). In einer Arbeit an 242 unselektierten Mammakarzinomen wurde derselbe Antikörper wie in der vorliegenden Studie verwendet, und kommt somit am ehesten für einen Vergleich in Frage (Fuqua et al. 2003). Diese Arbeit nutzte zur Quantifizierung der ER β Expression den immunhistochemischen Score nach Allred (Harvey et al. 1999) und einen Grenzwert von >2 zur Determinierung der ER β Positivität. Es ergaben sich so 24% negative und 76 % positive Fälle. Bei Umrechnung der Ergebnisse der vorliegenden Studie in den immunhistochemischen Score nach Allred ergeben sich 100% positive Fälle. Vergleicht man nun die Ergebnisse der beiden Studien lässt sich die Abweichung durch die Patientinnenauswahl erklären. Fuqua et al. untersuchten Tumorspezies eines unselektierten Patientinnengutes, während die vorliegende Arbeit ein rein hormonrezeptorpositives Kollektiv wählte. Fuqua et al. zeigten auch, dass die ER β Expression signifikant ($p=0,0001$) mit der Expression von ER α korreliert (Fuqua et al. 2003). Somit ist ein höherer Anteil ER β positiver Fälle im vorliegenden Kollektiv nicht überraschend.

Tabelle 14: ERβ Expression im Mammakarzinomgewebe

Autoren	n	Methode	ERbeta	Ak (gegen)	Grenzwert	ERβ-Expression n (%)
Järvinen et al.; 2000	92	IHC	ERβ1	pAk PAI-313 (C)	≤20%; >20%	37 (40); 55 (60)
Mann et al.; 2001	47	IHC	alle iso.	MYEB (N)	≤10%; >10%	14 (30); 33 (70)
Mann et al.; 2001	118	IHC	alle iso.	MYEB (N)	≤10%; >10%	40 (34); 78 (66)
Omoto et al.; 2001	88	IHC	ERβ1	pAk (C)	0-3; 4-8 Allred score	36 (41); 52 (59)
Omoto et al.; 2002	57	IHC	ERβ1	pAk (C)	≤25%; >25%	42 (74); 15 (26)
Murphy et al.; 2002	27	IHC	alle iso.	pAk IgYERB503 (N)	≤100; >100 H-Score	unbekannt
Fuqua et al.; 2003	242	IHC	alle iso.	mAk 14C8 (N)	≤2; >2 Allred score	58 (24); 184 (76)
Iwase et al.; 2003	77	IHC	ERβ1	pAk (C)	≤2; >2 Allred score	46 (60); 31 (40)
Esslimani-Sahla et al.; 2004	50	IHC	alle iso.	pAk 503 IgY (N)	<70%; ≥70%	25 (50); 25 (50)
Esslimani-Sahla et al.; 2004	50	IHC	ERβ2	pAk (C of ERbetacx)	<30%; ≥30%	26 (52); 24 (48)
Fleming et al.; 2004	52	IHC	ERβ1	mAk (C)	≤2; >2 Allred score	26 (50); 26 (50)
O'Neill et al.; 2004	138	IHC	ERβ1	mAk PPG5/10 (C)	≤20%; >20%	20 (15); 118 (85)
Hopp et al.; 2004	186	WB	alle iso.	mAk 14C8 (N)	<3 IU; ≥3 IU	97 (52); 89 (48)
Palmieri et al.; 2004	23	WB	ERβ2	pAk (C of ERbetacx)	negativ; positiv	11 (48); 12 (52)
Myers et al.; 2004	150	IHC	ERβ1	mAk PPG5/10 (C)	≤2; >2 Allred score	63 (42); 87 (58)
Nakopoulou et al.; 2004	181	IHC	ERβ1	mAk PPG5/10 (C)	≤10%; >10-40%; >40%	52 (29); 71 (39); 58 (32)
Hopp et al.; 2004	119	WB	alle iso.	mAk 14C8 (N)	<3 IU; ≥3 IU	67 (56); 52 (44)
Sugiura et al.; 2007	150	IHC	ERβ1	pAk (C)	≤3; >3 Allred score	47 (31); 103 (69)
Sugiura et al.; 2007	150	IHC	ERβ2	pAk (C)	≤3; >3 Allred score	74 (49); 76 (51)
Vinayagam et al.; 2007	141	IHC	ERβ2	mAk 57/3 (C)	≤5; >5 Allred score	41 (29); 100 (71)

n: Fallzahl; nodalpos: nodalpositiv; N0: nodalnegativ; J: Jahre; Rez: Rezidiv; pT: Tumorgrosse; M0: keine Fernmetastasen;
 WB: Westernblot; pAk: polyklonaler Antikörper; mAk: monoklonaler Antikörper; C: C-terminales Ende; N: N-terminales Ende;
 IU: Internationale Einheiten; H-Score: Histochemischer Score; IHC: Immunhistochemie; alle iso: alle isoformen;

4.2.3.2 ERβ Expression und klinische und pathologische Parameter

Die meisten der bisherigen Studien, die die ERβ Expression in Mammakarzinomgewebe untersuchten, verfügten über eher kleine Fallzahlen. In den verschiedenen Arbeiten zeigten sich unterschiedliche Korrelationen mit anderen klinischen und pathologischen Parametern. Häufig zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von ERβ und ERα (Jarvinen et al. 2000; Omoto et al. 2002; Fuqua et al. 2003; Nakopoulou et al. 2004). ERβ korrelierte ebenfalls häufig mit dem Progesteronrezeptor (Jarvinen et al. 2000; Murphy et al. 2002; Omoto et al. 2002; Fuqua et al. 2003; Iwase et al. 2003; Cappelletti et al. 2004). Einige Arbeiten fanden eine Korrelation des ERβ mit weiteren Parametern, die mit einer günstigeren Prognose assoziiert sind. Dazu gehören ein negativer Lymphknotenstatus (Jarvinen et al. 2000; Iwase et al. 2003) und ein niedriger Differenzierungsgrad (Jarvinen et al. 2000; Omoto et al. 2001; Omoto et al. 2002; Iwase et al. 2003). In zwei Studien ergab sich eine inverse Korrelation mit Her-2/neu (Myers et al. 2004; Nakopoulou et al. 2004).

Da die Tumore des vorliegenden Patientinnenkollektivs allesamt hormonrezeptorpositiv waren, war eine Korrelationsanalyse der ERβ Expression bezüglich der ERα oder PR Positivität hinfäl-

lig. Jedoch lässt sich durch diesen Sachverhalt möglicherweise die im Vergleich zu anderen Arbeiten starke ERβ Expression in der großen Mehrheit des hier untersuchten Patientinnenkollektivs erklären. In der vorliegenden Studie ergaben sich keinerlei signifikante Assoziationen des ERβ mit anderen klinischen und pathologischen Parametern.

4.2.3.3 ERβ als Prognosefaktor

Obwohl die Erforschung der prognostischen Relevanz des ERβ in unterschiedlichen Karzinomen noch am Anfang steht, wurde an jeweils kleinen Studienpopulationen ein signifikanter Einfluss von ERβ oder einer seiner Isoformen auf den Krankheitsverlauf beim Prostatakarzinom (Fujimura et al. 2001) und beim Astrozytom (Batistatou et al. 2006) gezeigt. Aufgrund der schon beschriebenen Attribute eines Tumorsuppressors wäre eine Relevanz des ERβ als günstiger prognostischer Faktor im Mammakarzinom zu erwarten. Nur wenige Studien untersuchten den rein prognostischen Wert von ERβ im Mammakarzinom unter Auswahl einer Studienpopulation ohne adjuvante Therapie bzw. unselektierter Therapieschemata (Tabelle 15). Drei dieser Arbeiten fanden keinen signifikanten Einfluss der ERβ Expression auf den Krankheitsverlauf (Mann et al. 2001; Omoto et al. 2002; Hopp et al. 2004). Davon zeigte eine Arbeitsgruppe allerdings einen Trend (Log-Rank: $p=0,084$) zu einem längeren rezidivfreien Überleben bei ERβ1 Positivität (Omoto et al. 2002). Eine Studie an 150 unselektierten Mammakarzinompatientinnen ergab einen signifikanten Vorteil im rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben für Fälle starker ERβ1 oder ERβ2 Proteinexpression in univariater Analyse (Sugiura et al. 2007). Interessanterweise stellte sich in derselben Studie die ERβ2 mRNA Expression als prognostischer Marker in multivariater Analyse heraus, sodass die prognostische Wertigkeit des mRNA Levels möglicherweise die der Proteinexpression übersteigt.

In der vorliegenden Studie wurden mittels eines Antikörpers gegen das N-terminale Ende von ERβ simultan alle ERβ Isoformen in ihrer Expression bestimmt. Es sollte die Hypothese überprüft werden, dass eine Überexpression von ERβ mit einer günstigen Prognose im hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom assoziiert ist. Ein signifikanter Einfluss dieser Expression auf den Krankheitsverlauf ergab sich hier nicht, doch zeigte sich ein deutlicher Trend zu einem längeren rezidivfreien Überleben ($p=0,0582$) bei hoher ERβ Expression (Abbildung 36). Auch hier soll erwähnt werden, dass aufgrund der Patientinnenselektion in der vorliegenden Arbeit die prognostische Wertigkeit eine starke prädiktive Note in Bezug auf Tamoxifen hat.

Tabelle 15: ER β Expression und Prognose bzw. Prädiktion

Autoren	Patientinnen	n	Prognose bei ERbeta Überexpression	Therapie
Speirs et al.; 1999	postmenopausal	17	schlechte Tam-Responsivität (univariat)	Tam, adj.
Järvinen et al.; 2000	unselektiert	92	nb	keine neoadj. Th.
Mann et al.; 2001	unselektiert	118	besseres GÜ (univariat)	Tam, adj.
Mann et al.; 2001	unselektiert	47	ns	unselektiert
Omoto et al.; 2001	unselektiert	88	besseres RFÜ (univariat)	keine Th. o. Tam & Chemo
Murphy et al.; 2002	ER α +, N0	27	gute Tam-Responsivität (univariat)	Tam, adj.
Omoto et al.; 2002	unselektiert	57	ns	unselektiert
Iwase et al.; 2003	Rez. oder lokal-fortgeschr.	77	ns	Tam o. andere endokr. Th.
Fuqua et al.; 2003	unselektiert	242	nb	unselektiert
Hopp et al.; 2004	stage II, nodalpos.	119	ns	keine adj. Th.
Hopp et al.; 2004	stage II, nodalpos.	186	besseres RFÜ und GÜ (multivariat)	Tam, adj.
Esslimani-Sahla et al.; 2004	ER α +, pT>1cm	50	ns	Tam, adj, 5J
Esslimani-Sahla et al.; 2004	ER α +, pT>1cm	50	gute Tam-Responsivität (multivariat)	Tam, adj, 5J
Myers et al.; 2004	stage I,II	150	besseres RFÜ (univariat)	adj. Tam & Chemo
Nakopoulou et al.; 2004	M0	181	besseres RFÜ und GÜ (uni- u. multivariat)	adj. Tam & Chemo o. nur Tam
Fleming et al.; 2004	stage I,II	52	besseres RFÜ (univariat)	Tam, adj, 5J
O'Neill et al.; 2004	postmenopausal	138	ns	Tam, adj.
Palmieri et al.; 2004	unselektiert	23	gute Tam-Responsivität (univariat)	neoadj. or pall. endokr. Th.
Cappelletti et al.; 2004	ER α +, >65 J, pT>2cm	38	ns	Tor, neoadj.
Chang et al.; 2005	Rez. vs. Primär-Ca (ER α +) 102	102	ns	Tam, adj.
Davies et al.; 2005	postmenopausal	105	ER β 5: besseres RFÜ (uni- and multivariat)	adj. endokr. Th.
Davies et al.; 2005	postmenopausal	105	ER β 2: besseres RFÜ und GÜ (uni- and multivariat)	adj. endokr. Th.
Vinayagam et al.; 2007	postmenopausal	141	besserer Krankheitsverlauf (univariat)	adj. endokr. Th.
Sugiura et al.; 2007	unselektiert	150	besseres GÜ und RFÜ (univariat)	unselektiert
Sugiura et al.; 2007	unselektiert	150	besseres GÜ und RFÜ (univariat)	unselektiert

n: Fallzahl; nodalpos: nodalpositiv; N0: nodalnegativ; J: Jahre; Rez: Rezidiv; pT: Tumorgrosse;
 alle iso: alle isoformen; nb: nicht bestimmt; ns: nicht signifikant; GÜ: Gesamtüberleben; RFÜ: rezidivfreies Überleben; Tam: Tamoxifen;
 Tor: Toremifen; Th: Therapie; M0: keine Fernmetastasen; Chemo: Chemotherapie; adj. adjuvant; endokr: endokrin; o: oder

4.2.3.4 ER β als prädiktiver Faktor für Tamoxifen

Bis heute ist der Östrogenrezeptor α der einzige verlässliche prädiktive Marker bezüglich des Ansprechens auf eine Tamoxifentherapie. Seit der Entdeckung des Östrogenrezeptors β wurde viel über seine Rolle in diesem Zusammenhang spekuliert. Experimente an Zelllinien demonstrierten eine gemischte agonistische und antagonistische Funktion von Tamoxifen in Verbindung mit ER α , wohingegen Tamoxifen über ER β als reiner Antagonist wirkte (Barkhem et al. 1998). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Funktionen dieser beiden Östrogenrezeptoren liegt in der differierenden Aktivität ihrer jeweiligen AF-1 Domänen. So zeigten Versuche an menschlichen Zelllinien unterschiedlicher Art, dass die AF-1 Domäne des ER β im Gegensatz zu der des ER α trotz partieller Homologie kaum transkriptionell aktiv ist (Delaunay et al. 2000). Unterschiede im Bedarf an Coaktivatoren könnten ebenfalls eine Ursache für abweichende Wirkungen von ER α und ER β sein. Da beide Rezeptoren sehr ähnliche Bindungsaffinitäten zu Tamoxifen haben (Kuiper et al. 1997), ist dieser Faktor eher nicht ausschlaggebend für genannte Ungleichheiten. Untersuchungen an Zellkulturen zeigten ebenfalls agonistische Wirkungen von Tamoxifen über ER α , während dies über ER β allein nicht der Fall war. Interessanterweise wurde bei Coexpression beider Östrogenrezeptoren in denselben Zellen die Fähigkeit von Tamoxifen über ER α agonistisch zu wirken vollkommen unterdrückt (Hall and McDonnell 1999). Folglich könnte die Expression von ER β in ER α positivem Mammakarzinomgewebe die partiellen agonistischen Effekte von Tamoxifen unterbinden und so zu einem besseren Ansprechen auf die

Tamoxifentherapie führen. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse aus Versuchen an ER α exprimierenden MCF-7 Mammakarzinomzellen affirmiert. Eine Überexpression von ER β in diesen Zellen hatte eine erhöhte Tamoxifensensitivität zur Folge (Murphy et al. 2005). Die überwiegende Mehrheit klinischer Studien zu diesem Thema bekräftigte trotz kleiner Patientinnenpopulationen die Idee einer prädiktiven Relevanz von ER β bezüglich einer adjuvanten Tamoxifentherapie (Tabelle 15). So ergab sich in vier Studien eine signifikante Assoziation der ER β Expression mit einem besseren Ansprechen auf eine adjuvante Tamoxifentherapie (Mann et al. 2001; Murphy et al. 2002; Esslimani-Sahla et al. 2004; Hopp et al. 2004). Drei Studien untersuchten den Einfluss der Wildtyp-Form ER β 1 auf die Tamoxifenresponsivität. Davon zeigte eine, dass ER β 1 Positivität mit fünfjähriger Rezidivfreiheit assoziiert war (Fleming et al. 2004). Von drei Arbeitsgruppen, die den Subtyp ER β 2 auf seinen prädiktiven Wert untersuchten, errechneten zwei einen Zusammenhang zwischen der ER β 2 Expression und dem Ansprechen auf endokrine Therapien (Palmieri et al. 2004; Vinayagam et al. 2007).

In der vorliegenden Studie wurde die ER β Expression insgesamt und keine spezifische Isoform auf ihre prädiktive Bedeutung in Bezug auf Tamoxifen untersucht. Es sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass eine ER β Überexpression mit einem besseren Ansprechen auf eine Tamoxifentherapie assoziiert ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben eine Tendenz zu einer besseren Tamoxifenresponsivität bei sehr starker ER β Expression (Abbildung 37 und 38). Es wäre interessant, die Verlaufsdaten dieser Patientinnen nach zusätzlicher Beobachtungszeit zu erheben. Es ist möglich, dass der hier gezeigte Trend zu einem signifikanten Unterschied im GÜ und/oder RFÜ werden würde und somit im Einklang mit obengenannten vier Studien zur ER β Expression insgesamt stehen würde.

4.3 Cyclin D1, p27 und ER β in Kombination

Erkenntnisse aus verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien deuten auf mögliche Interaktionen, Korrelationen und Interdependenzen der hier untersuchten Marker hin. Aufgrunddessen und wegen der Möglichkeit additiver Wirkungen ist es von Interesse, ob die hier untersuchten molekularen Marker in unterschiedlichen Kombinationen einen Einfluss auf die Tumorbilogie und konsekutiv auf die Prognose der Patientinnen haben.

4.3.1 Cyclin D1/p27

Da dem Cyclin D1 eine propulsive und dem p27 eine inhibierende Wirkung auf den Zellzyklus zugeschrieben wird, ist bei simultaner Überexpression von Cyclin D1 und Unterexpression von

p27 im Mammakarzinomgewebe eine schlechtere Prognose der Patientinnen zu erwarten. In der vorliegenden Studie zeigte keine der möglichen Expressionskombinationen dieser beiden Marker einen signifikanten Unterschied im Krankheitsverlauf im Vergleich zu den jeweils übrigen Fällen. Auch in der Subgruppenanalyse der Patientinnen mit regulärer Tamoxifeneinnahme ergab sich keine prognostische Bedeutung für die möglichen Kombinationen aus Cyclin D1 und p27. Fredersdorf et al. untersuchten die Expression sowohl von Cyclin D1 und p27 an hochproliferativen Mammakarzinomzelllinien. Sie stellten fest, dass die meisten dieser Zelllinien mit hoher p27 Expression über hohe Cyclin D1 Konzentrationen verfügten. Um diesen Sachverhalt *in vivo* zu überprüfen, untersuchten sie immunhistochemisch die beiden genannten Marker an 63 invasiven Mammakarzinomen und fanden eine signifikante positive Korrelation ($p < 0,002$) (Fredersdorf et al. 1997). Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass die simultane starke Cyclin D1 Expression den neoplastischen Zellen erlaubt, die hohen zellzyklusinhibierenden p27 Konzentrationen zu tolerieren. Der Zusammenhang von p27 und Cyclin D1 mit dem Krankheitsverlauf der Patientinnen wurde in dieser Studie nicht untersucht. Gillett et al. untersuchten p27 und Cyclin D1 an 189 Mammakarzinomen. Sie bestätigten ebenfalls die Korrelation dieser beiden Marker ($p = 0,0007$). Außerdem analysierten sie deren kombinierte Expression im Hinblick auf die Prognose der Patientinnen. Es stellte sich heraus, dass p27 der einflussreichere prognostische Faktor ist, da alle Patientinnen mit hoher p27 Expression unabhängig von der Cyclin D1 Expressionsstärke eine günstigere Prognose hatten. Eine ähnlich gute Prognose hatte interessanterweise die Untergruppe niedriger p27 Expression kombiniert mit starker Cyclin D1 Expression, sodass vermutet wurde, dass eine Cyclin D1 Überexpression die biologischen Effekte einer niedrigen p27 Expression kompensieren kann (Gillett et al. 1999). Barbareschi et al. testeten gleichermaßen die möglichen Expressionskombinationen von p27 und Cyclin D1 auf ihre prognostische Relevanz an 512 Mammakarzinomen. Auch hier korrelierten die beiden Marker untereinander ($p = 0,0001$), es konnte allerdings kein Unterschied im rezidivfreien Überleben für die verschiedenen Kombinationen gezeigt werden ($p = 0,6$) (Barbareschi et al. 2000). Leong et al. zeigten übereinstimmend eine Korrelation von Cyclin D1 und p27 ($p < 0,0001$) an 148 gut differenzierten Mammakarzinomen, konnten aber keinen Einfluss auf die Prognose ermitteln (Leong et al. 2000).

4.3.2 Cyclin D1/ER β

Es ist bekannt, dass Östrogen seine mitogenen Effekte unter anderem durch die Transkriptionsaktivierung von Cyclin D1 via ER α vermittelt. Dies wird bei Coexpression von ER β unterdrückt, wie Versuche an HeLa-Zelllinien zeigten (Liu et al. 2002). Konsekutiv wurden gegensätzliche

Wirkungen von ER α und ER β auf die Cyclin D1 Genexpression postuliert. Im Einklang damit führte die Zugabe von ER β -selektiven Agonisten zu Brustdrüsenzelllinien der Maus, in denen beide Östrogenrezeptoren gleichermaßen exprimiert wurden, zur Herunterregulation von Cyclin D1 und zur Hemmung des Zellwachstums. Hingegen induzierten ER α -selektive Agonisten in denselben Zellen eine Hochregulation von Cyclin D1 bei Proliferationsstimulation (Helguero et al. 2005). Weitere *in vitro* Versuche an ER α positiven MCF-7 Mammakarzinomzellen zeigten, dass die Einführung von ER β in diese Zellen eine Proliferationsreduktion unter anderem über die Unterdrückung der Cyclin D1 Gentranskription bewirkte (Paruthiyil et al. 2004). Bièche et al. zeigten an Mammakarzinomen von 131 Patientinnen, dass die Expression von ER β und CCND1 auf mRNA-Niveau negativ korreliert war ($p=0,027$) (Bieche et al. 2001). Diese Beobachtungen aus präklinischen und klinischen Arbeiten deuten auf mögliche Zusammenhänge und Interaktionen von Cyclin D1 und ER β hin. Bislang wurde jedoch von keiner Arbeitsgruppe die kombinierte Expression dieser beiden Marker im Hinblick auf ihre prognostische oder prädiktive Bedeutung untersucht. Aufgrund der proliferationsfördernden Rolle von Cyclin D1 im Zellzyklus und der tumorsuppressiven Eigenschaften des ER β , wäre ein Überlebensvorteil bzw. ein günstigeres RFÜ für die Fälle starker ER β Expression bei negativem Cyclin D1 Status zu erwarten. Die inverse Situation sollte mit einer schlechteren Prognose einhergehen. In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Einfluss der genannten Markerkombination auf das GÜ und RFÜ im Gesamtkollektiv gezeigt werden. Wegen der Hinweise einer Assoziation von Cyclin D1 Überexpression mit Tamoxifenresistenz und von ER β mit gesteigerter Tamoxifenresponsivität, ist eine Analyse dieser Markerkombination im Hinblick auf eine prädiktive Relevanz interessant. In der Subgruppe der Patientinnen mit regulärer Tamoxifeneinnahme zeigte sich ein signifikant schlechteres RFÜ für die Fälle mit positivem Cyclin D1 Status und niedrig bis mäßiger ER β Expression ($p=0,0181$). Dies spricht für eine prädiktive Bedeutung dieser Markerkombination in Bezug auf Tamoxifen.

4.3.3 p27/ER β

So wie an ER α positiven Mammakarzinomzellen gezeigt wurde, dass die Anwesenheit von ER β zu Proliferationsinhibition via Cyclin D1 Repression führte, konnte beobachtet werden, dass diese Proliferationshemmung auch durch eine Zunahme der p27 Gentranskription vermittelt wurde (Paruthiyil et al. 2004). In weiteren Experimenten an T47 D Mammakarzinomzelllinien führte die Induktion von ER β zu einer Wachstumshemmung exponential proliferierender Zellen, die mit einer Zunahme von p27 einherging (Strom et al. 2004). Es scheint also auch zwischen diesen

beiden Markern Interaktionen mit Auswirkungen auf die Tumorbiologie zu geben. Bisher liegt jedoch keine Arbeit vor, die p27 und ER β am selben Kollektiv untersuchte, geschweige denn die prognostische oder prädiktive Relevanz dieser Markerkombination ermittelte. Dies geschah in der vorliegenden Studie, doch ergab sich kein signifikanter Einfluss der möglichen Expressionskombinationen aus p27 und ER β auf Prognose oder Prädiktion der Tamoxifenresponsivität.

5 Zusammenfassung

Der Zellzyklusregulator Cyclin D1 spielt eine Schlüsselrolle in der Progression der G1-Phase. Zahlreiche experimentelle und klinische Studien ermittelten eine erhöhte Cyclin D1 Expression im Mammakarzinom und eine Assoziation von erhöhter Cyclin D1 Expression und schlechter Prognose bzw. schlechter Tamoxifenresponsivität beim Mammakarzinom. Der cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p27 hat eine wesentliche inhibierende Funktion in der Progression des Zellzyklus am Übergang der G1- in die S-Phase. Verschiedene experimentelle und klinische Studien am Mammakarzinom wiesen auf tumorsuppressive Eigenschaften von p27 hin und ergaben einen Zusammenhang zwischen verminderter p27 Expression und schlechter Prognose bzw. schlechtem Ansprechen auf eine Therapie mit Tamoxifen. Die Funktion des Östrogenrezeptors β (ER β) im Mammakarzinom ist noch unklar. Nach Erkenntnissen aus experimentellen Studien scheint ER β eine inhibierende regulatorische Wirkung auf ER α und dessen proliferative Effekte zu haben. Zudem kamen unterschiedliche experimentelle und klinische Studien zu dem Ergebnis einer verminderten ER β Expression im Mammakarzinom und einer Korrelation zwischen einer ER β Überexpression und einer günstigeren Prognose bzw. besserem Ansprechen auf Tamoxifen beim Mammakarzinom.

Die klinische Bedeutung von Cyclin D1, p27 und ER β als prognostische und prädiktive Marker ist jedoch weiterhin kontrovers. Daher wurde in der vorliegenden Studie die Expression von Cyclin D1, p27 und ER β mittels Immunhistochemie an archiviertem, formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe von 143 hormonrezeptorpositiven Mammakarzinompatientinnen, die eine adjuvante endokrine Therapie erhalten hatten, bestimmt. Nach einem medianen Beobachtungszeitraum von 87 Monaten wurden retrospektiv Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben nach Kaplan-Meier berechnet und mit dem Log-rank-Test überprüft, um die prognostische und prädiktive Relevanz der isolierten und kombinierten Expression von Cyclin D1, p27 und ER β zu untersuchen. Dabei wurde das gesamte Patientinnenkollektiv untersucht. Des Weiteren erfolgte eine Subgruppenanalyse der Patientinnen, die Tamoxifen für mindestens 5 Jahre eingenommen hatten oder einen Progress der Mammakarzinomerkrankung unter Tamoxifen erlitten hatten. Diese Subgruppenanalyse umfasste 75 Patientinnen und hatte die Untersuchung der prädiktiven Bedeutung von Cyclin D1, p27 und ER β bezüglich einer Tamoxifentherapie zum Ziel.

Cyclin D1 wurde in 48 von 141 (34%) Mammakarzinomen exprimiert. Eine hohe Cyclin D1 Expression war in univariater Analyse mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Es zeigte sich

eine signifikante Korrelation hoher Cyclin D1 Färbeintensität mit kürzerem rezidivfreien Überleben ($p < 0,0001$) und kürzerem Gesamtüberleben ($p = 0,0211$). In der univariaten Überlebensanalyse der Subgruppe mit Patientinnen, die Tamoxifen 5 Jahre eingenommen hatten oder unter Tamoxifentherapie einen Progress erlitten hatten, war eine hohe Cyclin D1 Färbeintensität signifikant ($p = 0,0059$) mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert. Eine hohe p27 Expression lag in 69 von 142 (49%) Fällen vor. Weder im Gesamtkollektiv, noch in der Subgruppe der regulären Tamoxifeneinnahme konnte ein Einfluss der Überexpression von p27 auf das Gesamtüberleben oder das rezidivfreie Überleben nachgewiesen werden. ER β war in 31 von 142 (22%) Mammakarzinomen überexprimiert. Ein signifikanter Einfluss der Überexpression von ER β auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben konnte nicht ermittelt werden. Es zeigte sich jedoch ein Trend zu einem günstigeren Krankheitsverlauf bei ER β Überexpression im Gesamtkollektiv und in der Subgruppe der regulären Tamoxifeneinnahme.

Die Kombination aus niedriger ER β Expression und positivem Cyclin D1 Status im Mammakarzinom war in univariater Analyse mit einem signifikant kürzeren rezidivfreien Überleben in der Subgruppe der regulären Tamoxifeneinnahme assoziiert ($p = 0,0181$).

Die vorliegende Studie zeigt in univariater Analyse, dass eine hohe Cyclin D1 Expression im hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom mit einer ungünstigen Prognose und einer schlechten Tamoxifenresponsivität assoziiert ist. Zudem korreliert die Kombination von niedriger ER β Expression und positivem Cyclin D1 Status in univariater Analyse mit einem schlechten Ansprechen auf eine Tamoxifentherapie im hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom. Die Expression von p27 und ER β hat keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben und die Tamoxifenresponsivität. Es zeigt sich jedoch ein Trend zu einem günstigeren Krankheitsverlauf und einer besseren Tamoxifenresponsivität bei ER β Überexpression.

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABCSG	Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group
AF	Transcriptional activation function domain
AI	Aromataseinhibitor
Ak	Antikörper
AP-1	Activating Protein 1
BET	Brusterhaltende Therapie
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCND1	Cyclin D1 Gen
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CKI	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
DAB	Diaminobenzidin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCIS	Duktales carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Östrogen-responsive Elemente
FBX	F-box protein
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GÜ	Gesamtüberleben
HScore	Histochemischer Score
IGFR	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktorrezeptor
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
KI	Konfidenzintervall
KO	Knockout

LBD	Ligand-Bindungsdomäne
LCIS	Lobuläres carcinoma in situ
LSAB	Markierte Streptavidin-Biotin-Methode
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MISS	Membran-initiiertes Steroid-Signalweg
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NCOA1	Nuclear-receptor co-activator 1
NISS	Nukleär-initiiertes Steroid-Signalweg
pAK	Polyklonaler Antikörper
PCAF	p300/CBP-associated factor
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-OH Kinase
PR	Progesteronrezeptor
Rb	Retinoblastoma-Protein
RFÜ	Rezidivfreies Überleben
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator
Tam.-Exe.-Studie	Tamoxifen-Exemestan-Studie
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Thr	Threonin
TMA	Tissue micro array
UICC	International Union Against Cancer
ZK	Zellkerne

Literaturverzeichnis

- (1997). "Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer." Lancet **350**(9084): 1047-59.
- (1998). "Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group." Lancet **351**(9114): 1451-67.
- (RKI) R-K-I (2005). "Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie - Dachdokumentation Krebs."
- Aaltonen K, Amini RM, Landberg G, et al. (2008). "Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer." Breast Cancer Res Treat.
- Adami HO, Graffman S, Lindgren A und Sallstrom J (1985). "Prognostic implication of estrogen receptor content in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **5**(3): 293-300.
- Alao JP (2007). "The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention." Mol Cancer **6**: 24.
- Ali S und Coombes RC (2002). "Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance." Nat Rev Cancer **2**(2): 101-12.
- Alkarain A und Slingerland J (2004). "Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer." Breast Cancer Res **6**(1): 13-21.
- Alt JR, Cleveland JL, Hannink M und Diehl JA (2000). "Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation." Genes Dev **14**(24): 3102-14.
- Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, et al. (1996). "17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells." Oncogene **12**(11): 2315-24.
- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." Am J Hum Genet **72**(5): 1117-30.
- Armstrong K, Eisen A und Weber B (2000). "Assessing the risk of breast cancer." N Engl J Med **342**(8): 564-71.
- Arnold A und Papanikolaou A (2005). "Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis." J Clin Oncol **23**(18): 4215-24.
- Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK und Schiff R (2008). "Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance." Endocr Rev **29**(2): 217-33.
- Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M und Contesso G (2006). "Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period." Cancer **106**(4): 743-50.
- Barbareschi M, van Tinteren H, Mauri FA, et al. (2000). "p27(kip1) expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study on 512 patients with long-term follow-up." Int J Cancer **89**(3): 236-41.
- Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, et al. (1998). "Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists." Mol Pharmacol **54**(1): 105-12.
- Barnes DM und Gillett CE (1998). "Cyclin D1 in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **52**(1-3): 1-15.
- Bartkova J, Lukas J, Muller H, et al. (1994). "Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer." Int J Cancer **57**(3): 353-61.
- Bartkova J, Lukas J, Muller H, et al. (1995). "Abnormal patterns of D-type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer." Cancer Res **55**(4): 949-56.
- Bartkova J, Lukas J, Strauss M und Bartek J (1995). "Cyclin D1 oncoprotein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis." Oncogene **10**(4): 775-8.
- Batistatou A, Kyzas PA, Goussia A, et al. (2006). "Estrogen receptor beta (ERbeta) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours." J Neurooncol **77**(1): 17-23.
- Beral V (2003). "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." Lancet **362**(9382): 419-27.
- Bergsagel PL und Kuehl WM (2003). "Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma." Immunol Rev **194**: 96-104.
- Bieche I, Olivi M, Nogues C, Vidaud M und Lidereau R (2002). "Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays." Br J Cancer **86**(4): 580-6.

- Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, et al. (2001). "Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer." *Oncogene* **20**(56): 8109-15.
- Bilalovic N, Vranic S, Basic H, Tatarevic A und Selak I (2005). "Immunohistochemical evaluation of cyclin D1 in breast cancer." *Croat Med J* **46**(3): 382-8.
- Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, et al. (2002). "A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression." *Embo J* **21**(13): 3390-401.
- Borges S, Desta Z, Li L, et al. (2006). "Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment." *Clin Pharmacol Ther* **80**(1): 61-74.
- Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK und Hilsenbeck SG (1996). "Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer." *Clin Cancer Res* **2**(3): 585-92.
- Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, et al. (1993). "Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer." *Oncogene* **8**(8): 2127-33.
- Burki NG, Caduff R, Walt H, et al. (2000). "Comparative genomic hybridization of fine needle aspirates from breast carcinomas." *Int J Cancer* **88**(4): 607-13.
- Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL und Musgrove EA (2006). "Cell cycle control in breast cancer cells." *J Cell Biochem* **97**(2): 261-74.
- Cappelletti V, Celio L, Bajetta E, et al. (2004). "Prospective evaluation of estrogen receptor-beta in predicting response to neoadjuvant antiestrogen therapy in elderly breast cancer patients." *Endocr Relat Cancer* **11**(4): 761-70.
- Carder PJ, Murphy CE, Dervan P, et al. (2005). "A multi-centre investigation towards reaching a consensus on the immunohistochemical detection of ERbeta in archival formalin-fixed paraffin embedded human breast tissue." *Breast Cancer Res Treat* **92**(3): 287-93.
- Cariou S, Catzavelos C und Slingerland JM (1998). "Prognostic implications of expression of the cell cycle inhibitor protein p27Kip1." *Breast Cancer Res Treat* **52**(1-3): 29-41.
- Cariou S, Donovan JC, Flanagan WM, et al. (2000). "Down-regulation of p21 WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9042-6.
- Carter CL, Allen C und Henson DE (1989). "Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases." *Cancer* **63**(1): 181-7.
- Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. (1997). "Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer." *Nat Med* **3**(2): 227-30.
- Chan JK, Miller KD, Munson P und Isaacson PG (1999). "Immunostaining for cyclin D1 and the diagnosis of mantle cell lymphoma: is there a reliable method?" *Histopathology* **34**(3): 266-70.
- Chappuis PO, Kapusta L, Begin LR, et al. (2000). "Germline BRCA1/2 mutations and p27(Kip1) protein levels independently predict outcome after breast cancer." *J Clin Oncol* **18**(24): 4045-52.
- Christov K, Ikui A, Shilkaitis A, et al. (2003). "Cell proliferation, apoptosis, and expression of cyclin D1 and cyclin E as potential biomarkers in tamoxifen-treated mammary tumors." *Breast Cancer Res Treat* **77**(3): 253-64.
- Chu JS, Huang CS und Chang KJ (1999). "p27 expression as a prognostic factor of breast cancer in Taiwan." *Cancer Lett* **141**(1-2): 123-30.
- Clark GM und McGuire WL (1988). "Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer." *Semin Oncol* **15**(2 Suppl 1): 20-5.
- Colleoni M, Rotmensz N, Maisonneuve P, et al. (2007). "Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer." *Ann Oncol* **18**(10): 1632-40.
- Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, et al. (2004). "Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment." *Clin Cancer Res* **10**(19): 6622-8.
- Coqueret O (2002). "Linking cyclins to transcriptional control." *Gene* **299**(1-2): 35-55.
- Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, et al. (1997). "Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups." *Cancer Res* **57**(19): 4360-7.
- Cuzick J, Powles T, Veronesi U, et al. (2003). "Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials." *Lancet* **361**(9354): 296-300.
- De Paola F, Vecci AM, Granato AM, et al. (2002). "p27/kip1 expression in normal epithelium, benign and neoplastic breast lesions." *J Pathol* **196**(1): 26-31.
- Delaunay F, Pettersson K, Tujague M und Gustafsson JA (2000). "Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta." *Mol Pharmacol* **58**(3): 584-90.

- Dickson C, Fantl V, Gillett C, et al. (1995). "Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer." *Cancer Lett* **90**(1): 43-50.
- Diehl JA (2002). "Cycling to cancer with cyclin D1." *Cancer Biol Ther* **1**(3): 226-31.
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF und Sherr CJ (1998). "Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization." *Genes Dev* **12**(22): 3499-511.
- Diehl JA, Zindy F und Sherr CJ (1997). "Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." *Genes Dev* **11**(8): 957-72.
- Ellis IO, Galea M, Broughton N, et al. (1992). "Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up." *Histopathology* **20**(6): 479-89.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al. (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(12): 4258-65.
- Esslimani-Sahla M, Simony-Lafontaine J, Kramar A, et al. (2004). "Estrogen receptor beta (ER beta) level but not its ER beta cx variant helps to predict tamoxifen resistance in breast cancer." *Clin Cancer Res* **10**(17): 5769-76.
- Fantl V, Smith R, Brookes S, Dickson C und Peters G (1993). "Chromosome 11q13 abnormalities in human breast cancer." *Cancer Surv* **18**: 77-94.
- Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I und Dickson C (1995). "Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development." *Genes Dev* **9**(19): 2364-72.
- Faulds MH, Olsen H, Helguero LA, Gustafsson JA und Haldosen LA (2004). "Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells." *Mol Endocrinol* **18**(2): 412-21.
- Fearon ER und Vogelstein B (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Ferno M, Stal O, Baldetorp B, et al. (2000). "Results of two or five years of adjuvant tamoxifen correlated to steroid receptor and S-phase levels. South Sweden Breast Cancer Group, and South-East Sweden Breast Cancer Group." *Breast Cancer Res Treat* **59**(1): 69-76.
- Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM und Kemp CJ (1998). "The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression." *Nature* **396**(6707): 177-80.
- Fleming FJ, Hill AD, McDermott EW, O'Higgins NJ und Young LS (2004). "Differential recruitment of coregulator proteins steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid receptors to the estrogen receptor-estrogen response element by beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen in human breast cancer." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(1): 375-83.
- Foster JS, Henley DC, Ahamed S und Wimalasena J (2001). "Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer." *Trends Endocrinol Metab* **12**(7): 320-7.
- Foster JS und Wimalasena J (1996). "Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **10**(5): 488-98.
- Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, et al. (1997). "High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6380-5.
- Frkovic-Grazio S und Bracko M (2002). "Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma." *J Clin Pathol* **55**(2): 88-92.
- Fujimura T, Takahashi S, Urano T, et al. (2001). "Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer." *Biochem Biophys Res Commun* **289**(3): 692-9.
- Fuqua SA, Schiff R, Parra I, et al. (2003). "Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters." *Cancer Res* **63**(10): 2434-9.
- Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, et al. (1997). "Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis." *Cancer Res* **57**(9): 1634-7.
- Giguere V, Tremblay A und Tremblay GB (1998). "Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling." *Steroids* **63**(5-6): 335-9.
- Gillett C, Fantl V, Smith R, et al. (1994). "Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining." *Cancer Res* **54**(7): 1812-7.
- Gillett C, Smith P, Gregory W, et al. (1996). "Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer." *Int J Cancer* **69**(2): 92-9.
- Gillett CE, Smith P, Peters G, Lu X und Barnes DM (1999). "Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 expression and interaction with other cell cycle-associated proteins in mammary carcinoma." *J Pathol* **187**(2): 200-6.

- Giorno R (1984). "A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction." *Diagn Immunol* **2**(3): 161-6.
- Gladden AB und Diehl JA (2005). "Location, location, location: the role of cyclin D1 nuclear localization in cancer." *J Cell Biochem* **96**(5): 906-13.
- Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, et al. (2007). "The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen." *Breast Cancer Res Treat* **101**(1): 113-21.
- Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. (2009). "Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009." *Ann Oncol* **20**(8): 1319-29.
- Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, et al. (2003). "Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer." *J Clin Oncol* **21**(17): 3357-65.
- Hall JM und McDonnell DP (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." *Endocrinology* **140**(12): 5566-78.
- Hall M und Peters G (1996). "Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer." *Adv Cancer Res* **68**: 67-108.
- Han EK, Begemann M, Sgambato A, et al. (1996). "Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis." *Cell Growth Differ* **7**(6): 699-710.
- Han S, Park K, Bae BN, et al. (2003). "Cyclin D1 expression and patient outcome after tamoxifen therapy in estrogen receptor positive metastatic breast cancer." *Oncol Rep* **10**(1): 141-4.
- Han S, Park K, Kim HY, et al. (1999). "Reduced expression of p27Kip1 protein is associated with poor clinical outcome of breast cancer patients treated with systemic chemotherapy and is linked to cell proliferation and differentiation." *Breast Cancer Res Treat* **55**(2): 161-7.
- Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, et al. (2005). "Benign breast disease and the risk of breast cancer." *N Engl J Med* **353**(3): 229-37.
- Harvey JM, Clark GM, Osborne CK und Allred DC (1999). "Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer." *J Clin Oncol* **17**(5): 1474-81.
- Hatteville L, Mahe C und Hill C (2002). "Prediction of the long-term survival in breast cancer patients according to the present oncological status." *Stat Med* **21**(16): 2345-54.
- Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA und Haldosen LA (2005). "Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11." *Oncogene* **24**(44): 6605-16.
- Hengst L (2004). "A second RING to destroy p27(Kip1)." *Nat Cell Biol* **6**(12): 1153-5.
- Hengst L und Reed SI (1996). "Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle." *Science* **271**(5257): 1861-4.
- Henson DE, Ries L, Freedman LS und Carriaga M (1991). "Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index." *Cancer* **68**(10): 2142-9.
- Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, et al. (2001). "Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas." *Cancer* **91**(9): 1745-51.
- Hodges LC, Cook JD, Lobenhofer EK, et al. (2003). "Tamoxifen functions as a molecular agonist inducing cell cycle-associated genes in breast cancer cells." *Mol Cancer Res* **1**(4): 300-11.
- Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, et al. (2004). "Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer." *Clin Cancer Res* **10**(22): 7490-9.
- Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, et al. (2001). "Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer." *Cancer Res* **61**(14): 5331-5.
- Hui R, Finney GL, Carroll JS, et al. (2002). "Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells." *Cancer Res* **62**(23): 6916-23.
- Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, et al. (2002). "Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II)." *Jama* **288**(1): 58-66.
- Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, et al. (1996). "Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis." *N Engl J Med* **334**(6): 356-61.

- Hunter T und Pines J (1994). "Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age." *Cell* **79**(4): 573-82.
- Hwang TS, Han HS, Hong YC, Lee HJ und Paik NS (2003). "Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients." *Pathol Int* **53**(2): 74-80.
- Imamov O, Morani A, Shim GJ, et al. (2004). "Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9375-80.
- Iwase H, Zhang Z, Omoto Y, et al. (2003). "Clinical significance of the expression of estrogen receptors alpha and beta for endocrine therapy of breast cancer." *Cancer Chemother Pharmacol* **52 Suppl 1**: S34-8.
- Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, et al. (1998). "Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification." *Oncogene* **17**(18): 2313-22.
- Jarvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K und Isola J (2000). "Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer." *Am J Pathol* **156**(1): 29-35.
- Jiang W, Zhang YJ, Kahn SM, et al. (1993). "Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 9026-30.
- Jin M, Inoue S, Umemura T, et al. (2001). "Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II." *Lung Cancer* **34**(2): 207-18.
- Jirstrom K, Stendahl M, Ryden L, et al. (2005). "Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification." *Cancer Res* **65**(17): 8009-16.
- Johnson MD, Zuo H, Lee KH, et al. (2004). "Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen." *Breast Cancer Res Treat* **85**(2): 151-9.
- Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massague J und Sherr CJ (1994). "Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation." *Cell* **79**(3): 487-96.
- Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME und McInerney EM (1997). "William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **44**(1): 23-38.
- Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, et al. (1995). "Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies." *Cancer Res* **55**(11): 2266-9.
- Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, et al. (1999). "Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer." *Clin Cancer Res* **5**(8): 2069-76.
- Kilker RL, Hartl MW, Rutherford TM und Planas-Silva MD (2004). "Cyclin D1 expression is dependent on estrogen receptor function in tamoxifen-resistant breast cancer cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**(1-2): 63-71.
- Kilker RL und Planas-Silva MD (2006). "Cyclin D1 is necessary for tamoxifen-induced cell cycle progression in human breast cancer cells." *Cancer Res* **66**(23): 11478-84.
- Kollias J, Murphy CA, Elston CW, et al. (1999). "The prognosis of small primary breast cancers." *Eur J Cancer* **35**(6): 908-12.
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vantoros G, et al. (2003). "Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation." *Eur J Cancer* **39**(9): 1251-8.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, et al. (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15677-82.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* **138**(3): 863-70.
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S und Gustafsson JA (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5925-30.
- Lee A, Park WC, Yim HW, et al. (2007). "Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast." *Jpn J Clin Oncol* **37**(9): 708-14.
- Leivonen M, Nordling S, Lundin J, von Boguslawski K und Haglund C (2001). "p27 expression correlates with short-term, but not with long-term prognosis in breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **67**(1): 15-22.
- Leong AC, Hanby AM, Potts HW, et al. (2000). "Cell cycle proteins do not predict outcome in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast." *Int J Cancer* **89**(1): 26-31.

- Lewis JS und Jordan VC (2005). "Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance." *Mutat Res* **591**(1-2): 247-63.
- Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH und Murphy LC (1998). "Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis." *Cancer Res* **58**(15): 3197-201.
- Liang J und Slingerland JM (2003). "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression." *Cell Cycle* **2**(4): 339-45.
- Lim YC, Desta Z, Flockhart DA und Skaar TC (2005). "Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen." *Cancer Chemother Pharmacol* **55**(5): 471-8.
- Lim YC, Li L, Desta Z, et al. (2006). "Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells." *J Pharmacol Exp Ther* **318**(2): 503-12.
- Lin DI, Barbash O, Kumar KG, et al. (2006). "Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex." *Mol Cell* **24**(3): 355-66.
- Liu MM, Albanese C, Anderson CM, et al. (2002). "Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression." *J Biol Chem* **277**(27): 24353-60.
- Loveday RL, Greenman J, Simcox DL, et al. (2000). "Genetic changes in breast cancer detected by comparative genomic hybridisation." *Int J Cancer* **86**(4): 494-500.
- Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G und Bartek J (1994). "Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines." *Oncogene* **9**(3): 707-18.
- Malumbres M und Barbacid M (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." *Nat Rev Cancer* **1**(3): 222-31.
- Malumbres M und Pellicer A (1998). "RAS pathways to cell cycle control and cell transformation." *Front Biosci* **3**: d887-912.
- Mann S, Laucirica R, Carlson N, et al. (2001). "Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer." *Hum Pathol* **32**(1): 113-8.
- Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH und Kay RG (1983). "Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer." *Cancer Res* **43**(6): 2985-90.
- Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, et al. (2002). "Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis." *Cancer Res* **62**(13): 3819-25.
- McCarty KS, Jr., Miller LS, Cox EB, Konrath J und McCarty KS, Sr. (1985). "Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies." *Arch Pathol Lab Med* **109**(8): 716-21.
- McDonnell DP (1998). "Definition of the molecular mechanism of action of tissue-selective oestrogen-receptor modulators." *Biochem Soc Trans* **26**(1): 54-60.
- McPherson K, Steel CM und Dixon JM (2000). "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics." *Bmj* **321**(7261): 624-8.
- Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, et al. (1996). "A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer." *Br J Cancer* **73**(6): 728-34.
- Molino A, Micciolo R, Turazza M, et al. (1997). "Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis." *Int J Cancer* **74**(4): 433-7.
- Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, et al. (1998). "Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms." *Biochem Biophys Res Commun* **247**(1): 75-8.
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al. (1991). "A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene." *Nature* **350**(6318): 512-5.
- Murphy LC, Leygue E, Niu Y, et al. (2002). "Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer." *Br J Cancer* **87**(12): 1411-6.
- Murphy LC, Peng B, Lewis A, et al. (2005). "Inducible upregulation of oestrogen receptor-beta1 affects oestrogen and tamoxifen responsiveness in MCF7 human breast cancer cells." *J Mol Endocrinol* **34**(2): 553-66.
- Murphy LC und Watson PH (2006). "Is oestrogen receptor-beta a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer?" *Endocr Relat Cancer* **13**(2): 327-34.

- Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, et al. (1993). "Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression." *Mol Cell Biol* **13**(6): 3577-87.
- Musgrove EA, Lee CS, Buckley MF und Sutherland RL (1994). "Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8022-6.
- Myers E, Fleming FJ, Crotty TB, et al. (2004). "Inverse relationship between ER-beta and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer." *Br J Cancer* **91**(9): 1687-93.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, et al. (1996). "Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors." *Cell* **85**(5): 707-20.
- Nakopoulou L, Lazaris AC, Panayotopoulou EG, et al. (2004). "The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer." *J Clin Pathol* **57**(5): 523-8.
- Neuman E, Ladha MH, Lin N, et al. (1997). "Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4." *Mol Cell Biol* **17**(9): 5338-47.
- Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, et al. (1994). "Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer." *J Clin Oncol* **12**(5): 888-94.
- O'Connell P, Pekkeli V, Fuqua SA, et al. (1998). "Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci." *J Natl Cancer Inst* **90**(9): 697-703.
- O'Neill PA, Davies MP, Shaaban AM, et al. (2004). "Wild-type oestrogen receptor beta (ERbeta1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers." *Br J Cancer* **91**(9): 1694-702.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. (1998). "The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1): 122-6.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betax: a potential inhibitor of estrogen action in human." *Nucleic Acids Res* **26**(15): 3505-12.
- Omoto Y, Eguchi H, Yamamoto-Yamaguchi Y und Hayashi S (2003). "Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7." *Oncogene* **22**(32): 5011-20.
- Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, et al. (2001). "Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer." *Cancer Lett* **163**(2): 207-12.
- Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S, et al. (2002). "Evaluation of oestrogen receptor beta wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers." *Eur J Cancer* **38**(3): 380-6.
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA und Shou J (2001). "Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation." *Clin Cancer Res* **7**(12 Suppl): 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
- Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K, Arnold A und Koerner F (1998). "Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast." *Cancer Res* **58**(13): 2876-80.
- Pacilio C, Germano D, Addeo R, et al. (1998). "Constitutive overexpression of cyclin D1 does not prevent inhibition of hormone-responsive human breast cancer cell growth by antiestrogens." *Cancer Res* **58**(5): 871-6.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. (1997). "Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ER-beta at AP1 sites." *Science* **277**(5331): 1508-10.
- Palmieri C, Lam EW, Mansi J, et al. (2004). "The expression of ER beta cx in human breast cancer and the relationship to endocrine therapy and survival." *Clin Cancer Res* **10**(7): 2421-8.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J und Pisani P (2005). "Global cancer statistics, 2002." *CA Cancer J Clin* **55**(2): 74-108.
- Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, et al. (2004). "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." *Cancer Res* **64**(1): 423-8.
- Pelosio P, Barbareschi M, Bonoldi E, et al. (1996). "Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node-positive breast carcinoma treated with adjuvant therapy." *Ann Oncol* **7**(7): 695-703.
- Peng B, Lu B, Leygue E und Murphy LC (2003). "Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms." *J Mol Endocrinol* **30**(1): 13-29.
- Pettersson K, Delaunay F und Gustafsson JA (2000). "Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling." *Oncogene* **19**(43): 4970-8.
- Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A und Larsimont D (2001). "The predictive value of HER2 in breast cancer." *Oncology* **61** Suppl 2: 73-82.

- Pinder SE, Murray S, Ellis IO, et al. (1998). "The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy." *Cancer* **83**(8): 1529-39.
- Pohl G, Rudas M, Dietze O, et al. (2003). "High p27Kip1 expression predicts superior relapse-free and overall survival for premenopausal women with early-stage breast cancer receiving adjuvant treatment with tamoxifen plus goserelin." *J Clin Oncol* **21**(19): 3594-600.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al. (1994). "p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest." *Genes Dev* **8**(1): 9-22.
- Ponce-Castaneda MV, Lee MH, Latres E, et al. (1995). "p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors." *Cancer Res* **55**(6): 1211-4.
- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, et al. (1997). "Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients." *Nat Med* **3**(2): 222-5.
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, et al. (1993). "Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts." *Genes Dev* **7**(8): 1559-71.
- Ravaioli A, Monti F, Regan MM, et al. (2008). "p27 and Skp2 immunoreactivity and its clinical significance with endocrine and chemo-endocrine treatments in node-negative early breast cancer." *Ann Oncol* **19**(4): 660-8.
- Reed W, Florens VA, Holm R, Hannisdal E und Nesland JM (1999). "Elevated levels of p27, p21 and cyclin D1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients." *Virchows Arch* **435**(2): 116-24.
- Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, et al. (2000). "The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years." *Cancer* **88**(4): 804-13.
- Robert-Koch-Institut ABKiDiZmd (2004). "Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends."
- Roger P, Sahla ME, Makela S, et al. (2001). "Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors." *Cancer Res* **61**(6): 2537-41.
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." *N Engl J Med* **353**(16): 1673-84.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. (2003). "The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy." *Oncologist* **8**(4): 307-25.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *Jama* **288**(3): 321-33.
- Rudas M, Lehnert M, Huynh A, et al. (2008). "Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy." *Clin Cancer Res* **14**(6): 1767-74.
- Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J und Pavletich NP (1996). "Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex." *Nature* **382**(6589): 325-31.
- Schiff R, Massarweh SA, Shou J, et al. (2005). "Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators." *Cancer Chemother Pharmacol* **56 Suppl 1**: 10-20.
- Schiff RaF, S. A. W. (2002). "The Importance of the Estrogen Receptor in Breast Cancer." *In: Breast Cancer; ed. by Pasqualini J. R.*: 149-186.
- Schmider-Ross A, Pirsig O, Gottschalk E, et al. (2006). "Cyclin-dependent kinase inhibitors CIP1 (p21) and KIP1 (p27) in ovarian cancer." *J Cancer Res Clin Oncol* **132**(3): 163-70.
- Schuuring E (1995). "The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes--a review." *Gene* **159**(1): 83-96.
- Schwartz GF, Giuliano AE und Veronesi U (2002). "Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast, April 19-22, 2001, Philadelphia, Pennsylvania." *Cancer* **94**(10): 2542-51.
- Seshadri R, Lee CS, Hui R, et al. (1996). "Cyclin D1 amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis." *Clin Cancer Res* **2**(7): 1177-84.
- Sgambato A, Zhang YJ, Arber N, et al. (1997). "Deregulated expression of p27(Kip1) in human breast cancers." *Clin Cancer Res* **3**(10): 1879-87.
- Sgambato A, Zhang YJ, Ciaparrone M, et al. (1998). "Overexpression of p27Kip1 inhibits the growth of both normal and transformed human mammary epithelial cells." *Cancer Res* **58**(15): 3448-54.

- Shaaban AM, O'Neill PA, Davies MP, et al. (2003). "Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia." *Am J Surg Pathol* **27**(12): 1502-12.
- Sherr CJ (1996). "Cancer cell cycles." *Science* **274**(5293): 1672-7.
- Sherr CJ, Matsushime H und Roussel MF (1992). "Regulation of CYL/cyclin D genes by colony-stimulating factor 1." *Ciba Found Symp* **170**: 209-19; discussion 219-26.
- Sherr CJ und Roberts JM (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-12.
- Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, et al. (1995). "Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast." *Cell* **82**(4): 621-30.
- Skliris GP, Carder PJ, Lansdown MR und Speirs V (2001). "Immunohistochemical detection of ERbeta in breast cancer: towards more detailed receptor profiling?" *Br J Cancer* **84**(8): 1095-8.
- Skliris GP, Munot K, Bell SM, et al. (2003). "Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model." *J Pathol* **201**(2): 213-20.
- Slamon D EW, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Pawlicki M et al. (2006). "BCIRG006: 2nd interim analysis phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC/T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC/TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in Her2/neu positive early breast cancer patients." *SABCS 2006 abstr.* **52**.
- Slingerland J und Pagano M (2000). "Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer." *J Cell Physiol* **183**(1): 10-7.
- Smith I, Procter M, Gelber RD, et al. (2007). "2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial." *Lancet* **369**(9555): 29-36.
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. (1998). "Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies." *Jama* **279**(7): 535-40.
- Spataro VJ, Litman H, Viale G, et al. (2003). "Decreased immunoreactivity for p27 protein in patients with early-stage breast carcinoma is correlated with HER-2/neu overexpression and with benefit from one course of perioperative chemotherapy in patients with negative lymph node status: results from International Breast Cancer Study Group Trial V." *Cancer* **97**(7): 1591-600.
- Speirs V, Skliris GP, Burdall SE und Carder PJ (2002). "Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland." *J Clin Pathol* **55**(5): 371-4.
- Speirs V und Walker RA (2007). "New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast." *J Pathol* **211**(5): 499-506.
- Spirin KS, Simpson JF, Takeuchi S, et al. (1996). "p27/Kip1 mutation found in breast cancer." *Cancer Res* **56**(10): 2400-4.
- Steeg PS und Zhou Q (1998). "Cyclins and breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **52**(1-3): 17-28.
- Stendahl M, Kronblad A, Ryden L, et al. (2004). "Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients." *Br J Cancer* **90**(10): 1942-8.
- Stossi F, Barnett DH, Frasor J, et al. (2004). "Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors." *Endocrinology* **145**(7): 3473-86.
- Strom A, Hartman J, Foster JS, et al. (2004). "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1566-71.
- Sugiura H, Toyama T, Hara Y, et al. (2007). "Expression of estrogen receptor beta wild-type and its variant ERbeta2 is correlated with better prognosis in breast cancer." *Jpn J Clin Oncol* **37**(11): 820-8.
- Swerdlow SH und Williams ME (2002). "From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades." *Hum Pathol* **33**(1): 7-20.
- Tan P, Cady B, Wanner M, et al. (1997). "The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas." *Cancer Res* **57**(7): 1259-63.
- Toyoshima H und Hunter T (1994). "p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21." *Cell* **78**(1): 67-74.
- Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, et al. (1998). "Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma." *Cancer Res* **58**(3): 542-8.

- Tsuchiya A, Zhang GJ und Kanno M (1999). "Prognostic impact of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in node-positive breast cancer." *J Surg Oncol* **70**(4): 230-4.
- Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y und Yoshida H (2002). "Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients." *Int J Cancer* **98**(3): 415-8.
- Umekita Y und Yoshida H (2000). "Cyclin D1 expression in ductal carcinoma in situ, atypical ductal hyperplasia and usual ductal hyperplasia: an immunohistochemical study." *Pathol Int* **50**(7): 527-30.
- van Diest PJ, Michalides RJ, Jannink L, et al. (1997). "Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value." *Am J Pathol* **150**(2): 705-11.
- Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, et al. (2008). "Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole." *J Clin Oncol* **26**(34): 5569-75.
- Viglietto G, Motti ML und Fusco A (2002). "Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization." *Cell Cycle* **1**(6): 394-400.
- Vinayagam R, Sibson DR, Holcombe C, Aachi V und Davies MP (2007). "Association of oestrogen receptor beta 2 (ER beta 2/ER beta cx) with outcome of adjuvant endocrine treatment for primary breast cancer--a retrospective study." *BMC Cancer* **7**: 131.
- Volpi A, De Paola F, Nanni O, et al. (2000). "Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study." *Breast Cancer Res Treat* **63**(3): 181-92.
- Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, et al. (1994). "Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice." *Nature* **369**(6482): 669-71.
- Weigel NL (1996). "Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation." *Biochem J* **319** (Pt 3): 657-67.
- Weinberg RA (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." *Cell* **81**(3): 323-30.
- Weiss RB, Woolf SH, Demakos E, et al. (2003). "Natural history of more than 20 years of node-positive primary breast carcinoma treated with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil-based adjuvant chemotherapy: a study by the Cancer and Leukemia Group B." *J Clin Oncol* **21**(9): 1825-35.
- WHO (2003). "World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs." 9-112.
- Wilcken NR, Prall OW, Musgrove EA und Sutherland RL (1997). "Inducible overexpression of cyclin D1 in breast cancer cells reverses the growth-inhibitory effects of antiestrogens." *Clin Cancer Res* **3**(6): 849-54.
- Williams ME, Swerdlow SH, Rosenberg CL und Arnold A (1993). "Chromosome 11 translocation breakpoints at the PRAD1/cyclin D1 gene locus in centrocytic lymphoma." *Leukemia* **7**(2): 241-5.
- Wu J, Shen ZZ, Lu JS, et al. (1999). "Prognostic role of p27Kip1 and apoptosis in human breast cancer." *Br J Cancer* **79**(9-10): 1572-8.
- Yamanouchi H, Furihata M, Fujita J, et al. (2001). "Expression of cyclin E and cyclin D1 in non-small cell lung cancers." *Lung Cancer* **31**(1): 3-8.
- Yamauchi H, Stearns V und Hayes DF (2001). "When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer." *J Clin Oncol* **19**(8): 2334-56.
- Yang CC, Chu KC, Chen HY und Chen WC (2002). "Expression of p16 and cyclin D1 in bladder cancer and correlation in cancer progression." *Urol Int* **69**(3): 190-4.
- Yang RM, Naitoh J, Murphy M, et al. (1998). "Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer." *J Urol* **159**(3): 941-5.
- Yu Q, Geng Y und Sicinski P (2001). "Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation." *Nature* **411**(6841): 1017-21.
- Zhang SY, Caamano J, Cooper F, Guo X und Klein-Szanto AJ (1994). "Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer." *Am J Clin Pathol* **102**(5): 695-8.
- Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, et al. (1993). "Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma." *Biochem Biophys Res Commun* **196**(2): 1010-6.
- Zhao C, Lam EW, Sunter A, et al. (2003). "Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation." *Oncogene* **22**(48): 7600-6.
- Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M, et al. (1995). "Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene." *Mod Pathol* **8**(5): 560-7.

- Zwijssen RM, Buckle RS, Hijmans EM, Loomans CJ und Bernards R (1998). "Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1." Genes Dev **12**(22): 3488-98.
- Zwijssen RM, Wientjens E, Klompmaker R, et al. (1997). "CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1." Cell **88**(3): 405-15.

Anhang

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Sandra Itzel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Expression von Cyclin D1, p27 und ER β im hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift