

1. Einleitung

1.1. Gegenwärtige Bedeutung und Epidemiologie des Mammakarzinoms

Weltweit erkrankt jede 8.-10. Frau (12 %) im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom^{1,2,3}. Entsprechend aktueller Daten sind jährlich 110 pro 100 000 Frauen von dieser bösartigen Tumorerkrankung betroffen. In der Bundesrepublik Deutschland treten circa 43 000 Neuerkrankungen pro Jahr auf, wobei etwa 6 % der Frauen jünger als 40 Jahre sind. Die Statistiken sprechen für eine Zunahme insbesondere bei jüngeren Frauen. Für Frauen zwischen dem 35. und 54. Lebensjahr ist Brustkrebs mit circa 15 000 jährlichen Todesfällen die häufigste Todesursache überhaupt^{4,5}.

In den Vereinigten Staaten wurden im Jahr 1990 etwa 175 900 Brustkrebsneuerkrankungen registriert; ein Drittel dieser Patientinnen wird an ihrer Tumorerkrankung versterben⁶. Weltweite epidemiologische Untersuchungen über die Häufigkeit des Mammakarzinoms haben gezeigt, daß die Inzidenz in den westlichen Industrieländern deutlich höher liegt als in den Entwicklungsländern und in Japan⁷.

Es ist eine steigende altersabhängige Inzidenzzunahme zu verzeichnen, die sich nicht allein mit der Zunahme älterer Menschen in unserer Bevölkerung und mit einem verbreiterten Screeningprogramm erklären läßt, und deren Ursache damit letztendlich noch ungeklärt ist.

Die jährlichen Sterbefälle nehmen mit zunehmendem Alter kontinuierlich zu (**Tabelle 1**); die Wahrscheinlichkeit einer 5- bzw. 10- Jahresüberlebensrate (5- bzw. 10-JÜR) hängt signifikant vom Ausbreitungsstadium der Tumorerkrankung zum Zeitpunkt der Erstmanifestation ab (**Tabelle 2**)⁴.

Tabelle 1 : Jährliche Sterbefälle beim Mammakarzinom in Abhängigkeit von der Altersverteilung

Altersklassen	jährliche Sterbefälle pro 100 000 Frauen	Altersklassen	jährliche Sterbefälle pro 100 000 Frauen
0 - 20 Jahre	0,0	55 - 60 Jahre	69,4
20 - 25 Jahre	0,1	60 – 65 Jahre	86,0
25 - 30 Jahre	0,9	65 – 70 Jahre	105,9
30 - 35 Jahre	5,0	70 – 75 Jahre	101,6
35 - 40 Jahre	14,4	75 – 80 Jahre	148,5
40 - 45 Jahre	26,3	80 – 85 Jahre	168,8
45 - 50 Jahre	33,3	85 – 90 Jahre	217,8
50 - 55 Jahre	45,1	> 90 Jahre	269,8

Tabelle 2 : Überlebenswahrscheinlichkeit beim Mammakarzinom in Abhängigkeit vom Ausbreitungsstadium (5 - bzw. 10 - JÜR)

Überlebens - wahrscheinlichkeit	5 – Jahresüberlebensrate in %	10 – Jahresüberlebensrate in %
Alle Patientinnen	82	71
Stadium T1 N0 M0	98	93
Stadium T2 N0 M0	91	81
Stadium T2 N1 M0	73	66
Stadium T4 N1 M0	50	26
Fernmetastasen M1	32	19

Es ist nicht gesichert, ob das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken tatsächlich zugenommen hat. Daß heute mehr Frauen an einem Mammakarzinom erkranken, läßt sich mit der verbesserten modernen Diagnostik, dem höheren Altersdurchschnitt und der längeren Lebenserwartung in der Bevölkerung erklären.

1.2. Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms

Epidemiologische Studien zeigen, daß die Entstehung eines Mammakarzinoms ein **multifaktorielles** Geschehen ist. Eine große Anzahl an Studien befaßt sich mit der Analyse von Risikofaktoren, die eine Vorhersage gestatten, welche Frauen hinsichtlich einer Mammakarzinomerkrankung besonders gefährdet sind.

Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen (**Tabelle 3**)⁴ :

Tabelle 3 : Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms
Relatives Risiko bei einem „normalen Risiko“ von 1,0

1.	BRCA 1/2 (breast cancer gene) – Mutationsträgerinnen	(Risiko 1 : 7)
2.	bilaterales Mammakarzinom (kontralaterale Brust)	(Risiko 1 : 5)
3.	Familiäre Belastung (Mutter, Schwester)	(Risiko 1 : 4)
4.	Atypische duktale / lobuläre Hyperplasie	(Risiko 1 : 3)
5.	Zweitmalignom in der Anamnese (Uterus, Darm)	(Risiko 1 : 3)
6.	Deutliche Adipositas	(Risiko 1 : 2)
7.	Nullipara, Erstgebärende > 30 Jahre	(Risiko 1 : 2)
8.	Frühe Menarche (< 12 J.), späte Menopause (> 52 J.)	(Risiko 1 : 2)
9.	Alter > 50 Jahre	(Risiko 1 : 2)
10.	Hormonsubstitution	(Risiko 1 :1,5)

Die Mehrzahl der Mammakarzinome wird nicht familiär vererbt, sondern tritt sporadisch auf. Allerdings läßt sich bei circa 5 - 10 % aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom eine **familiäre genetische Prädisposition** nachweisen⁸. Hierbei spielen die Tumorsuppressorgene **BRCA 1** und **BRCA 2 (Breast Cancer gene 1/2)** eine besondere Rolle. Tumorsuppressorgene sind ein normaler Bestandteil des menschlichen Genoms und schützen die menschliche Zelle vor einer unkontrollierten Zellteilung. Bei einem vollständigen Funktionsverlust dieses Gens durch Mutation, kommt es zur Aufhebung der Tumorsuppression und damit zur malignen Transformation der Zelle⁹.

Bei einem großen Teil der Studien, die sich mit der Problematik des **familiären Risikos** beschäftigen, wird der Verwandtschaftsgrad, die Anzahl und das Erkrankungsalter der betroffenen Familienmitglieder sowie bereits familiär aufgetretene Mammakarzinome als Prädiktoren berücksichtigt¹⁰. Das Risiko einer familiär belasteten Frau, an einem Mammakarzinom zu erkranken, ist insgesamt etwa 2- bis 4- mal höher als bei nicht familiär vorbelasteten Frauen¹¹.

Claus et al. ermittelten in einer großen populationsbezogenen Fallkontrollstudie mit 4 730 Brustkrebspatientinnen, die im Alter zwischen 20 und 54 Jahren erkrankten, daß das **Erkrankungsalter** der stärkste Indikator eines familiär erhöhten Brustkrebsrisikos ist¹². Es wird angenommen, daß besonders bei jungen Frauen die Erkrankung an einem Mammakarzinom am ehesten genetisch bedingt ist.

Auch **endokrine Faktoren** spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Das physiologische Wachstumsstimulans für das natürliche Brustwachstum sind die Östrogene. Die Bedeutung der Östrogene für die mögliche Entstehung eines Mammakarzinoms wird seit vielen Jahren und in neueren Arbeiten kontrovers diskutiert. Indizien für eine mögliche Promotion malignen Wachstums liefern epidemiologische Untersuchungen, die auf eine Risikoverminderung durch Ovariectomie in jungen Jahren hinweisen.

Die frühe **Menarche** und die späte **Menopause** werden als nicht unerhebliche Risikofaktoren gewertet, da die endogene hormonale Stimulation auf den Körper verlängert ist.

Offenbar ist auch die **Parität** und das **Alter** zum Zeitpunkt der ersten Geburt von Bedeutung. Ein protektiver Effekt wird der Multiparität sowie ausgetragenen Schwangerschaften im Alter unter 30 Jahren (vor allem vor dem 18. Lebensjahr) zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß das Erkrankungsrisiko bei Nulliparität und bei einem Erstgebäralter über dem 35. Lebensjahr signifikant ansteigt.

Da das **Stillen** mit einem erhöhten Prolaktinspiegel im Serum einhergeht und die Rolle des Prolaktins als eventueller Tumorigen in Tiermodellen noch unklar ist, ist seine Bedeutung beim Menschen umstritten.

Diätische Faktoren und der damit gesteigerte Fettverbrauch in Industrieländern spiegeln das Nord-Süd-Gefälle mit einer deutlich geringeren Mortalitätsrate in südlichen Ländern im Vergleich zu nordwesteuropäischen Ländern und den Vereinigten Staaten wider¹⁴.

Nach Kelsey et al.¹³ spielen Ernährungsfaktoren eine wesentliche Rolle. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß insbesondere postmenopausale Frauen mit **Adipositas** mit einem 2- bis 3- fach höheren Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms behaftet sind. Die pathogenetische Bedeutung liegt in einer im peripheren Fettgewebe lokalisierten verstärkten Aromatisierung der Androgenvorstufe Androstendion in die Östrogene. Diese Östrogene können das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms erhöhen¹⁴. Auch das Risiko für die Entstehung eines **kontralateralen Mammakarzinoms** ist bei denjenigen Frauen erhöht, die bereits an einem Mammakarzinom erkrankt sind. In der Literatur wird auf eine weite Spanne der Inzidenzraten zwischen 0,3 % und 20 % hingewiesen^{15,16,17}.

1.3. Klassifikation der Mammakarzinome *nach der WHO*

Das Mammakarzinom ist in seinem klinischen und morphologischen Erscheinungsbild sehr vielfältig. Aus systematischen Gründen wurde von der *WHO* im Jahr 1981 eine histologische und zugleich biologische Klassifikation erarbeitet¹⁸.

Diese Klassifikation sieht folgende Einteilung der Mammakarzinome vor :

A. nicht invasive Mammakarzinome :

Carcinoma ductale in situ (CDIS)

Carcinome lobulare in situ (CLIS)

B. invasive Mammakarzinome :

häufige Karzinome (80 %) : invasiv duktales Mammakarzinom

invasiv lobuläres Mammakarzinom

seltene Karzinome (20 %) : muzinöses Mammakarzinom

medulläres Mammakarzinom

papilläres Mammakarzinom

tubuläres Mammakarzinom

apokrines Mammakarzinom

C. Morbus Paget der Mamille

Die WHO-Klassifikation bezieht sich lediglich auf den histologischen Phänotyp des Tumors; pathogenetische Beziehungen werden nicht berücksichtigt. Aus diesen Gründen wurde eine Erweiterung der WHO-Klassifikation von 1981 vorgenommen. Die derzeit gültige modifizierte histologische WHO-Klassifikation der nicht-invasiven und invasiven Mammakarzinome nach *Rosen und Oberman*¹⁹ (1992) ist im Folgenden dargestellt :

A. Nicht-invasive Karzinome

- intraduktales Karzinom mit Paget-Erkrankung der Brustwarze (CDIS)
- lobuläres Carcinoma in situ (CLIS)

B. Invasive Karzinome

- invasives duktales Karzinom mit Paget-Erkrankung der Brustwarze
- invasives duktales Karzinom mit prädominierender intraduktalen Komponente
- invasives lobuläres Karzinom
- muzinöses Karzinom
- medulläres Karzinom
- invasives papilläres Karzinom
- tubuläres Karzinom
- adenoid-zystisches Karzinom
- invasives kribriiformes Karzinom
- apokrines Karzinom
- lipidreiches Karzinom
- glykogenreiches Karzinom

Die histopathologische Morphologie des Mammakarzinoms unterscheidet zwischen **nicht-invasiven und invasiven Mammakarzinomen**.

Bei **nicht-invasiven Mammakarzinomen** werden duktales (CDIS) und lobuläres Carcinoma in situ (CLIS) differenziert, die vielfältige Unterschiede in ihrer biologischen Potenz aufweisen.

Das CDIS ist definiert als Karzinom innerhalb der Brustdrüsengänge ohne Stromainvasion. Es unterscheidet sich vom typischerweise inapparenten CLIS durch seine klinische Präsentation. Etwa 70-95 % der CDIS weisen mammographische Mikrokalzifikationen auf. In den letzten Jahren ist durch den breiten Einsatz der Mammographie als Früherkennungs-Screeningmethode die Detektionsrate an CDIS auf circa 20-30 % angestiegen^{4,20}. Aufgrund retrospektiver Langzeitbeobachtungen ist bei unbehandeltem CDIS von einem 30-50 %igen Risiko eines nachfolgenden Karzinoms auszugehen²¹.

Das CLIS ist ein die intralobulären Ductuli einbeziehendes Karzinom ohne Stromainvasion. Die Inzidenz des CLIS ist nicht genau bekannt, da es sich hierbei um eine meist nicht palpable Läsionen handelt und im Gegensatz zum CDIS nicht zu Kalzifikationen in der Mammographie führt. Aus diesen Gründen ist das CLIS ein meist mikroskopischer Zufallsbefund ohne klinisch oder mammographisch eindeutige Hinweise. Erstmals von *Foote und Steward* 1941²² beschrieben, ging man zunächst von einer erheblichen Potenz zur Tumorprogression in ein invasives Karzinom aus. Diese Vorstellung bewahrheitete sich in den darauffolgenden Jahrzehnten jedoch nicht. Allerdings bestätigte sich die Neigung des CLIS zur Multizentrität und zum bilateralen Auftreten. In 50-80 % wurden multizentrische Herde in Mammapräparaten beobachtet; in 30-70 % der Fälle wurde ein CLIS in der kontralateralen Brust diagnostiziert¹⁹. Das CLIS stellt ebenfalls eine Präkanzerose dar, deren Prognose allerdings im Vergleich zum CDIS günstiger ist. In der Mehrzahl der Fälle stellt das CLIS einen Faktor für ein erhöhtes Karzinomrisiko dar²³.

Bei den **invasiven Mammakarzinomen** kommt das invasiv duktales Karzinom häufiger vor als das invasiv lobuläre Karzinom. Weitere Karzinomformen wie das medulläre, das tubuläre, das muzinöse und das papilläre Mammakarzinom sind bei weitem seltener. Sonderformen sind das Paget-Karzinom, das einem in die Mamille eingewachsenen duktales Karzinom mit Hautbeteiligung entspricht, und das inflammatorische Mammakarzinom, das durch erysipelartige Veränderungen der Brusthaut mit histologischem Hautbefall und begleitender Lymphangiosis carcinomatosa der Haut charakterisiert ist.

1.4. Klassische Prognoseparameter

Prognoseparameter sind Gradmesser, die versuchen, den Verlauf einer Erkrankung prognostisch zu determinieren. Sie definieren sich aus dem Ausbreitungsstadium (Tumorgröße, regionale und hämatogene Metastasierung) wie aus den tumoreigenen Texturen und biologischen Kriterien (histopathologische Klassifikation, Tumorgrading, Hormonrezeptorstatus, Wachstumsfaktoren und Invasivität).

Die prognostische Beurteilung des Mammakarzinoms hat die Abschätzung des potentiellen Malignitätsgrades zur Voraussetzung. Zur Erfassung des spezifischen Malignitätsgrades des Tumors ist eine zuverlässige prospektive Verlaufsbeobachtung notwendig. Im Hinblick auf das Mammakarzinom bedeutet es den Gewinn verlässlicher Aussagen über die Chancen eines rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens der betroffenen Patientin.

Prognosefaktoren lassen sich in sog. **„klassische“ und „moderne“ Prognosefaktoren** unterteilen⁴:

Zu den **klassischen Prognosefaktoren** gehören **histopathologische Kriterien** wie die Tumorgröße, der Nodalstatus, die Fernmetastasierung, der histologischer Typ, das histologische Tumorgrading, der Hormonrezeptorstatus und die Wachstumsfraktion.

1.4.1. TNM-Klassifikation

Mit Hilfe der **TNM-Klassifikation** *nach der WHO*²⁴ wird ein Mammakarzinom histopathologisch beschrieben. Sie beurteilt die **Tumorgröße (T)** anhand der Messung der invasiven Tumorkomponente, den **Nodalstatus (N)** an exstirpierten regionären Lymphknoten der Axilla (Level I-Level III) und die **Metastasierung (M)** anhand einer Identifizierung von Fernmetastasen durch Staginguntersuchungen.

Die TNM-Klassifikation sieht folgende Einteilung vor (**Tabelle 4**) :

Tabelle 4 : TNM - Klassifikation *nach der WHO* ²⁴

T1	Karzinome ≤ 2 cm
T2	Karzinome > 2 cm und ≤ 5 cm
T3	Karzinome > 5 cm
T4	Karzinome mit Infiltration der Brustwand (Rippen, M. serratus anterior, Mm. intercostales) oder der Haut (<u>nicht</u> jedoch M. pectorales major / minor)
T4a	Infiltration der Brustwand
T4b	mit Ödem, Peau d'orange, Ulzerationen der Brusthaut
T4c	Kriterien von T4a und T4b gemeinsam
T4d	inflammatorisches Mammakarzinom
N1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
N2	Metastasen in fixierten axillären Lymphknoten
N3	Lymphknotenmetastasen entlang der Arteria mammaria interna
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.4.2. Histologisches Grading

Das **histopathologische Grading (G)** zur Beurteilung des Malignitätsgrades invasiver Mammakarzinome aller histologischer Typen erfolgt nach der seit 1957 international bewährten *Gradeinteilung von Bloom und Richardson* ²⁵.

Dazu werden histo- und zytomorphologische Merkmale wie Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate beurteilt und einem Score-Wert zugeordnet. Nach Zuordnung der Scorewerte werden drei Tumordifferenzierungsgrade (G1-G3) unterschieden (**Tabelle 5**) :

Tabelle 5 : Malignitätseinteilung *nach Bloom und Richardson* ²⁵

Grading 1 (G1)	gut differenziertes Karzinom mit geringer Malignität
Grading 2 (G2)	mäßig differenziertes Karzinom mit mittelgradiger Malignität
Grading 3 (G3)	schlecht differenziertes Karzinom mit hoher Malignität

Das Malignitätsgrading bezeichnet die Bösartigkeit eines Tumors; dabei ist der Grad der Bösartigkeit umso höher, je aggressiver der Tumor bzw. seine Metastasierungsfähigkeit ist.

1.4.3. Hormonrezeptorstatus

Die Bestimmung der **Steroidhormonrezeptoren** beim Mammakarzinom hat eine breite klinische und therapeutische Relevanz erlangt. Der Hormonrezeptorstatus zählt zu den wichtigsten unabhängigen Prognoseparametern. Sie ist sowohl zur Beurteilung der Prognose als auch zur Einleitung einer antihormonellen Therapie von Bedeutung^{26, 27}.

Die immunhistochemische Hormonrezeptorbestimmung erfolgt an Formalin-fixiertem Gewebe. Mit dieser Methode wird der Nachweis direkter freier und besetzter Rezeptoren mittels monoklonalen Antikörper erbracht. Für die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wird die Anzahl eindeutig rot gefärbter Nuclei unabhängig vom Färbungsmuster als prozentualer Anteil aller Tumorzellnuclei ausgewertet.

1.4.4. Wachstumsfraktion

Zur Bestimmung der **Wachstumsfraktion** hat sich als immunhistochemisch darstellbarer sensibler Proliferationsaktivitätsmarker der von Gerdes et al.²⁸ 1983 entwickelte Antikörper Ki-67 erwiesen.

Der **monoklonale Antikörper Ki-67** (Kiel; 67. Zellkulturplatte) identifiziert ein proliferationsassoziiertes nukleäres Antigen, das alle Zellen der S-, G₂- und M-Phase sowie einen Teil der Zellen in der G₁-Phase markiert; nicht proliferierende Zellen der G₀-Phase jedoch exprimieren dieses Kernantigen nicht. Der große Vorteil von Ki-67 ist, dass es auch Zellen als wachstumsaktiv erfasst, die sich nicht in der Mitosephase befinden. Für die Bewertung der Wachstumsdynamik liegt der Grenzwert für mehr als 500 gleichmäßig gefärbter positiver Zellen bei < 13 % für eine niedrige und > 13 % für eine hohe Wachstumsfraktion.

Während Ki-67 einfach an Gefrierschnitten nachgewiesen werden kann, erkennt der später entwickelte Antikörper **MIB-1** natives Ki-67-Antigen an Gefrier- und Paraffinschnitten. Ein MIB-1-Index von 10 % entspricht einem negativen Ki-67-Wert, ein Index von 30 % einem positiven Ki-67-Wert.

Gemäß der proliferationsassoziierten Eigenschaft des Antikörpers ist eine eindeutige Differenzierung zwischen der ruhenden und der aktiven Tumorzellpopulation und somit die Beurteilung der Proliferationsaktivität möglich²⁹.

1.5. Moderne Prognoseparameter

Moderne Prognosefaktoren berücksichtigen neben **klinischen Daten** (Alter, Parität, familiäre Belastung) ebenfalls **molekularbiologische Merkmale** (HER-2-neu, BRCA 1 und BRCA 2) sowie **morphometrische Daten** (DNA-Zytometrie).

Moderne Marker sind potentielle Prognosefaktoren und werden in zahlreichen Studien auf ihre prognostische Relevanz hin überprüft.

1.5.1. Molekularbiologische Faktoren

Wichtige Voraussetzung für die Tumorentstehung ist eine Dysfunktion zellulärer Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene, die für die Wachstumsregulation verantwortlich sind^{2,30}. Die Differenzierung normalen Brustdrüsengewebes wird von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren moduliert. Wachstumsfaktoren werden von Proto-Onkogenen kodiert.

In der Genese des Mammakarzinoms ist das **c-erb B2-Gen (Synonym HER-2/neu)**, das den membranständigen c-erb B2-Rezeptor kodiert, von besonderer Bedeutung. Das **Onkogen c-erb B2** wird im normalen Brustdrüsenepithel und in den Myoepithelien in geringen Mengen exprimiert³¹. Die onkogene Aktivierung erfolgt durch Punktmutation oder Überexpression des natürlichen Gens. In circa 20-30 % der primären Mammakarzinome liegt eine Überexpression dieses Onkogens vor. An zahlreichen Kollektiven wird gezeigt, daß die Her-2/neu-Überexpression als klinischer Marker für die Tumoraggressivität dient und insgesamt mit einer ungünstigeren Prognose des Mammakarzinoms korreliert^{32,33,34}. Betrachtet man die Überexpression des c-erb B2-Gens als Prognosefaktor, so korreliert diese mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit der Patientinnen³⁵.

In Studien konnte ein therapeutischer Effekt des humanisierten monoklonalen **c-erbB-2 Antikörper (Herceptin™)** mit Spezifität für den Wachstumsfaktor-Rezeptor p185^{HER2} nachgewiesen werden. Das Wachstum humaner Mammakarzinomzellen, die HER-2/neu überexprimieren, wird durch Herceptin™ in vivo und in vitro gehemmt. **Herceptin™** als Monosubstanz führt in der First-line-Therapie des Her-2/neu-positiven metastasierten

Mammakarzinoms zu einer deutlichen Remissionsrate von 23 %. Durch die Kombination mit Chemotherapien (beispielsweise mit Doxorubicin / Epirubicin oder Paclitaxel) konnten Remissionsraten, Remissionsdauer und Überlebenszeit signifikant verbessert werden³⁶. Die Therapie mit HerceptinTM wird inzwischen auch als palliativer Ansatz beim metastasierenden Mammakarzinom angewendet.

Die **Tumorsuppressorgene BRCA 1 und BRCA 2** sind ursächlich an der Entstehung des familiär gehäuft auftretenden Mammakarzinoms beteiligt. Die BRCA 1- und BRCA 2-Gene gehören in die Klasse der Tumorsuppressorgene und sind normaler Bestandteil des menschlichen Genoms, das die Zellen vor einer unkontrollierten Zellteilung schützt. Mutationen in diesen Genen sind häufig an der Entstehung erblicher Tumorerkrankungen beteiligt. Epidemiologische Studien zeigen, daß Mutationen im BRCA 1-Gen in circa 80 % aller Familien mit Mamma- und Ovarialkarzinom gefunden werden. Beim familiären Mammakarzinom werden in circa 17 % der Fälle Mutationen in BRCA 1 und BRCA 2 entdeckt. Hierbei treten Mutationen im BRCA 1-Gen 1,5 bis 2-fach häufiger auf als im BRCA2-Gen^{37,38}. Mutationen im BRCA 1-Gen führen zu einem gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöhten Risiko für ein Mamma- bzw. Ovarialkarzinom. Hingegen scheinen Mutationen im BRCA 2-Gen mit einem breiteren Tumorspektrum assoziiert zu sein. Hierzu gehören neben den Mamma- und Ovarialkarzinomen vor allem die Lymphome sowie die Pankreas- und Kolonkarzinome³⁹.

1.5.2. DNA als Erbinformation

Menschliche Zellkerne - mit Ausnahme der Keimzellen - enthalten jeweils 2×23 Chromosomen, entsprechend einem doppelten Chromosomensatz. Das Substrat der genetischen Information der Chromosomen wird hauptsächlich von der **DNA** (engl.: **Desoxyribonucleic acid**) gebildet. Der DNA-Gehalt (c) des menschlichen **haploiden** Chromosomensatzes beträgt $1c$. Der DNA-Gehalt einer **diploiden** menschlichen Zelle beträgt $2c$, entsprechend 7,18 Pikogramm ($1 \text{ pg} = 1 \times 10^{-12} \text{ g}$). Der DNA-Index (DI) beträgt 1.

Der Zellzyklus, den die Zellen normalerweise zur Zellvermehrung durchlaufen, ist in verschiedene Zellphasen unterteilt. Die sich teilende Zelle tritt aus einer Ruhephase (G_0) in eine 1. Wachstumsphase (G_1) über, in der sich die Proteinbiosynthese vollzieht. In der folgenden Synthesephase (S) wird der DNA-Gehalt verdoppelt und die Zelle geht in die postsynthetische zweite Wachstumsphase (G_2) über. Anschließend folgt die Mitosephase mit Pro-, Meta-, Ana- und Telophase und Verteilung der DNA auf die Tochterzellen. Es entsteht eine **diploide Zelle**. Findet nach der Synthesephase keine regelrechte Mitose statt oder schließen sich mehrere Synthesephasen aneinander, entstehen **polyploide Zellen**. In manchen Geweben kann es zu einer regelhaften Vervielfältigung des normalen Chromosomensatzes kommen (euploide Polyploidisierung), entsprechend den ganzzahligen Potenzen des $2c$ - Wertes, z.B. $4c$ -, $8c$ -, $16c$ -, $32c$ - Zellen.

Zahlreiche Mechanismen können den normalen DNA-Gehalt eines Zellkerns beeinflussen. Dazu gehören beispielsweise virale Infektionen sowie der Einfluß radiogener Strahlung. Hierbei kann es durch Mutationen zu einer Zellzyklusstörung im Sinne einer abnormalen Replikation kommen, die die Anzahl der Chromosomen im Zellkern verändern können^{40,41,42}. Diese morphologisch erkennbaren Zellkernveränderungen im Sinne spezifischer Kernstrukturveränderungen (s. Kapitel 2.2.) können an der Einzelzelle mikroskopisch nachgewiesen werden.

Im Rahmen der *Onkogenese* kann es zu Veränderungen im Zellgenom des Menschen kommen. Bei einer Veränderung im Sinne einer *malignen Entartung der Zelle* kann das Verhältnis zwischen Chromosomenzahl und DNA-Menge dahingehend schwanken, daß maligne Tumoren neben einer vermehrten Chromosomenzahl auch eine erhöhte DNA-Menge in einzelnen Chromosomen enthalten können. Anhand dieser von der Norm abweichenden Chromosomenzahl der Zellkerne kann bei einem großen Teil bösartiger Tumoren eine sogenannte „**chromosomale Aneuploidie**“ nachgewiesen werden. Die chromosomale Aneuploidie bezeichnet die Abweichung des normalen DNA-Gehaltes (Ploidie) in Form von numerischen oder strukturellen Chromosomenveränderungen innerhalb einer Tumorzelle.

Der DNA-Gehalt **aneuploider Zellen** liegt bei einem Wert von $> 5c$ und $< 9c$ und befindet sich nicht im Bereich ganzzahliger Potenzen. Entsprechend liegt der DNA-Gehalt **hochaneuploider Zellen** in einem Bereich von $> 9c$.

Als „**5c-exceeding rate**“ (**5c-ER**) wird die absolute Zahl der Zellen mit einer DNA-Menge von $> 5c$ und $> 9c$ bezeichnet. Die „**9c-exceeding rate**“ (**9c-ER**) umfaßt ausschließlich Zellen im hochaneuploiden Bereich von $> 9c$.

Das DNA-zytometrische Äquivalent der chromosomalen Aneuploidie wird „**DNA-Aneuploidie**“ genannt. Die DNA-Aneuploidie ist ein Phänomen der einzelnen Zelle und wird mittels DNA-Analysen gemessen und damit objektivierbar.

1.5.3. DNA-Analysen

In den vergangenen Jahren wurden DNA-Analysen zur präziseren Krebsdiagnostik herangezogen. In der Onkologie ist hierbei die präzisere Differenzierung zwischen benignen und malignen Tumorerkrankungen von Bedeutung. Die Bedeutung der DNA-Analyse liegt vor allem in der Dignitätsbestimmung und der Malignitätsgraduierung verschiedenster Tumoren.

Methodisch stehen im Rahmen der DNA-Analysen im wesentlichen zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung :

- die **Flow-Zytometrie** als durchflußzytometrische DNA-Analyse **u n d**
- die **statische DNA-Zytometrie** als computergestützte DNA-Bildanalyse

Bei der **Flow-Zytometrie** wird eine Einzelzellsuspension aus Tumorgewebe mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt, der stöchiometrisch mit der DNA reagiert. Im Flowzytometer wird die Fluoreszenz der durchfließenden Einzelzellsuspension gemessen. Da die Fluoreszenzintensität von der Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes abhängig ist, ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen gemessener Lichtintensität und DNA-Gehalt der Einzelzelle.

Neben der Flow-Zytometrie hat sich im Besonderen die **statische DNA-Zytometrie** als alternative Methode zur Evaluierung des DNA-Gehaltes von Mammakarzinomzellen bewährt⁴³. Auch diese Methode nutzt die stöchiometrische Färbung der Zellkern-DNA, allerdings mit Hilfe der spezifischen Feulgen-Zellkernfärbung. Mittels computergestützter DNA-Bildanalyse kann der DNA-Gehalt eines selektiven Tumorzellkerns gemessen werden.

Die statische DNA-Zytometrie, die sich mit dem Vermessen morphologischer Zellmerkmale befaßt, hat sich als moderne Disziplin in der mikroskopischen Tumordiagnostik bewährt. Hierfür gibt es mehrere Gründe :

- Die DNA-Zytometrie basiert biologisch auf der Tumor-Zytogenetik und ist somit nicht rein empirisch.
- Die DNA-Zytometrie ist als Verfahren standardisiert und reproduzierbar.
- Es stehen objektive Algorithmen zur Meßwertinterpretation zu Verfügung.
- Es liegen ausreichende Studien zur diagnostischen und prognostischen Validierung der DNA-Meßdaten für die meisten Tumoren vor.

Die statische DNA-Zytometrie bietet im Vergleich zur Flow-Zytometrie folgende Vorteile:

- Die DNA-Bestimmung ist gezielt an kleinen Zellpopulationen von zytologischen Präparaten (Frischmaterial / Tupfpräparate) oder Paraffinschnitten möglich.
- Die DNA-Messung jeder Tumorzelle kann visuell kontrolliert werden („direct visualisation“).
- Eine spezifische Selektion von Tumorzellen kann vorgenommen werden.
- Wiederholungsmessungen an einzelnen Zellen bzw. Kontrollmessungen sind möglich.
- Bei Vorliegen weniger Zellen können diese ausnahmslos markiert und vermessen werden.
- Morphometrische Parameter (Kernfläche, Kernentropie und Formfaktor) können zusätzlich exakt bestimmt und berechnet werden.
- In der Flow-Zytometrie sind wegen der unteren Auflösungsgrenze von 1 % selten vorkommende Zellen nicht zu messen. Mittels DNA-Zytometrie können gerade diese Zellen, die häufig entscheidende Informationen liefern, separat vermessen werden.
- In der Flow-Zytometrie kann insbesondere zwischen Tumorzellen im aneuploiden Bereich und Zellaggregationen (Zellverklumpung) nicht unterschieden werden.
- Die statische DNA-Zytometrie kann aufgrund der besseren Zellauswahl insbesondere Tumorzellen im aneuploiden und hochaneuploiden Bereich erfassen.

Der DNA-Gehalt einer Zelle ist mit modernen Färbemethoden hochspezifisch anfärbbar und mittels DNA-Bildanalyse zytophotometrisch meßbar. Die computerisierte DNA-Zytometrie mißt die optische Dichte der gefärbten Zellkerne, die bei präkanzerösen und malignen Zellen aufgrund chromosomaler Veränderungen erhöht sein kann. Anhand dieser Dichtemessung kann der DNA-Gehalt normaler (**euploider**) Zellen und davon abweichender „abnormaler“ (**aneuploider**) Zellen eines Tumors bestimmt werden.

Die Ergebnisse der DNA-Messungen lassen weitgehend Rückschlüsse auf den Chromosomensatz der gemessenen Zellkerne zu. Zur besseren optischen Beurteilung kann das DNA-Profil eines Tumors anschließend aus den ermittelten Daten in Form eines DNA-Histogramms graphisch dargestellt werden.

1.5.4. Stellenwert der DNA-Zytometrie

Neben klassischen Prognosefaktoren wie Histologie, Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptorstatus, histologisches Grading, Menopausenstatus und modernen Prognosefaktoren wie molekularbiologische Marker hat sich heute insbesondere die quantitative Bestimmung des Zellkern-DNA-Gehaltes mittels computergestützter DNA-Zytometrie als ein routinemäßig durchgeführtes Verfahren durchgesetzt.

Unter der Annahme, daß die Aneuploidie der Tumorzellen mit einem erhöhten Malignitätsgrad einhergeht, wird die zytometrische Bestimmung der Zellkern-DNA bereits zur weiterführenden Diagnostik und Gradeinteilung bösartiger Tumoren des weiblichen Genitale eingesetzt⁴⁴. Neben der Früherkennung von Tumoren hat die DNA-Bildzytometrie eine wichtige Bedeutung hinsichtlich der Malignitätsgraduierung.

Nach zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen von Böcking et al.^{45,46} ist es inzwischen gelungen, die diagnostische DNA-Zytometrie europaweit zu standardisieren und diese Methode zu erweitern. Auch bei anderen gynäkologischen Karzinomen und ihren Vorstufen ermöglicht die DNA-Zytometrie eine präzise Kerntexturanalyse und eine prognostische Aussage über den Verlauf der Erkrankung. Auf diese Weise liefern zellkinetische Parameter wichtige Anhaltspunkte über die proliferative Aktivität von Mammakarzinomzellen.

1.6. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Mammakarzinom ist in den Industrienationen nach wie vor die häufigste Karzinomerkrankung der Frau mit ansteigender altersabhängigen Inzidenzzunahme⁴⁷. Eine kontinuierliche Zunahme der Brustkrebsinzidenz in den Industriestaaten wird schon seit längerer Zeit beobachtet; die Mortalität ist unverändert hoch.

Entscheidend für den Krankheitsverlauf und das Mortalitätsrisiko ist die Diagnosestellung im Frühstadium sowie das rechtzeitige Erkennen der Karzinomerkrankung noch vor Eintritt einer lymphogenen Metastasierung. Vor diesem Hintergrund hat sich der Einsatz moderner Prognoseparameter als Voraussetzung für neue therapeutische Ansätze bewährt.

Da für klinische Entscheidungen beim Mammakarzinom neben klassischen Prognosefaktoren insbesondere der „DNA-Aneuploidie“ eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit :

- 1.) der Etablierung der DNA-Zytometrie als Meßmethode für die „Aneuploidie“ als moderner Prognoseparameter beim primären Mammakarzinom.
- 2.) der Überprüfung des „Aneuploidiegrades“ als neuer Malignitätsmarker an Feulgengefärbten Mammakarzinom-Tupfpräparaten.
- 3.) der Gegenüberstellung des „Aneuploidiegrades“ zu bereits etablierten klassischen Prognoseparametern.
- 4.) der präziseren Klassifizierung heterogener Mammakarzinome (insbesondere G2-Karzinome).
- 5.) der Überprüfung der „Aneuploidie“ auf ihre prognostische Wertigkeit am klinischen Krankheitsverlauf eines großen Patientenkollektivs (n = 314) anhand von statistischen Überlebenskurven für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben.