

Aus dem Institut für Pathologie des HELIOS Klinikums Bad Saarow
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung von HIF-1 alpha und ausgewählter assoziierter
Regulatoren beim Mammakarzinom unter Berücksichtigung
einer molekularen Tumorklassifikation und
Anwendung der TMA-Technik

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ulli Voß

aus Frankfurt/Oder

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
1.1 Epidemiologie	3
1.2 Risikofaktoren	3
1.2.1 Nicht morphologische Risikofaktoren	4
1.2.2 Morphologische Risikofaktoren	5
1.3 Pathologie des Mammakarzinoms	6
1.3.1 Allgemeine Bemerkungen	6
1.3.2 Spezielle Pathologie des Mammakarzinoms	7
1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren	11
1.4.1 Allgemeine Aspekte	11
1.4.2 Definitionen	11
1.4.3 Einteilung der prognostischen und prädiktiven Faktoren	12
1.4.4 Etablierte prognostische und/oder prädiktive Faktoren.....	12
1.4.4.1 Tumorstadium (p)TNM – Klassifikation (staging) nach UICC.....	13
1.4.4.2 Histopathologisches Grading	14
1.4.4.3 Histologischer Tumortyp	14
1.4.4.4 Tumoröse Blut-und/oder Lymphgefäßinvasion (LVI).....	14
1.4.4.5 Hormonrezeptorstatus	15
1.4.4.6 Her2 –Rezeptorstatus bzw. Her2/neu Genamplifikation	15
1.4.4.7 uPA/PAI-1	16
1.4.5 Potentielle prognostische und/oder prädiktive Faktoren	16
1.5 Molekulare Subtypisierung des Mammakarzinoms	17
1.6 Allgemeine Mechanismen der Karzinogenese unter besonderer Berücksichtigung des Mammakarzinoms.....	19
1.7 HIF (Hypoxia - inducible factors) sowie assoziierte Regulatoren	21

2. Zielstellung	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.2 Methoden	29
3.2.1 Immunhistochemie	29
3.2.1.1 Allgemeine Grundlagen der Immunhistochemie	29
3.2.1.2 Spezielle Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate von den TMA-Blöcken	33
3.2.2 Tissue Microarray-Technik (TMA)	38
3.2.2.1 Allgemeine Grundlagen der Microarray-Technik.....	38
3.2.2.2 Herstellung der speziellen Tissue Microarray – Blöcke.....	40
3.2.3 Lichtmikroskopische Analyse und Auswertungsmethodik	45
3.2.4 Statistische Auswertung	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Häufigkeitstabelle.....	48
4.2 Klinisch-morphologische Korrelation.....	49
4.3 Korrelationstabelle	50
4.4 Überlebenskurven.....	52
4.4.1 CA IX, HIF-1 alpha, HIF-2 alpha.....	52
4.4.2 p300, VHL, FIH.....	56
4.5 Korrelationskurven	60
4.6 Mikroskopische Bilder der Immunfärbungen	65
5. Diskussion	69
6. Schriftenverzeichnis	82
Eidesstattliche Versicherung	96
Lebenslauf	97
Teilpublikation	98
Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Atypische duktale Hyperplasie
ALH	Atypische lobuläre Hyperplasie
ARNT	Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
BI-RADS	Breast Imaging Report and Data System
BRCA	Breast-Cancer-Gen
CA IX	Carbonic anhydrase IX
CK	Zytokeratin (Cytokeratin) = Intermediärfilament der Zelle
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EPAS 1	Endothelial PAS domain-containing protein 1
FEA	Flache epitheliale Atypie
FIH	Factor Inhibiting HIF 1
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor Nummer 2
HIF	Hypoxie-inducible factor
HRE´s	Hypoxia responsive elements
IARC	International Agency for Research on Cancer
IRS	Immunreaktive Score
Ki 67	Proliferationsmarker (in %) Ki : Abk. für Kiel
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LN	Lobuläre Neoplasie
LVI	Lymphovaskuläre Invasion
MIB	Minimal invasive Biopsie
mTOR-Pathway	Mammalian target of rapamycin - Pathway
NOS	Not otherwise specified
NST	No special type
PHD´s 1-3	Prolyl hydroxylasen 1-3
TDLU	Terminale duktulo-lobuläre Einheit
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
PAI-1	Plasminogen-Aktivator- Inhibitor Typ 1
VHL	von Hippel-Lindau Protein

Zusammenfassung

Bedeutung von HIF-1 alpha und ausgewählter assoziierter Regulatoren beim Mammakarzinom unter Berücksichtigung einer molekularen Tumorklassifikation und Anwendung der TMA-Technik

von Ulli Voß

Einleitung: Bei der Karzinogenese des Mammakarzinoms handelt es sich um ein hochkomplexes Geschehen, das nicht auf ein singuläres Ereignis, sondern auf eine Vielzahl von Störungen in der Zelle zurückzuführen ist. Durch eine Aktivierung bzw. Deaktivierung von bestimmten Genen führen unterschiedliche Entwicklungswege zum Karzinom. Die Mitglieder der HIF-Familie haben eine zentrale Funktion in der Hypoxie-bedingten Zelladaptation. In der vorliegenden Arbeit wird insbesondere die Bedeutung von HIF-1 alpha sowie auch der Faktoren HIF-2 alpha, p300, FIH, VHL und CA IX an Mammakarzinomen mit der Zielstellung untersucht, eine Korrelation dieser Parameter zum klinischen Krankheitsverlauf herzustellen. Insbesondere sollte dabei herausgearbeitet werden, ob diese Faktoren eine prognostische Bedeutung haben.

Methodik: Aus einem Kollektiv von 865 eingesandten Gewebeproben der Jahre 1997 bis 2003 von Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom des Instituts für Pathologie Paderborn-Höxter wurden Daten zur Tumormorphologie, zum klinischen Verlauf und zum Tumorstadium mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen bei oben genannten Markern korreliert. Dabei lagen die Daten von Langzeitverläufen bei 456 Patientinnen vor. Die Mammakarzinome wurden mittels der Tissue-Microarray-Technik (TMA) immunhistochemisch untersucht, wobei dann eine sogenannte intrinsische molekulare Mammakarzinom-Typisierung an 783 Tumorproben erfolgte. Die Korrelation der Parameter untereinander wurde mittels Chi²-Test, Rank-Korrelation und einer Permutationsanalyse durchgeführt.

Ergebnisse: Es konnte für HIF-1 alpha als auch für die Faktoren HIF-2 alpha, CA IX, p300 und VHL keine statistisch signifikante prognostische Relevanz evaluiert werden. Dies betraf jeweils das gesamte Patienten-Kollektiv als auch die getrennte Betrachtung der Patientinnen mit prä- und postmenopausalen Karzinomen. Allerdings zeigte sich bei HIF-1 alpha in der Kaplan-Meier-Analyse nach 8 bis 10 Jahren eine bis zu 20% bessere Prognose bei Patientinnen ohne HIF-1 alpha Expression im Tumorgewebe. Für Tumoren mit FIH - Expression konnte im Gesamtkollektiv eine statistisch signifikant schlechtere Langzeitprognose verifiziert werden.

Das Expressionsniveau von HIF-1 alpha und der assoziierten Proteine zeigte in den intrinsischen molekularen Subtypen ein deutlich differentes Expressionsmuster mit einer hohen Expression in den Subtypen, die mit einem hohen Malignitätsgrad assoziiert sind. Die biomathematische Analyse ergab allerdings keinen Hinweis auf eine gestörte Interaktion zwischen den einzelnen Faktoren in den intrinsischen Subtypen.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dokumentieren, dass Mammakarzinom-Patientinnen bezüglich der HIF-1 alpha-Expression im Tumorgewebe hinsichtlich des Überlebens keinen statistischen Unterschied zeigen. Das gleiche gilt – mit Ausnahme von FIH – auch für die weiteren untersuchten Kandidatenproteine. Es zeigte sich außerdem, dass sich das Expressionsniveau der Faktoren in den unterschiedlichen intrinsischen molekularen Subtypen des Mammakarzinoms unterscheidet. Es werden weitere Studien nötig sein, um die prognostische Wertigkeit und das mögliche prädiktive Therapiepotential von HIF-1 alpha und dessen assoziierter Regulatoren zu definieren.

Abstract

Relevance of HIF-1 alpha and selected associated regulators in breast cancer in consideration of a molecular tumor classification and using tissue microarrays

written by Ulli Voß

Background: Carcinogenesis of breast cancer is a highly complex process based on multiple cell dysfunctions rather than on a singular event. Activation or deactivation of certain genes initiate different metabolic pathways that finally lead to cancer formation. The members of the HIF protein family play a central role in hypoxia-induced cell adaptation. The present study analyses especially the role of HIF-1 alpha and the factors HIF-2 alpha, CA IX, p300, VHL and FIH in breast cancer by correlating these factors with the clinical outcome of the disease. Special emphasis was put on the question whether these factors have a prognostic value.

Study Design: The above mentioned markers were immunohistochemically determined in 865 tissue samples of patients with primary breast cancer sent to the Institute of pathology in Paderborn-Höxter in the years 1997 to 2003, and a correlation analysis with data on tumor morphology, clinical disease progression and tumor staging was performed. Longtime follow-up data was available of 456 patients. Breast cancer samples were immunohistochemically analyzed by tissue microarray technique (TMA) with a so-called intrinsic molecular subtyping conducted in 783 tumor samples. Statistical analyses were done by Chi²-test, Rank-correlation and permutation test.

Results: A statistically significant prognostic relevance could not be evaluated for HIF-1 alpha or for factors HIF-2 alpha, CA IX, p300 or VHL. This holds true for the whole patient group as well as for the separately analyzed groups of premenopausal and postmenopausal patients. Kaplan-Meier curves for HIF-1 alpha however showed a tendency towards improved prognosis of up to 20% after 8 to 10 years in patients without HIF-1 alpha expression in the cancer tissue. Tumors with FIH expression showed a statistically worse prognosis in the total collective.

The expression level of HIF-1 alpha and associated proteins showed clearly different expression patterns in the various intrinsic molecular subtypes, with a high expression in the subtypes associated with a high degree of malignity. Biomathematical analysis however did not show any indication of a disturbed interaction between the separate factors in the intrinsic subtypes.

Conclusions: The results show that HIF-1 alpha expression in cancer tissue does not significantly influence survival of breast cancer patients. The same holds true for the other candidate proteins analyzed, with the exception of FIH. Furthermore, the expression level of the factors differed in the various intrinsic molecular subtypes of breast cancer. Further studies will be necessary to define the prognostic value and a possible predictive therapeutical potential of HIF-1 alpha and its associated regulator elements.

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau. An keinem anderen Krebs sterben so viele Frauen wie an Brustkrebs. Nach Untersuchungen der IARC (International Agency for Research on Cancer) erkranken weltweit über eine Millionen Frauen jedes Jahr neu an Brustkrebs mit steigender Inzidenz [1]. Allerdings muss Letztere vorsichtig interpretiert werden, da immer komplexere und sensitivere Erfassungsmethoden, insbesondere auch im Rahmen des Mammographiescreenings, zur Anwendung kommen. Im Jahr 2008 erkrankten nach Angaben des Robert-Koch-Institutes in der Bundesrepublik Deutschland ungefähr 72.000 Frauen an Brustkrebs, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 65 Jahren lag [2]. Die Brustkrebsmortalität liegt in Deutschland bei ca. 17 000 Todesfällen [3]. In Deutschland betrug die Mortalitätsrate im Jahre 2008 24,6/100.000 Einwohner bei einer Inzidenz von 110,6/100.000 Einwohner [4]. Derzeit liegen die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Brustkrebspatientinnen in Deutschland bei etwa 83 – 87 % [2]. Damit steht Brustkrebs bei Frauen als krebsbedingte Todesursache an erster Stelle, noch vor Darmkrebs und Lungenkrebs und Gebärmutterkörperkrebs. Bei Frauen im Alter zwischen 35 und 54 Jahren ist Brustkrebs die häufigste Todesursache. Bei den Krebsneuerkrankungen ist der Brustkrebs bei Frauen mit 29% anteilig am häufigsten von allen Krebsarten [2]. Obwohl bei Frauen der Brustkrebs bei den krebsbedingten Todesursachen an erster Stelle steht, ist seit Mitte der 90er Jahre in Deutschland eine rückläufige Mortalitätsrate zu beobachten. In den USA wird im Zeitraum von 1990 bis 2007 sogar ein kontinuierlicher Rückgang der Brustkrebsmortalität von insgesamt circa 11 Prozent beschrieben [5]. Das wird insbesondere damit begründet, dass in zunehmendem Maße Frühuntersuchungen durchgeführt werden und die adjuvanten Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms deutlich optimiert bzw. erweitert worden sind [4].

1.2 Risikofaktoren

Es sind eine Reihe von morphologischen und nicht-morphologischen Faktoren bekannt, die mit einem unterschiedlich erhöhten Risiko der Entstehung eines Mammakarzinoms assoziiert sind [6].

1.2.1 Nicht morphologische Risikofaktoren

Zum Beispiel erhöht sich das Mammakarzinomrisiko um das 2 bis 3 fache bei einer positiven Familienanamnese (Frauen mit Verwandten 1.Grades wie Mutter und Schwester, die an einem Mammakarzinom erkrankten). Dieses Risiko nimmt noch zu, wenn sich bei diesen Verwandten der Brustkrebs bereits in einem frühen Lebensalter oder bilateral entwickelt hat [6].

Es ist weiterhin bekannt, dass ein bis zu zweifach erhöhtes relatives Brustkrebsrisiko bei Patientinnen mit einer frühen ersten Regelblutung (Menarche) vor dem 12. Lebensjahr und einer Menopause nach dem 55. Lebensjahr besteht [7]. Bei diesen Patientinnen liegt also eine lange ovarielle Aktivität vor, welche offenbar das Risiko erhöht, an Brustkrebs zu erkranken [8]. In diesem Zusammenhang kommt den Steroidhormonen eine besondere Rolle zu, da das Wachstum des Mammagewebes sehr stark hormonellen Einflüssen unterliegt. Ganz offensichtlich spielt bei der Brustkrebsentstehung auch die Störung der endokrinen Regulation eine wichtige Rolle. In diversen Studien wird eine direkte Korrelation zwischen Serum-Östrogenspiegel und Brustkrebsrisiko beschrieben [9]. Eine langjährige Hormonersatztherapie soll nach dem derzeitigen Kenntnisstand das Brustkrebsrisiko insbesondere für lobuläre Mammakarzinome geringfügig erhöhen [10]. Darüber hinaus erhöht sich das Mammakarzinomrisiko bei Frauen um das 2 bis 3 fache bei Nulliparae und späten Erstgebährenden (Geburt des ersten Kindes nach dem 35. Lebensjahr). Auch mit steigendem Lebensalter nimmt die Brustkrebsinzidenz zu, wobei sich dieser Anstieg nach der Menopause verringert [6].

Nicht zu vernachlässigen sind auch spezielle Umwelteinflüsse und Ernährungsweisen, die das Mammakarzinomrisiko erhöhen können [11] sowie auch ionisierende Strahlen insbesondere während der Brustdrüsenentwicklung [12].

Besonders hervorzuheben sind auch genetische Risikofaktoren. Bei circa 75 Prozent aller Mammakarzinome liegt eine sporadische Erkrankung vor. Dagegen kann bei circa 25 % der Mammakarzinom-Patientinnen eine familiäre Brustkrebsbelastung in der Anamnese erhoben werden [13, 14]. Hierbei wurden in den letzten Jahren durch intensive Forschung immer mehr vererbare DNA-Merkmale entdeckt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der Brustkrebsentstehung eine wesentliche Rolle spielen [15]. Es gibt unter diesen zwei Gene, die bei familiärem Mammakarzinom von besonderer Bedeutung sind [16-18]. Zum einen das 1994 von *Miki* identifizierte BRCA1-Gen auf

Chromosom 17q21 und zum anderen das 1995 von *Wooster* nachgewiesene BRCA2-Gen auf Chromosom 13q12.3 [19, 20]. Beide Gene sind Tumorsuppressorgene, die für die Reparatur und Stabilität der DNS mit verantwortlich sind. Wenn Patientinnen eine BRCA 1/2 -Mutation aufweisen, wird das lebenslange Erkrankungsrisiko für Brustkrebs auf 80 Prozent geschätzt [21]. Des Weiteren ist hierbei gleichzeitig auch das Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms mit bis zu 60 Prozent deutlich erhöht [21, 22]. Kürzlich wurde ein drittes Hochrisiko-Gen für Brust- und Eierstockkrebs gefunden, das als RAD51C klassifiziert wird [23]. Die Funktion von RAD51C besteht darin, die Erbsubstanz einer Zelle fehlerfrei zu halten, so dass Mutationen in diesem Gen zur Tumorentstehung führen können. In Studien wurde herausgestellt, dass RAD51C-Mutationsträger deutlich früher erkranken als Patientinnen mit sporadischem Brust- oder Ovarialkarzinom [23].

1.2.2 Morphologische Risikofaktoren

Darüber hinaus sind auch morphologische Veränderungen in der Mamma bekannt, die mit einem erhöhten Risiko der Entstehung eines Mammakarzinoms einhergehen. Insbesondere die nachstehend aufgeführten und histologisch fassbaren, nicht invasiven Läsionen sind teilweise als Vorstufen eines Mammakarzinoms bereits gesichert, bzw. es wird ihnen eine präkanzeröse Bedeutung oder Indikatorfunktion für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko beigemessen:

Flache epitheliale Atypie (FEA)

Diese Läsionen sind nach dem derzeitigen Kenntnisstand mit einem äußerst niedrigen Risiko des Rezidivs und der Progression in ein invasives Mammakarzinom assoziiert [24].

Atypische duktale Hyperplasie (ADH)

Die Bedeutung der ADH liegt in ihrer Indikatorfunktion bezüglich eines erhöhten Brustkrebsrisikos. Frauen mit einer ADH haben ein 3 bis 5 fach erhöhtes relatives Risiko der metachronen Entwicklung eines Mammakarzinoms als Frauen ohne ADH, wobei das Risiko für beide Brüste gilt [25, 26].

Duktales Carcinoma in situ (DCIS)

Das DCIS ist eine klinisch, biologisch, morphologisch und genetisch heterogene präkanzeröse Läsion der Mamma mit einem demzufolge sehr unterschiedlichen Potential des Überganges in ein invasives Karzinom und in aller Regel einer unifokalen segmentalen Ausbreitung [27]. Es handelt sich dabei um ein ipsilaterales regionales Risiko, so dass die Therapie der Wahl eines DCIS die Exzision im Gesunden mit oder ohne Radiatio ist [28]. Die Mortalität bei Frauen mit einem DCIS ist äußerst gering, wobei Raten von 1 bis 2,6 % (8 – 10 Jahren nach DCIS-Diagnose) in der Literatur angegeben werden [29].

Lobuläre Neoplasie (LN)

Nach quantitativen Kriterien ist die traditionelle Einteilung in atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) und lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) üblich. Der derzeitige Konsens in der Literatur ist, dass die LN zum einen als Risikofaktor für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko in beiden Brüsten anzusehen ist und zum anderen in einem geringen Prozentsatz auch als nicht obligate präkanzeröse Läsion für die Entwicklung eines metachronen invasiven lobulären oder duktales Mammakarzinoms eingestuft werden muß [30]. Bei der ALH wird ein 4 bis 5 fach, beim LCIS ein 8 bis 10 fach erhöhtes bilaterales relatives Brustkrebsrisiko angegeben [31, 32].

1.3 Pathologie des Mammakarzinoms

1.3.1 Allgemeine Bemerkungen

Grundlage für die Behandlung eines Mammakarzinoms ist die pathologisch-anatomische Begutachtung. Hierbei erfolgt eine strukturelle Analyse des Karzinoms mit konventionell lichtmikroskopischen, immunhistochemischen und in zunehmendem Maße auch molekularpathologischen Methoden.

Der Begriff „Mammakarzinom“ kann im weiteren und im engeren Sinne im diagnostischen Sprachgebrauch angewendet werden. Im weiteren Sinne meint man damit invasive und nicht-invasive (in situ) Karzinome, wobei es sich bei Letztgenannten

speziell um duktale Carcinomata in situ (DCIS) handelt. Im engeren Sinne wird mit dem Terminus „Mammakarzinom“ das invasive Mammakarzinom gemeint.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wird der Begriff „Mammakarzinom“ als invasives Karzinom definiert.

1.3.2 Spezielle Pathologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist definitionsgemäß ein primärer maligner epithelialer Tumor der Mamma, der durch ein infiltrativ-destruktives Wachstum mit der Potenz zur Metastasierung gekennzeichnet ist. Ausgangspunkt der Mammakarzinome ist in aller Regel die terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLU) [33].

Um ein Mammakarzinom sicher zu diagnostizieren, bedient sich der Untersucher der konventionellen Lichtmikroskopie am HE-gefärbten Schnittpräparat. Darüber hinaus kommen ggf. additiv auch immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden zur Anwendung. Die Immunhistochemie spielt insbesondere bei der Abgrenzung eines invasiven Karzinoms gegenüber einem DCIS und zur Bestimmung des Hormonrezeptor- und Her2/neu Status eine wichtige Rolle und wird ebenfalls zum Nachweis isolierter Tumorzellen in den axillären Lymphknoten (speziell in Sentinel-Lymphknoten) herangezogen.

Mammakarzinome metastasieren bevorzugt in die regionären axillären Lymphknoten sowie hämatogen insbesondere in die Lungen, die Pleura, das Knochensystem, die Leber und in das Gehirn [34]. Besonders invasive lobuläre Mammakarzinome zeigen im Metastasierungsverhalten zusätzlich eine Tendenz, in die serösen Häute (speziell das Peritoneum) und assoziierte Organe (Ovar, Uterus, Magen-Darm) sowie in die Hirnhäute Absiedlungen zu setzen [35, 36].

Die Einteilung der Mammakarzinome erfolgt international auf der Grundlage der WHO-Klassifikation. Die aktuelle Klassifikation stammt aus dem Jahre 2012 („WHO Classification of Tumours of the Breast“) und basiert auf dem relativ einfachen *Ordnungsprinzip des histologischen Phänotyps* [37].

Eine wesentliche Grundlage der Klassifikation der Mammakarzinome ist die Übereinkunft, dass bei einem zu begutachtenden Karzinom zunächst festgestellt wird, ob dieses in eine spezielle Tumorkategorie eingeordnet werden kann. Diese Kategorien beinhalten z.B. tubuläre Karzinome, muzinöse Karzinome, lobuläre Karzinome, adenoid-zystische Karzinome etc. [38]. Wenn der zu untersuchende maligne epitheliale Tumor hier nicht eingeordnet werden kann und sich keine Indizien für eine metastatische Infiltration der Mamma ergeben, fällt dieser in den „Sammeltopf“ des invasiven duktales Mammakarzinoms. Letzteres wird in der aktuellen WHO-Klassifikation als „invasive carcinoma of no special type NST“ bezeichnet [39]. Der Begriff „invasives duktales Mammakarzinom“ ist aber synonym weiterhin anwendbar und wird sicher weiterhin im alltäglichen klinischen Sprachgebrauch Bestand haben. Das invasive duktales Mammakarzinom ist der häufigste Karzinomtyp und stellt je nach Literatur bis zu 75 % aller Mammakarzinome [39].

Die aktuelle WHO-Klassifikation der Mammakarzinome von 2012 [37] ist hier zur besseren Übersicht etwas modifiziert worden und basiert dabei auf praktischen Belangen und grenzt Mammakarzinome mit spezieller Differenzierung von Karzinomen ohne spezielle Differenzierung und darüber hinaus sehr seltene Subtypen bzw. Varianten ab. Dass bei einigen Karzinomtypen noch der Zusatz „invasiv“ genannt wird, hat teilweise historische Gründe und soll insbesondere verhindern, dass eine Verwechslung mit den nicht invasiven (in situ) Läsionen stattfindet:

A. Invasive Mammakarzinome mit spezieller Differenzierung

Invasives lobuläres Karzinom

Tubuläres Karzinom

Kribriiformes Karzinom

Muzinöses Karzinom

Karzinom mit medullärer Differenzierung

Karzinom mit apokriner Differenzierung

Karzinom mit siegelringzelliger Differenzierung

Invasives mikropapilläres Karzinom

Invasives papilläres Karzinom

Metaplastisches Karzinom

Karzinome mit neuroendokriner Differenzierung

Sehr seltene Karzinome mit spezieller Differenzierung

Sekretorisches Karzinom

Azinuszellkarzinom

Mukoepidermoides Karzinom

Polymorphes Karzinom

Onkozytäres Karzinom

Lipidreiches Karzinom

Glykogenreiches Karzinom

Talgdrüsenkarzinom (sebaziöses Karzinom)

B. Invasives Mammakarzinom ohne spezielle Differenzierung

Invasives duktales Karzinom („invasive carcinoma of no special type“ NST, not otherwise specified NOS).

In den nachstehenden Abbildungen wird die histologische Struktur von einzelnen Mammakarzinomtypen dargestellt (HE-Färbung, 100 fache Vergrößerung, Arrays):
(Quelle: Histologische Präparate und Bilder vom Institut für Pathologie Paderborn)

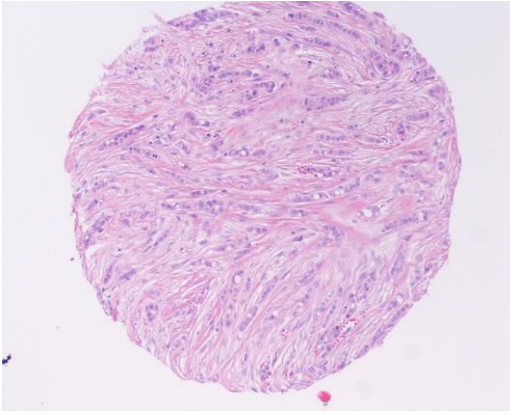


Abbildung 1a: Invasives lobuläres Karzinom

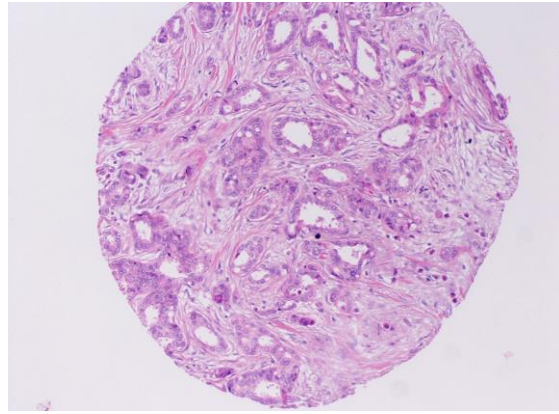


Abbildung 1b: Invasives duktales Karzinom (NOS)

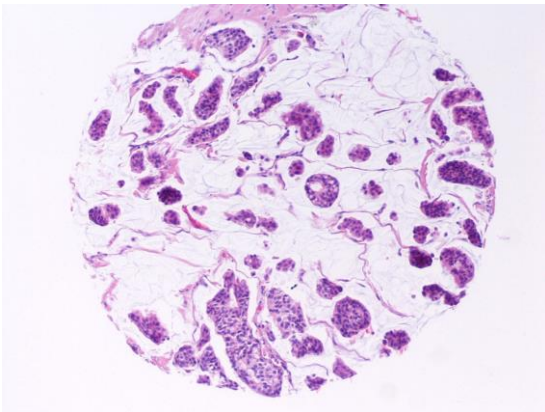


Abbildung 2a: Muzinöses Mammakarzinom

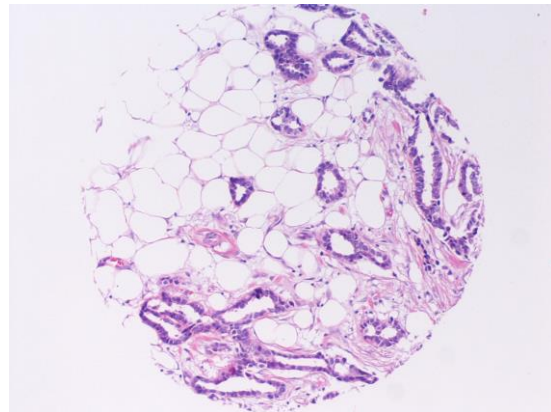


Abbildung 2b: Tubuläres Mammakarzinom

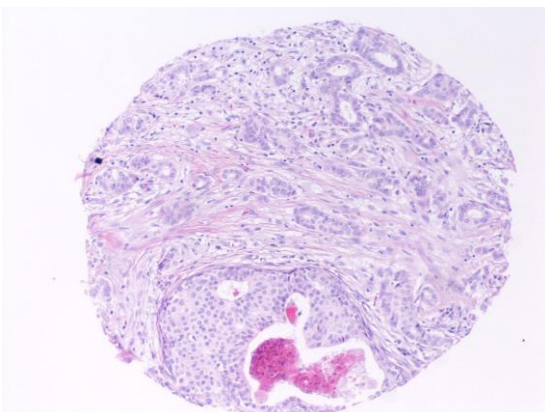


Abbildung 3a: Invasives duktales Mammakarzinom mit DCIS

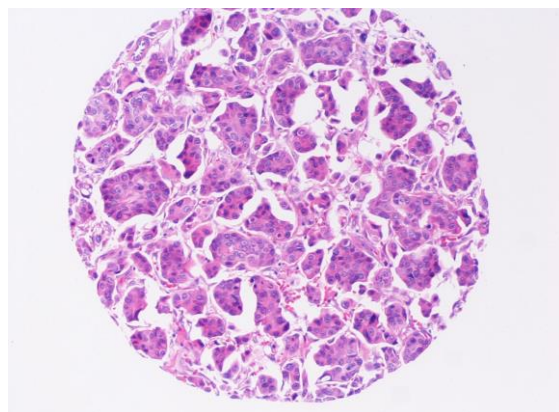


Abbildung 3b: Mikropapilläres Mammakarzinom

Derzeit existieren auch vielfach Ansätze, Mammakarzinome auf Erkenntnissen von molekularen Untersuchungen (z.B. Genexpressionsanalysen) zu klassifizieren (siehe auch Kapitel 1.5). Diese molekularen Klassifikationen haben allerdings noch keine allgemein akzeptierte klinische Bedeutung [40, 41]. Somit ist nach wie vor die aktuelle Version der WHO-Klassifikation der Goldstandard für die histologische (phänotypische) Typisierung des Mammakarzinoms.

1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

1.4.1 Allgemeine Aspekte

Die statistischen Daten über das Mammakarzinom sagen nichts über die individuelle Prognose von Brustkrebspatientinnen aus. Klar ist zum Beispiel, dass die Mehrheit der Patientinnen im UICC Stadium I oder II allein durch die lokale Therapie geheilt wird und somit keine weitere adjuvante medikamentöse Therapie benötigt [42]. Es gibt jedoch derzeit keine Möglichkeit, diese prognostisch günstige Patientengruppe zu erkennen, so dass in sehr vielen Fällen eine Übertherapie mit potentiellen Nebenwirkungen und hohen Kosten erfolgt. Dieses Beispiel zeigt, dass man dringend Informationen zum individuellen Rezidiv- und Sterberisiko benötigt. Gleichzeitig bedarf es Tests, an Hand derer man die Wirksamkeit bzw. das Ansprechen von bestimmten adjuvanten Therapieformen voraussagen kann. Man definiert in diesem Zusammenhang prognostische und prädiktive Faktoren, die für eine zielgerichtete Behandlung und Beratung der Patientinnen eine sehr wichtige Voraussetzung darstellen.

1.4.2 Definitionen

Ein prognostischer Faktor im Rahmen eines malignen Tumors ist ein Parameter, der zu einem interessierenden Zeitpunkt (z.B. bei Erstdiagnose) vorliegt und mit dem krankheitsfreien (Rezidivfreien) Überleben oder dem Gesamtüberleben korreliert und somit von Nutzen ist, das Patienten-outcome abzuschätzen [43].

Ein prädiktiver Faktor im Rahmen eines malignen Tumors ist ein Parameter, der eine Information über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine bestimmte Therapie liefert [43]. Die prädiktiven Faktoren sind somit therapierrelevante Faktoren, die sich auf das Ansprechen oder auf die Effizienz einer bestimmten Therapie (z.B. Antikörpertherapie, Chemotherapie) beziehen [44].

Beide Definitionen beschreiben allerdings statistische Wahrscheinlichkeiten. Somit sind individuelle Aussagen zum Krankheitsverlauf nicht möglich.

1.4.3 Einteilung der prognostischen und prädiktiven Faktoren

Die Einteilung der prognostischen und prädiktiven Faktoren beim Mammakarzinom wird in der Literatur nicht einheitlich gehandhabt. Zunächst muß festgestellt werden, dass viele dieser Faktoren sowohl eine prognostische als auch eine prädiktive Relevanz aufweisen, wobei hierbei die Gewichtung teilweise in Richtung Prognose als auch in Richtung Prädiktion gehen kann. Nicht selten ist in der Literatur eine Klassifikation in sog. etablierte Faktoren und „neue“ Faktoren gebräuchlich [4]. Nach Decker und Böcker wird zwischen Stadiumfaktoren und sog. intrinsischen Faktoren unterschieden, wobei diese Faktoren dann prognostische und/oder prädiktive Relevanz haben können [4]. Eine weitere Einteilung ist diesbezüglich auch die von Bundred et al. [45]. Hierbei werden klassische Faktoren gegenüber biologischen Faktoren abgegrenzt. In der vorliegenden Arbeit wird in modifizierter Anlehnung an Weigel und Dowsett [46] in etablierte und potentielle prognostische und/oder prädiktive Faktoren unterschieden:

1.4.4 Etablierte prognostische und/oder prädiktive Faktoren

Unter den etablierten Faktoren werden zumeist histologische Faktoren subsummiert, bei denen eine prognostische und/oder prädiktive Relevanz gesichert ist und die in der praktischen Anwendung derzeit einen festen Platz einnehmen. Dazu gehören insbesondere das Tumorstadium nach der aktuellen (p)TNM-Klassifikation (Tumorgroße, Nodalstatus, Fernmetastasen), der histologische Tumorgrad, Biomarker wie der Hormonrezeptoren- und Her2/neu-Status, das Vorhandensein einer lymphovaskulären Invasion, der histologische Typ, das Lebensalter, der Residualtumor-

Status (R-Klassifikation) sowie seit kurzem unter bestimmten Bedingungen auch der uPA/PAI-1 Status [4, 47]. Nachstehend erfolgt eine kurze Charakterisierung einzelner dieser etablierten Faktoren ohne Anspruch auf Vollständigkeit:

1.4.4.1 Tumorstadium (p)TNM – Klassifikation (staging) nach UICC

Die pTNM – Klassifikation ist eine Facettenklassifikation, die nach Vorgaben der UICC die Einstufung einer Tumorerkrankung in einzelne Kategorien erlaubt. Auf dieser Grundlage sind dann prognostische Aussagen möglich, wobei gleichzeitig weitere Therapiemaßnahmen abgeleitet werden können. Die Beschreibung der Ausdehnung des Primartumors (pT) ist von großer Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms. Mit zunehmendem Tumordurchmesser erhöht sich die Wahrscheinlichkeit eines axillären Lymphknotenbefalls sowie einer frühen Tumorzell dissemination und früher Metastasierung [48]. Der axilläre Nodalstatus (pN) hat beim primären Mammakarzinom eine sehr hohe prognostische Aussagekraft. Der Status beschreibt das Fehlen beziehungsweise das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Zur definitiven Festlegung des axillären Nodalstatus sollten mindestens 10 Lymphknoten aus der Achselhöhle entfernt werden, da das Rezidiv- und Sterberisiko eng mit der Anzahl der befallenen Lymphknoten korreliert [49]. Allerdings ist es heute auch möglich, nur einen sogenannten Sentinel-Lymphknoten zu entfernen. Wenn dieser frei von Tumorzellen (nodal-negativ) ist, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die nachgeschalteten Lymphknoten nicht befallen sind. Um diesen sicher zu identifizieren bzw. zu lokalisieren, wird vor der Operation eine schwach radioaktive Substanz in die Tumorregion appliziert, die sich verteilt und während der Operation mit einem Strahlendetektor lokalisiert werden kann [50]. Außerdem weist der Nodalstatus des Sentinellymphknotens einen hohen prädiktiven Wert für den gesamten axillären Lymphknotenstatus auf [51].

Die Diagnostik einer primären Fernmetastasierung (pM) sollte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Mammakarzinoms durchgeführt werden. Die Abklärung von Fernmetastasen erfolgt mittels Abdomensonographie, Röntgenuntersuchung des Brustraums (Röntgen-Thorax) und/oder Computertomographie bzw. Kernspintomographie. Fernmetastasen besitzen die größte prognostische Relevanz aller Prognosefaktoren.

1.4.4.2 Histopathologisches Grading

Die Beurteilung des Malignitäts- oder Differenzierungsgrades (histologisches Grading) nach Elston und Ellis [52] gehört zu den etablierten Prognosefaktoren und wird auch als Nottingham-Grading-System bezeichnet [53]. Es ging durch Modifikationen aus dem Grading nach Bloom und Richardson hervor [53]. Aus Verlaufsbeobachtungen kann belegt werden, dass das Nottingham-Grading in multivarianten Analysen mit der Prognose korreliert [54, 55]. Die Durchführung des Gradings nach Elston und Ellis ist auch an Stanzbiopsaten möglich, wobei allerdings gelegentlich an den Tumorexzisaten eine Änderung des Gradings erfolgen muss. Das Gradingssystem basiert auf der Abschätzung von drei histologischen Merkmalen im Karzinom: Tubulusbildung, Mitoserate und Kernpleomorphie [56]. Diesbezüglich werden jeweils maximal 3 Punkte vergeben und letztlich ein Summationsscore gebildet. 3 bis 5 Scorepunkte entsprechen Grad 1; 6 oder 7 Punkte Grad 2 sowie 8 oder 9 Punkte Grad 3 [4]. Ein gewisser subjektiver Faktor bei der Gradfestlegung durch den Pathologen muss allerdings in Kauf genommen werden.

1.4.4.3 Histologischer Tumortyp

Spezielle histologische Subtypen des Mammakarzinoms sind bei gleichem Stadium mit einer besseren Prognose assoziiert. Dazu gehören insbesondere tubuläre, kribriiforme, rein muzinöse und die sehr seltenen papillären invasive Karzinome. Zum Beispiel weisen tubuläre Mammakarzinome (nach strenger Definition) eine exzellente Prognose auf [57].

1.4.4.4 Tumoröse Blut-und/oder Lymphgefäßinvasion (LVI)

Tumorembolien in dünnwandigen endothelialisierten Gefäßen (Lymph- oder Blutgefäße) sind ein wichtiger unabhängiger Prognosefaktor sowohl für die Ausbildung von Lokalrezidiven als auch für das Überleben [58, 59]. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Rate für eine lymphovaskuläre Invasion (LVI) in der Literatur zwischen unter 5 % bis über 50 % schwankt [60]. Es sind somit strikte

Kriterien zur Diagnostik einer LVI erforderlich, ggf. unter Anwendung immunhistochemischer Methoden mittels CD 31 und D 2-40 Antikörper [61].

1.4.4.5 Hormonrezeptorstatus

Der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor) ist einer der wichtigsten biologischen Prognoseparameter des Mammakarzinoms. Gleichzeitig stellt der Hormonrezeptorstatus im Rahmen der heutigen Therapiemöglichkeiten mit Tamoxifen und Aromatasehemmern den entscheidenden prädiktiven Faktor für die Planung einer endokrinen Therapie dar [62-64]. Generell wird zwischen hormonsensitiven und hormoninsensitiven Mammakarzinomen unterschieden [65]. Dabei wird nur der rezeptorpositive Tumor als hormonsensitiv bezeichnet, der bei der Anfärbung mindestens 1% der Zellkerne aufweist [66]. Dabei korreliert der Rezeptorstatus mit der Ansprechwahrscheinlichkeit auf eine Anti-Hormontherapie, womit bei hormonpositiven Tumoren das Wachstum der Tumorzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit supprimiert werden kann [67]. In Deutschland ist die immunhistochemische Bestimmung und Klassifikation des Hormonrezeptorstatus nach Remmele [68] üblich, wobei international zumeist der Allred-Score zur Anwendung kommt [69]. Beide Systeme basieren auf der Bildung eines Score, wobei dabei die Färbeintensität und die Anzahl der angefärbten Kerne eingehen.

1.4.4.6 Her2 –Rezeptorstatus bzw. Her2/neu Genamplifikation

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression oder Amplifikation des humanen Wachstumsfaktorrezeptors-2-Gens bei nodal positiven und auch nodal negativen Mammakarzinomen einen ungünstigen Prognosefaktor darstellt [70-72]. Darauf basierend ist der Her2-Rezeptor als potentiell Ziel für eine zielgerichtete Antikörpertherapie erkannt worden. Spätestens seit der Zulassung von Trastuzumab (Herceptin®), einem Antikörper gegen Her2/neu bei metastasiertem und nicht metastasiertem Mammakarzinom, kommt der Bestimmung des Her2-Status eine große Bedeutung zu und wird routinemäßig angewandt [73].

Mittels immunhistochemischer Methoden und ggf. mittels der Molekulardiagnostik (FISH, CISH) wird der Status am Paraffinmaterial bestimmt.

Die Auswertung erfolgt nach einem Immunoscore der Firma DAKO (Score 0 und 1+ = negativ; Score 2+ grenzwertig; Score 3+ = positiv). Die Absicherung des Her2-Status bei einem Dako Score 2+ erfolgt molekulargenetisch (CISH oder FISH-Technik).

Der Her2-Status gibt als prädiktiver Parameter Auskunft über das therapeutische Ansprechen auf Trastuzumab (Herceptin®) oder des Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib (Tyverb®) [74, 75].

1.4.4.7 uPA/PAI-1

Tumorassoziierte Proteolysefaktoren wie Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 sind standardisierte und evidenzbasierte Prognose- und Prädiktionsfaktoren für Patientinnen mit nodal negativem Mammakarzinom und intermediärem Risikoprofil (z.B. pN0, G2) [76, 77]. Nach der derzeitigen Datenlage ist uPA/PAI-1 ein valider Prognosefaktor und Prädiktionsfaktor für den Einsatz einer Chemotherapie bei pN0 G2 Patientinnen [78]. Nachteil ist, dass dieser Faktor am Frischgewebe bestimmt werden muss und Entzündungen bzw. auch Gewebeirritationen durch eine Stanzbiopsie zu falsch-positiven Befunden führen können und die sog. Kühlkette gewährleistet werden muß.

1.4.5 Potentielle prognostische und/oder prädiktive Faktoren

Es existiert eine Vielzahl von biologischen Faktoren, bei denen bisher eine prognostische und/oder prädiktive Relevanz noch nicht gesichert ist, die in der Routinediagnostik noch nicht etabliert sind bzw. die sich noch im experimentellen Stadium befinden. Biologische Faktoren mit potentieller prognostischer/prädiktiver Relevanz sind zum Beispiel Angiogenesefaktoren (VEGF etc.), Proliferationsfaktoren Ki 67 [79], Zellzyklusregulatoren (p53), Invasionsmarker (CathepsinD-Level), DNA Ploidie, Knochenmarkmikrometastasen, Mikrometastasen im Sentinel-Lymphknoten, molekulare Subtypen, Cathepsin D, Bcl 2, Neovaskularisationsmarker und andere [4, 60]. Dazu kommen in jüngster Zeit Genexpressionsprofile mit potentiell prognostischen molekularen Signaturen (siehe auch Punkt 1.5)

1.5 Molekulare Subtypisierung des Mammakarzinoms

Grundsätzliches Ziel bei der Behandlung eines Mammakarzinoms ist die Entwicklung einer individuellen Therapie für jede einzelne Patientin. Um diesem Ziel näher zu kommen bzw. um auch individuelle Prognosefaktoren zu finden, sind molekulargenetische Genexpressionsmuster erstellt und auf deren Basis molekulare Tumorklassifikationen mit sog. intrinsischen Subtypen definiert worden [41, 80, 81]. Man postuliert dabei, dass das Mammakarzinom eine heterogene Erkrankung mit verschiedenen molekularen Subtypen darstellt, die sich bezüglich des Genexpressionsmusters, der Klinik, des Ansprechens auf bestimmte Therapien und der Prognose unterscheiden [60]. Hierbei beschrieben Sorlie et al. 4 intrinsische molekulare Mammakarzinom-Subtypen [82], die wie folgt klassifiziert worden sind:

1. Luminal A
2. Luminal B
3. Her 2 enriched
4. Basal-ähnlich

Die auf der Grundlage von molekularen Gen-Arrays und einer sog. hierarchischen Clusteranalyse so etablierten intrinsischen molekularen Subtypen können aber auch durch immunhistochemische Surrogat (Ersatz)-marker definiert werden, da die entsprechenden Gene die zugehörigen und immunhistochemisch detektierbaren Proteine in aller Regel kodieren. So sind dabei eine Reihe unterschiedlicher immunphänotypischer molekularer Tumorklassifikationen in den letzten Jahren erstellt worden, die allerdings aufgrund unterschiedlicher Definitionen und Marker eine eingeschränkte Vergleichbarkeit in Studien aufweisen. Diese immunhistochemisch basierte phänotypische molekulare Subtypisierung zeigt hinsichtlich der prognostischen und prädiktiven Aussage aber eine relativ hohe Korrelation zur eigentlichen primären molekularen Subtypisierung durch Genexpressionsanalysen [40].

Auf dieser Grundlage definierten Experten auf der St. Gallen-Konferenz 2011 eine immunhistochemisch basierte molekulare Klassifikation des Mammakarzinoms [83]. Hierbei ging auch die Proliferationsrate in die immunhistochemische Klassifikation ein. Letztere wurde dabei mit dem Proliferationsmarker Ki 67 (MIB 1) bestimmt und ein

Grenzwert von 14 % festgelegt [84]. Die molekularen Subtypen werden dann immunphänotypisch wie folgt definiert:

Der luminale Subtyp A und B besitzt im Zellkern Rezeptoren für Östrogen oder Progesteron, der Her2 Subtyp eine verstärkte Expression eines bestimmten Wachstumsfaktorrezeptor (Her2) auf der Zelloberfläche bei fehlender Expression von Rezeptoren für Östrogen oder Progesteron und der Basal-ähnliche Subtyp keinerlei derartige Rezeptoren. Diese und andere Typisierungen in der Literatur bildeten dann die Basis für die Definition molekularer Subtypen in der vorliegenden Promotionsarbeit (siehe Punkt 3.1.).

Es muss nochmals betont werden, dass die molekulare Klassifikation des Mammakarzinoms im Schrifttum keineswegs einheitlich ist und es diesbezüglich mehrere Schemata bzw. Ansätze gibt, die teilweise auch wieder verworfen oder laufend modifiziert werden. Ungeachtet dessen hofft man dabei, durch die Einführung sog. intrinsischer morphologischer Subtypen eine verbesserte und möglichst individuelle Aussage über die Prognose und Therapie des Mammakarzinoms zu erreichen. Im Übrigen sei auch auf aktuelle Forschungen auf dem Gebiet der Genomanalyse bei Mammakarzinomen verwiesen [41, 85].

Die Identifikation von Genexpressionsmustern hat in jüngster Zeit auch zur Aufstellung von prognostischen molekularen Signaturen geführt, von denen einige schon kommerziell angeboten werden wie z.B. Oncotype DX , MammaPrint etc. [86, 87]. Diesbezüglich laufen zur Zeit prospektive randomisierte Studien, um die Aussagekraft dieser Methoden zu überprüfen [88-90]. Darüber hinaus existiert bereits ein prognostisch-prädiktives Online-System (Adjuvant!Online).

Es sei zusammenfassend darauf hingewiesen, dass derzeit im klinischen Alltag neben der histologisch-phänotypischen WHO-Klassifikation der Mammakarzinome der Bestimmung des Hormon- und Her2-Rezeptorenstatus, des Tumorstadiums und des histologischen Malignitätsgrades sowie der Residual (R)-Klassifikation die entscheidende prognostische und/oder prädiktive Bedeutung zukommt. Die Etablierung einer allgemein anerkannten und klinisch validierten molekularen Klassifikation bleibt somit abzuwarten.

1.6 Allgemeine Mechanismen der Karzinogenese unter besonderer Berücksichtigung des Mammakarzinoms

Es ist derzeit unklar, was genau der Auslöser für Brustkrebs ist. Es besteht allerdings Konsens darüber, dass bezüglich der Ätiopathogenese des Mammakarzinoms ein multifaktorielles Geschehen vorliegt. Generell unterscheidet sich die Karzinogenese des (sporadischen) Mammakarzinoms nicht von jener anderer maligner Tumoren [91]. Im Gegensatz zu früheren Thesen wird das Mammakarzinom heute als morphologischer Ausdruck einer Vielzahl von genetischen Entwicklungswegen (Pathways) gesehen. Letztere zeigen sich bereits in den nichtinvasiven Vorläuferläsionen. Das bedeutet, dass gut differenzierte präinvasive Läsionen (z.B. DCIS) sich in aller Regel zu gut differenzierten invasiven Karzinomen entwickeln und nach dem gleichen Prinzip auch die schlecht differenzierten Läsionen [92]. Im Übrigen ist auch klar geworden, dass präkanzeröse Vorläuferläsionen wie das DCIS nicht einheitlich sind, sondern eine Gruppe morphologisch, biologisch und klinisch differenter Prozesse darstellen [93-96]. Auch am Modell der linearen Progression (benigne Hyperplasie – atypische Hyperplasie – DCIS - invasives Karzinom) sind berechnete Zweifel aufgekommen [6]. Trotz unterschiedlicher moderner Modelle der Mammakarzinomentstehung (Stammzelltheorie, Progenitorzellkonzept etc.) handelt es sich hierbei nur um sehr schematische Vereinfachungen einer hochkomplexen und genetisch heterogenen Pathogenese des Mammakarzinoms [6].

Die Entstehung von malignen Tumoren ist das Endresultat einer Vielzahl von Störungen in verschiedenen Regelkreisläufen einer Zelle. Im besonderen Fokus steht hierbei schon rein quantitativ die Karzinogenese, d.h. die Pathogenese von malignen epithelialen Tumoren im Sinne von Karzinomen. In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine nahezu nicht mehr überschaubare Anzahl von Genen mit zentralen Funktionen in der Karzinogenese beschrieben. Manche dieser Gene haben teils eine isolierte Bedeutung in einzelnen zellulären Regelkreisläufen, vielfach haben diese Gene jedoch eine Multifunktion in verschiedenen, sich teils überlappenden Regulationsmechanismen. Mit der Arbeit von Hanahan und Weinberg (Cell 2000) wurde erstmals versucht, generelle übergeordnete Prinzipien der Karzinogenese zu definieren [91]. Basierend auf einer Vielzahl von Untersuchungen postulierten Hanahan und Weinberg, dass zumindest Störungen in 6 zentralen zellulären Funktionen notwendig

sind, um einen malignen Tumor entstehen zu lassen. Im Einzelnen hat dabei ein Karzinom folgende Eigenschaften bzw. grundlegende Störungen in seiner zellulären Regulation [91]:

- ein Karzinom ist unabhängig von äußeren und inneren wachstumshemmenden Faktoren (Tumorsuppressorgene)
- es stimuliert sein eigenes Wachstum (z.B. Onkogene)
- es hat die Fähigkeit, die Apoptose zu überwinden, d.h. die Fähigkeit, das Programm des zellulären „Selbstmordes“ abzuschalten
- es produziert sein eigenes Blutgefäßnetz (Neoangiogenese)
- Tumorzellen werden mobil, können aktiv in vorbestehendes normales Gewebe einwachsen (Invasion) und potentiell Metastasen bilden
- ein Karzinom hat ein unendliches Wachstumspotential

Inzwischen wurde allerdings klar, dass noch weitere Mechanismen ursächlich bei der Karzinomentstehung wirken müssen. In einer Arbeit derselben Autoren aus dem Jahre 2011 (Cell 2011) wurden weitere 4 Mechanismen hinzugefügt [97]. Diese beinhalten

- die Umgehung der körpereigenen Immunabwehr,
- die Induktion einer das Tumorwachstum fördernden Entzündungsreaktion,
- die zusätzliche Aquisition von genetischen Mutationen auf dem Boden einer generellen genetischen Instabilität
- die Anpassung und Umstellung des zellulären Energiehaushaltes.

Zusammenfassend handelt es sich bei der Karzinomentstehung somit um ein hochkomplexes Geschehen, welches nicht auf ein singuläres Ereignis, sondern auf eine Vielzahl von Störungen – die sich gegenseitig beeinflussen können - in einer Zelle zurückzuführen ist. Die Wertigkeit von verschiedenen Genen in diesen Regelkreisläufen ist allerdings sehr unterschiedlich. So gibt es eine Reihe von Genen, welchen eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese zukommt und deren Aktivierung zu zahlreichen unterschiedlichen Pathways in der Karzinomentstehung führen kann. Eines dieser Gene sind die Mitglieder der HIF-Familie.

1.7 HIF (Hypoxia - inducible factors) sowie assoziierte Regulatoren

Die „Hypoxia inducible factors“ (HIF) gehören zu einer Gruppe von heterodimeren Transkriptionsfaktoren [98]. Diese Genfamilie umfasst derzeit 3 Mitglieder (HIF-1, HIF-2, HIF-3) [99]. Für alle Mitglieder der Genfamilie wurden sauerstoffabhängige alpha- und vom Sauerstoff unabhängige beta-Isoformen beschrieben, welche Heterodimere bilden und nur als solche funktionell aktiv sind [100].

HIF-1 alpha und **HIF-2 alpha** haben einen ähnlichen Aufbau, allerdings ist die Expression in Tumoren (unter Hypoxie) unterschiedlich. HIF-1 alpha gilt als Hauptregulator der sauerstoffabhängigen Genexpression, wohingegen HIF-2 alpha als endotheliales PAS-Protein (EPAS1) beschrieben worden ist [101]. Als zentraler Faktor im Rahmen der Zellregulation bei Hypoxie wird HIF von vielen weiteren Faktoren beeinflusst bzw. reguliert. Hierbei sind u.a. nachfolgende Faktoren zu nennen:

CA IX (Carbonic Anhydrase IX) ist ein Enzym, das zu der Familie der α -Carboanhydrasen gehört. Es sind 11 Isoformen bekannt. Diese werden je nach Lokalisation innerhalb der Zelle unterteilt, wobei CA IX zu den membranassoziierten Isoformen zählt [102]. Die Funktion des Enzyms besteht darin, die Hydratisierung von CO_2 zu Hydrogencarbonat zu katalysieren und umgekehrt. Somit hat CA IX eine pH-regulatorische Funktion. Unter hypoxischen Bedingungen wird CA IX stark aktiviert und gilt als Hypoxiemarker [103].

p300 ist ein ca. 270 kDa großes, ubiquitär exprimiertes multifunktionelles Phosphatprotein. Es beeinflusst als Koaktivator die Transkription mehrerer nukleärer Proteine. Diese Proteine sind beteiligt an der Proliferation, Zellzyklus-Regulation, Apoptose, Differenzierung und DNA-Reparatur der Zelle [104, 105]. p300 bindet nicht direkt an die DNA, sondern fungiert als Brückenprotein, welches seine Funktion über Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53 vermittelt [106]. p300 ist eine wichtige Komponente des HIF-Transkriptions-Komplexes, da es die Transaktivierung von HIF positiv reguliert [107].

Das gleichnamige Gen für das Protein **VHL** (von Hippel-Lindau-Protein) hat die chromosomale Lokalisation 3p25.3 und gehört zur Familie der Tumorsuppressorgene. Das VHL-Protein wird ubiquitär in fetalen und adulten Geweben exprimiert und kann zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma pendeln [108]. Das von Hippel-Lindau-Protein (VHL) ist an der Bildung und Funktion des E3-Ubiquitin-Ligase (ECV)-Komplexes beteiligt und vermittelt somit die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von HIF-1 [109-111].

Das Protein **FIH-1** (Factor Inhibiting HIF 1) ist eine Asparaginy-Hydroxylase. Es fungiert als Transkriptionsfaktor, der bei der Regulation von zellulären Reaktionen als Folge einer Hypoxie beteiligt ist. Ihre Hydroxylaseaktivität verhindert unter hohem PO_2 durch Hemmung der p300-Bindung die Aktivität des gesamten HIF-1 Komplexes [112].

Der Name HIF leitet sich von der Tatsache ab, dass diese Faktoren unter Hypoxie stark exprimiert werden und zu den zentralen Regulatoren der Hypoxie bedingten Stressmechanismen gehört. Unter normoxischen Bedingungen ist die alpha-Untereinheit sehr instabil und wird nach nur kurzer Halbwertszeit abgebaut [113]. Die Expression von HIF-1 als Folge einer Hypoxie-bedingten Stressreaktion hat einen Einfluss auf eine Vielzahl von Regulationsmechanismen wie der unten schematisch dargestellten Abbildung 4 zu entnehmen ist [114]. Im physiologischen Zustand hat eine Zelle einen aeroben Energiehaushalt und die Regulationen der HIF-Faktoren unterliegen sehr engen Kontrollmechanismen. Durch die Bindung von HIF-1 alpha an VHL wird das entsprechende HIF-1 alpha ubiquitiniert und einer 26S-Proteasom vermittelten Degradation zugeführt [115]. VHL kann nur dann an HIF-1 alpha binden, wenn zuvor die Prolylhydroxylasen (PHD's) 1-3 HIF-1 alpha hydroxyliert haben [116, 117].

Gerät eine Zelle unter einen hypoxischen Stress, sei es durch den unmittelbaren Entzug von Sauerstoff, durch eine erhöhte Proliferation oder aufgrund einer verminderten Hydroxylierung durch PHD's, findet ein reduzierter proteasomaler Abbau von HIF-1alpha statt. HIF-1alpha wird daraufhin intrazellulär stabilisiert und in den Zellkern eingeschleust [118]. Hier kommt es in Assoziation mit ARNT (Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) und den Koaktivatoren wie der Acetyltransferase p300/CBP zu einer Komplexbildung [119]. Anschließend erfolgt eine Bindung an das HRE (Hypoxia

responsive elements), was konsekutiv zu einer gesteigerten Expression der entsprechenden Gene führt (siehe Abbildung 4) [120, 121]. Damit p300/CBP überhaupt an HIF-1 alpha bindet, darf ein bestimmter Aparaginrest nicht hydroxyliert sein. Die Dioxygenase, die dafür verantwortlich ist, wird auch Factor inhibiting HIF (FIH) genannt. Dadurch wird die Bindungsfähigkeit von HIF-1alpha abgeschwächt [121, 122]. Es handelt sich hierbei um eine sehr früh einsetzende, organunabhängige Reaktion.

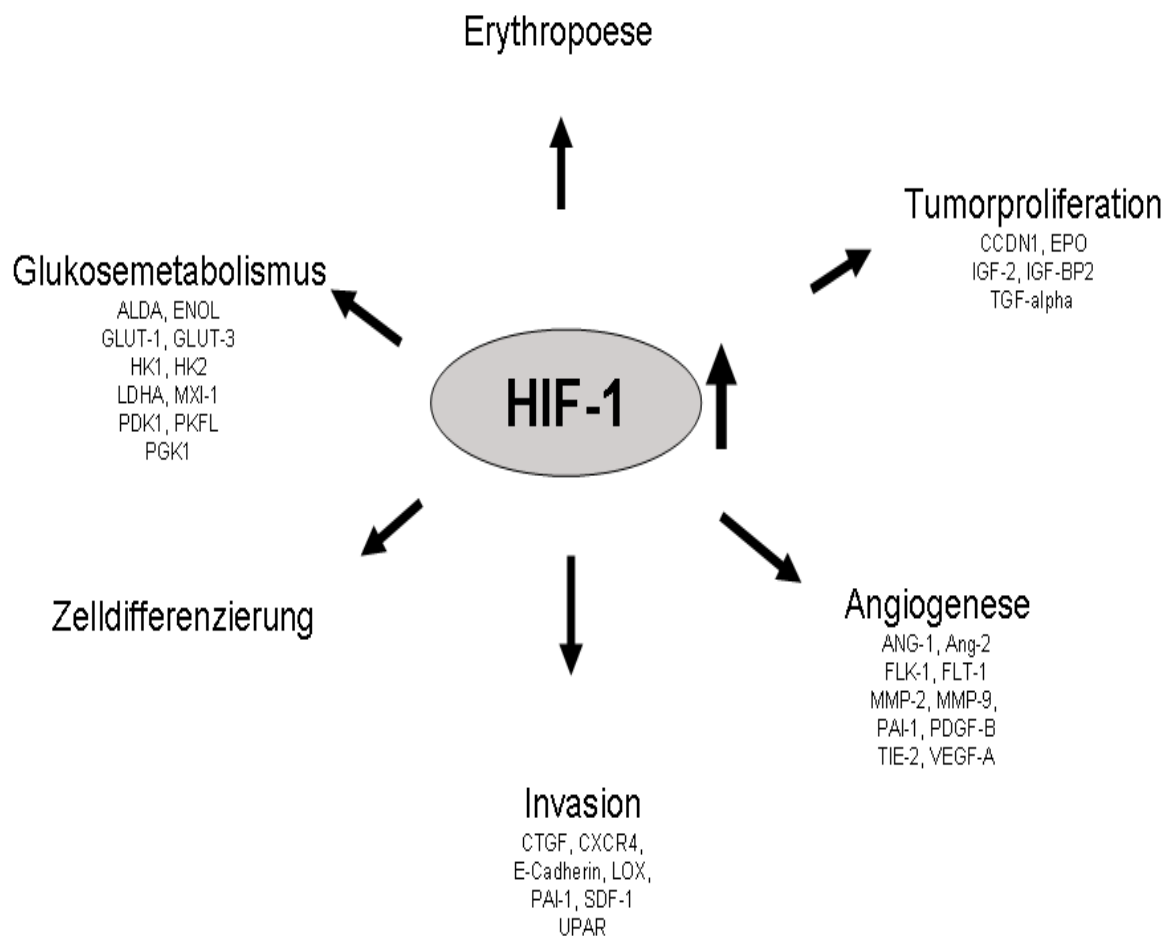


Abbildung 4: Übersicht über die HIF-vermittelten Signalwege und die durch eine HIF-Expression induzierte Genexpression [114].

2. Zielstellung

Die Expression von Mitgliedern der HIF-Familie und funktionell assoziierter Gene ist ein sehr grundlegender Reaktionsmechanismus von Tumorzellen bei hypoxisch oder Proliferations-bedingtem Stress. Als Folge der HIF-Expression kommt es zu einer Aktivierung einer Vielzahl von intrazellulären „Pathways“ wie z.B. der Angiogenese oder auch zur Modifikation des Energiestoffwechsels der Tumorzelle. Zur prognostischen Relevanz der HIF-1-Aktivierung liegen divergente Daten vor und es ist auch unklar, ob die Regulation von HIF in verschiedenen Subgruppen des Mammakarzinoms einem einheitlichen Mechanismus unterliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll/ sollen

- mittels etablierter immunhistochemischer Methoden (TMA-Technik) die Expression von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, FIH, CAIX, p300 und VHL an einer Serie von 865 Mammakarzinomen jeweils evaluiert werden,
- die Ergebnisse mit klinischen und morphologischen Befunden verglichen sowie
- die immunhistochemischen Expressionsergebnisse mit den sog. intrinsischen molekularen Mammakarzinom-Subtypen als auch mit der Langzeitprognose an einem Patientenkollektiv korreliert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Einblicke in die Biologie und Pathogenese des Mammakarzinoms und die Rolle der Aktivierung des HIF- Pathways in den verschiedenen Entwicklungswegen des Mammakarzinoms zu erhalten. Gleichzeitig sollen die sog. intrinsische molekulare Subtypisierung des Mammakarzinoms charakterisiert und die Verfahren der Immunhistochemie und TMA-Technik beschrieben werden.

Langfristig sollen die Ergebnisse zu einer verbesserten individuellen Diagnostik und Therapie von Mammakarzinom - Patientinnen beitragen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

In diesem Abschnitt wird das Patientenkollektiv, auf das sich die speziellen Untersuchungen in dieser Arbeit beziehen, klinisch und morphologisch definiert.

Ausgangspunkt der Studie waren paraffineingebettete Tumorgewebe-Proben von 1000 Patientinnen aus der Datenbank des Instituts für Pathologie Paderborn und Höxter, Husener Str. 46 a in 33098 Paderborn. Diese Patientinnen waren an einem Mammakarzinom erkrankt und sind in verschiedenen Kliniken der Landkreise Paderborn, Höxter und Soest (NRW) behandelt worden. Das Lebensalter der Patientinnen betrug im Durchschnitt 63,1 Jahre (22 bis 99 Jahre), wobei der Bezugspunkt des angegebenen Alters der Zeitpunkt der primären Karzinomdiagnose war. 80 Prozent der Frauen wiesen einen Postmenopausenstatus auf. Die Berechnung der Überlebenszeiten (Gesamt- und –rezidivfreies Überleben) bezog sich auf den Zeitpunkt der Primär-Tumordiagnosestellung. In 865 Fällen (86,5 %) handelte es sich um primäre Mammakarzinome. Das Material von 135 Patientinnen (13,5 %) stammte dagegen von Patientinnen mit lokalen Tumorrezidiven bzw. Metastasen und wurde in die vorliegende Studie nicht einbezogen.

Vor der Herstellung der speziellen TMA-Blöcke sind von den archivierten Tumor-Paraffinblöcken dieser 865 Primärtumorfälle neue repräsentative Hämatoxylin-Eosin-gefärbte (HE) Schnittpräparate von Herrn Prof. Dr. H. Bürger (Paderborn) nach den Richtlinien der WHO-Klassifikation von 2012 histologisch klassifiziert worden [37]. Die Bestimmung des Malignitätsgrades der Mammakarzinome erfolgte dabei nach der semiquantitativen Methode von Elston und Ellis (modifiziertes Grading nach Bloom & Richardson) [52]. Bei dieser Methode werden die Drüsenbildung (Tubulusbildung), die Kernpleomorphie und die Mitoserate im Karzinom jeweils nach einem Scoresystem bewertet und dann 3 Malignitätsgrade definiert [4]. Die pTN-Klassifizierung ist nach den Festlegungen der UICC-Klassifikation der 10. Auflage (2010) erfolgt. Die dabei erhobenen morphologischen Daten (Histologischer Tumortyp, Malignitätsgrad, pathologischer Nodalstatus als pN-Kategorie und Tumorgröße als pT-Status) wurden als alleinige Grundlage für die weiteren Auswertungen herangezogen und sind in der nachstehenden Tabelle 1 dokumentiert:

Histologischer Typ (nach WHO 2012)	Anzahl	Tumorgrad	pN-Kategorie	pT-Kategorie
invasiv ductal (NOS)	n = 713	G 1 = 131	pN 0 = 481	pT1a = 5
invasiv lobulär	n = 95			
muzinös	n = 22	G 2 = 442	pN 1 = 218	pT1b = 49
tubulär	n = 15			
medullär	n = 6	G3 = 292	pN 2 = 77	pT1c = 349
tubulo-lobulär	n = 3			
kribriform	n = 3		pN 3 = 89	pT2 = 362
metaplastisch	n = 2			
papillär	n = 1			pT3 = 35
mikropapillär	n = 1			
apokrin	n = 1			pT4 = 65
adenoid-zystisch	n = 1			
tubular-gemischt	n = 1			
siegelringzellig	n = 1			
Gesamtzahl	n = 865	n = 865	n = 865	n = 865

Tabelle 1: Histopathologische Typisierung der primären Mammakarzinome.

An den angefertigten TMA-Schnittpräparaten erfolgte eine immunphänotypische Klassifizierung der primären Mammakarzinome in sog. intrinsische molekulare Subtypen, die jeweils durch ein spezielles immunhistochemisches Expressionsmuster charakterisiert werden können. Als Grundlage diente hierfür die kombinierte Anwendung von 6 Biomarkern in Anlehnung spezieller Literaturstellen [84, 123, 124]. Es wurden dann nachstehende 5 molekulare Subtypen wie folgt definiert [125]:

luminal A-Subtyp ER und/oder PR positiv, Her2 negativ, Ki-67-niedrig

luminal B-Subtyp ER und/oder PR positiv, Her2 positiv u/o. Ki-67 hoch

HER2-Subtyp ER und PR negativ, Her2 positiv

basalähnlicher Subtyp ER und PR und Her2 negativ, CK5 und/oder CK14 und/oder CK17 und/oder EGFR positiv

„non expressor“ Subtyp ER und PR und Her2 negativ sowie CK5, CK14 und EGFR negativ

(*Legende* : ER: Östrogenrezeptor, PR: Progesteronrezeptor, CK: Zytokeratin EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, Ki 67: Proliferationsfaktor)

Der Grenzwert für den Ki-67 Proliferationsindex (hoch vs. niedrig) wurde mit 14% der positiven Tumorzellen festgelegt. Für ER und PR betrug der Schwellenwert zur Bestimmung der molekularen Subtypen 1% positiver Zellen. Her2-Positivität bestand entweder bei einem Dako-Score 3+, bzw. einer mittels Her2-CISH bestätigten Amplifikation des Her2-Gens. Für CK5, CK14 und CK17 wurde jegliche zytoplasmatische Positivität der Tumorzellen unabhängig von der prozentualen Ausdehnung als positives Ergebnis definiert. Das gleiche galt für EGFR, wobei hier nur die membranöse Expression gewertet wurde.

Der angegebene Wert von 14 % stammt allerdings aus nur einer Studie [84], wobei der optimale prädiktive Ki-67-Grenzwert für die Wirksamkeit einer endokrinen Therapie derzeit noch unbestimmt ist [84, 126].

Folgende Antikörper kamen bei der Klassifizierung zur Anwendung:

Antikörper	Quelle	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung
ER	Novocastra	6F11/2	1:800	EDTA pH 8,0
PR	Dako	PgR636	1:200	EDTA pH 8,0
Her2	Dako	Hercept Test Dako		Citrat Puffer pH6
Ki-67	Dako	Mib-1	1:100	EDTA pH 8,0
CK 5/14	DCS	XM26HL002	1:50	Citrat Puffer pH6
CK 17	Dako	E3	1:50	Citrat PufferpH6
EGFR	Dako	Pharm DX-Kit		Citrat Puffer pH6

Tabelle 2: Antikörper, die bei der Klassifizierung angewendet wurden.

Der immunphänotypische molekulare Subtyp der primären Mammakarzinome entsprechend der oben definierten Kriterien ist ausschließlich an den TMA-Blöcken bestimmt worden. Hierbei kam es teilweise zu Gewebeverlusten etc., so dass eine verwertbare Typisierung diesbezüglich lediglich an 783 Tumoren möglich war.

Im Ergebnis fand sich die nachstehende Häufigkeitsverteilung der molekularen Subtypen im untersuchten Patientengut:

Molekularer Subtyp des Mammakarzinoms	Häufigkeit
luminal A	n = 498
luminal B	n = 114
Her2	n = 49
basalähnlich	n = 57
„non-expressor“	n = 65
Gesamtzahl	n = 783

Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der molekularen Subtypen im Patientengut.

Langzeitverläufe konnten an 456 Mammakarzinom-Patientinnen erhoben werden, die im Zeitraum zwischen 1997 und 2003 in der St. Vincenz-Frauenklinik Paderborn nach den zu diesen Zeitpunkt gültigen Leitlinien einheitlich therapiert worden sind. Dabei sind die klinischen Daten zunächst aus den archivierten Krankenhaus-Akten generiert worden. Die weiteren nachfolgenden Daten zum Gesamt- und auch zum Rezidivfreien Überleben wurden in Zusammenarbeit mit den weiterbehandelnden Haus- und Frauenärzten erhoben.

3.2 Methoden

Zur Lösung der Fragestellung der vorliegenden Promotionsarbeit kam insbesondere ein Verfahren zur Anwendung, das eine Visualisierung und gleichzeitig eine lokalisatorische Darstellung von speziellen Proteinen (Zielantigenen) am histologischen Schnittpräparat ermöglicht. Diese Technik wird als *Immunhistochemie* bezeichnet. Um mit diesem Verfahren zeiteffektiv bzw. kostengünstig zu arbeiten, ist in den letzten Jahren eine spezielle Analysetechnik entwickelt worden, die insbesondere für Forschungszwecke in zunehmendem Maße zur Anwendung kommt: Die *Tissue Microarray-Technik* (TMA) [127]. Die heterogene Natur des Mammakarzinoms stellt auch die immunhistochemisch-basierte Expressionsanalyse vor eine große Herausforderung, so dass neue Techniken – wie die TMA - in dieser Analyse sehr hilfreich waren. Gleichzeitig muss darauf hingewiesen werden, dass zur Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von erhobenen immunhistochemischen Ergebnissen zusätzlich eine Standardisierung der oftmals verwendeten semiquantitativen Auswertung erforderlich ist. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate erfolgte mittels eines Lichtmikroskops unter Anwendung etablierter Schemata. Die statistische Auswertung der Daten wurde dann unter Zuhilfenahme eines Statistikprogrammes durchgeführt.

Somit sind in der vorliegenden Studie vier Analysemethoden zur Anwendung gekommen, die jeweils im Allgemeinen und dann im Speziellen nachfolgend erklärt werden:

3.2.1 Immunhistochemie

3.2.1.1 Allgemeine Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine analytische Methode, mit der bestimmte Zell- bzw. Gewebsstrukturen (insbesondere Proteine) mit Hilfe von farbmarkierten Antikörpern auf einem histologischen Schnittpräparat (Objektträger) sichtbar gemacht werden können [128].

Mit dieser Methode lässt sich beispielsweise bestimmen, ob ein bestimmtes Protein in einem Gewebe vorhanden ist, wie dieses Protein im Gewebe verteilt ist und welchem Kompartiment es lokalisatorisch zugeordnet werden kann (z.B. Zellkern, Zellmembran, Zytoplasma). In der Medizin kommt dieses Verfahren insbesondere, aber nicht ausschließlich bei der Identifizierung, Klassifizierung und prognostischer und/oder prädiktiver Charakterisierung von malignen Tumoren zur Anwendung [129].

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert grundlegend auf einer Antigen-Antikörper Reaktion, d.h. einer Affinität eines Antikörpers zu einem bestimmten Antigen.

Epitope sind somit antigene Teilstrukturen von Antigenen, wobei ein Antigen mehrere Epitope aufweisen kann. Um allerdings diese Antigen-Antikörper-Reaktion und somit das Antigen bzw. die Zielstruktur sichtbar zu machen, wird der Antikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt. Durch verschiedene hochsensible Detektionssysteme können heute schon sehr geringe Mengen eines Antigens verstärkt und sichtbar gemacht werden. Letztlich kommt es darauf an, ein Signal am Ort des Epitops (und nur dort) sichtbar zu machen. Der Antikörper, der gegen das Ziel-Antigen bzw. den Epitop gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet. Letzterer sollte im besten Falle eine hohe Spezifität und Affinität aufweisen, um insbesondere Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen auszuschließen. Ein großer Vorteil der Immunhistochemie ist auch die Tatsache, dass sich die Zielantigene genau lokalisieren lassen (z.B. Zellkern, Zytoplasma, Zellmembran), wobei bei entsprechender Standardisierung auch bei bestimmten Antigenen eine Quantifizierung möglich ist (z.B. Her2/neu Test bei Mamma- oder Magenkarzinomen).

Antikörper gehören chemisch zu einer Gruppe von Proteinen, die Immunglobuline genannt werden. Jeder Antikörper besteht aus 2 identischen Ketten, wobei man eine schwere und eine leichte Kette unterscheidet. Die leichten Ketten sind entweder vom lambda- oder vom kappa-Typ. Die Antikörperbildung ist ein ausgesprochen komplexer Vorgang und spielt sich auf molekularer Ebene ab [130].

Man unterscheidet monoklonale und polyklonale Antikörper. Monoklonale Antikörper sind als Produkt eines einzelnen Klons von Plasmazellen definiert und reagieren nur mit einem bestimmten Epitop des Antigens, gegen das sie generiert wurden [131]. Dagegen werden polyklonale Antikörper von verschiedenen Plasmazellen gebildet und

reagieren demzufolge mit verschiedenen Epitopen des Antigens. Bei der Herstellung polyklonale Antikörper wird vorrangig das Kaninchen genutzt [131].

Da eine Antigen-Antikörperreaktion an einem Zielgewebe auf einem Objektträger nicht sichtbar ist, muss eine Farbdarstellung dieser Reaktion erfolgen. Hierzu nutzt man Enzym-Substratreaktionen, um farblose Verbindungen in gefärbte Endprodukte umzuwandeln. Bei den Enzymen wird entweder die Meerrettichperoxidase oder die alkalische Phosphatase genutzt. Als Substrate werden unterschiedliche Verbindungen verwendet, die nach der Enzym-Substratkomplexbildung in gefärbte und unlösliche Produkte umgewandelt und deshalb als Chromogene bezeichnet werden. Als Chromogene kommen insbesondere Diaminobenzidin(DAB), 3-Amino-9-Ethyl-carbazol (AEC) und Neufuchsin zur Anwendung [132].

Immunhistochemische Verfahren sind Mehrschrittverfahren, die relativ viel Zeit in Anspruch nehmen und auch fehleranfällig sind. Deshalb ist eine Standardisierung der Verfahren anzustreben, z.B. durch die Anwendung von Immunfärbeautomaten [133]. Die Austestung der Verfahrensschritte zur Darstellung eines speziellen Antigens/Epitops (Proteins) mittels der Immunhistochemie erfordert nicht selten einen großen Aufwand, um unter den Bedingungen eines spezifischen Labors konstante und verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

Bezüglich der speziellen immunhistochemischen Methodik unterscheidet man vereinfacht die direkte und die indirekte Immunfärbemethode [132]:

Bei der direkten Methode reagiert ein Farbstoffmarkierter Antikörper *direkt* mit dem Zielantigen. Im Gegensatz dazu ist die indirekte Methode dadurch gekennzeichnet, dass zuerst ein nicht Farbstoffmarkierter Antikörper mit den Zielantigenen reagiert und in einem zweiten Schritt ein farbstoffmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen wird, der mit dem Primärantikörper eine Bindung eingeht. Diese Methode besitzt auch eine höhere Sensitivität, da mehrere Sekundärantikörper mit verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren.

Es existiert inzwischen eine Vielfalt von verschiedenen modifizierten Immunfärbetechniken (Enzymkomplexmethoden, Avidin-Biotinmethoden, Polymerkonjugatmethoden etc.). Derzeit basieren die meisten Immunfärbemethoden auf der hohen Affinität von Streptavidin und Avidin für Biotin. Dabei hat sich insbesondere die sog.

LSAB-Methode bewährt. Diese Methode läuft in aller Regel nach folgendem Muster ab:

1. Maus- (oder Kaninchen-)Primärantikörper, 2. Anti-Maus-(oder Anti-Kaninchen)-Sekundär- Antikörper mit Biotinylierung, 3. Streptavidin-Enzym-Konjugat [132].

Die Immunhistochemie wird als Methode zumeist an formalinfixiertem, paraffin- eingebetteten Gewebe (sog. Paraffinblock-Material) angewendet. Daneben kann diese Analysemethode auch an Gewebematerial in Kunststoffblöcken sowie an Gefriermaterial durchgeführt werden. Formalinfixiertes und paraffineingebettetes Gewebe ist allerdings wegen der ausgezeichneten Erhaltung der morphologischen Strukturen immer noch Mittel der Wahl für immunhistochemische Untersuchungen im Rahmen der Routinediagnostik sowie auch für klinische und Forschungsstudien [134]. Die Formalinfixierung hat allerdings auch den Nachteil, dass sie die Immunreaktivität zahlreicher Antigene reduziert bzw. sogar aufhebt [135]. Dabei können Epitope die Formalinfixierung unverändert überstehen, wobei andere (formalinsensitive) Epitope jedoch eine wesentliche Änderung ihrer dreidimensionalen Struktur durch die Bildung chemischer Quervernetzungen (sog. cross links) erfahren. Das Ergebnis Letzterer ist eine partielle oder komplette Aufhebung der Immunogenität eines Antigens. Dieser Vorgang wird auch als „Maskierung“ eines Antigens bzw. Epitops bezeichnet. Um diese maskierten Antigene bzw. Epitope nach Formalinfixierung trotzdem einer Antigen-Antikörper-Reaktion zugänglich und somit sichtbar zu machen, ist eine sog. Antigen demaskierung (Antigen Retrieval) erforderlich. Hierbei werden die oben genannten Vernetzungen „aufgebrochen“. Je nach Antigen bzw. Epitop kommen zur Demaskierung verschiedene Methoden zur Anwendung [136] :

- A. Proteolytische Vorbehandlung (z.B. Trypsin-Andauung, Proteinase etc.)
- B. Hitzevorbehandlung in Mikrowellenöfen, Wasserbädern, Dampfgarern, Dampfdrucktöpfen oder Autoklaven in wässriger Lösung (sog. Retrievallösung, Pufferlösung mit unterschiedlichen pH-Werten)

Grundsätzlich kommen zur Herstellung eines immungefärbten Schnittpräparates (Objektträgers) als Ziel- oder Endprodukt grob folgende Verfahrensschritte zur Anwendung:

- A. Herstellung eines Paraffinblocks mit dem entsprechenden Zielmaterial
- B. Anfertigung von Schnittpräparaten vom Paraffinblock mit nachfolgender Entparaffinisierung [137]
- C. Spezielle Immunfärbung des entparaffinierten Schnittpräparates per Hand oder in einem Färbeautomaten ggf. mit vorangegangener Demaskierung
- D. Gegenfärbung des Schnittpräparates (in aller Regel mit Hämalau) und Eindecken zur Konservierung

Es muss erwähnt werden, dass für die Validierung immunhistochemischer Färbungen Reagenzien- und Gewebekontrollen (z.B. on slide Kontrollen) eine sehr große Bedeutung haben, da sonst die Interpretation der Färbungen willkürlich und in der klinischen Diagnostik nicht zu verantworten wäre. Grundsätzlich muss die Auswertung der Immun-Färbe-ergebnisse auf dem Schnittpräparat auch *immer* im Abgleich mit den morphologischen Befunden in der Routinefärbung (in aller Regel Hämatoxylin-Eosin-Färbung) erfolgen. Nicht-spezifische Reaktionen (z.B. Hintergrundfärbungen durch Antigendiffusion, Kreuzreaktivität, endogene Bindungs- oder Enzymaktivitäten, hydrophobe Wechselwirkungen etc.) können dann entsprechend kritisch gewertet und ggf. subtrahiert werden [138, 139].

3.2.1.2 Spezielle Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate von den TMA-Blöcken

Ausgangspunkt für die Anfertigung immungefärbter Schnittpräparate waren die speziell hergestellten TMA-Blöcke (siehe Punkt 3.2.2.2). Ein auf einer Kühlplatte gekühlter TMA-Block wurde in ein Rotationsmikrotom (Firma Thermo Scientific Microm HM 240E) eingespannt. Anschließend sind mit diesem Gerät Paraffinschnitte in einer Dicke von 1 - 2 Mikrometer angefertigt, in einem Wasserbad „gestreckt“ und dann im Anschluss auf einen beschichteten Objektträger (Superfrost Plus, Firma Menzel) aufgezogen worden. Diese Objektträger wurden entsprechend gekennzeichnet (Name des Antikörpers etc.) und dann über Nacht bei einer Temperatur von 62 °C getrocknet, so dass eine gute Haftfähigkeit der Gewebeschnitte auf dem Glas gewährleistet wurde. Am nächsten Tag erfolgte die Entparaffinisierung und Rehydrierung der Schnittpräparate in Glasküvetten nach folgendem Ablauf:

Abkühlung der Schnittpräparate auf Zimmertemperatur

15 min Bad in frischem angewärmten Xylol

10 min Bad in 99% Alkohol

10 min Bad in 96 % Alkohol

10 min Bad in 70 % Alkohol

10 min Spülung in Aqua dest. zur Rehydratisierung

Anschließend ist eine Hitzevorbehandlung an den entparaffinisierten Schnittpräparaten durchgeführt worden, um eine gute Demaskierung der Antigene bzw. Epitope zu erreichen. Die Hitzebehandlung erfolgte mit der Wasserbadmethode. Dabei wurden zunächst die Schnittpräparate in Glasküvetten in eine spezielle Pufferlösung (s.u.) komplett eingetaucht und dann 40 min in ein Wasserbadgerät (GFL Typ 1002 der Firma Gesellschaft für Labortechnik GmbH Burgwedel) gestellt. Die Temperatur des Wasserbades ist durch ein Thermostat auf 98,5 °C konstant gehalten worden. Als Pufferlösungen kamen zum einen ein Citratpuffer der Firma Dako mit dem pH-Wert 6,0 (Dako retrieval solution, K 5207) und zum anderen ein EDTA-Puffer mit dem pH-Wert 8,0 der Firma Zytomed (ZUC 040) zur Anwendung. Die Pufferlösungen werden von den Herstellerfirmen konzentriert geliefert und sind vor dem Gebrauch 1 : 10 mit destilliertem Wasser verdünnt worden. Nach Ablauf der 40 min dauernden Erhitzung im Wasserbad wurden die Küvetten mit den Schnittpräparaten aus dem Gerät entfernt, auf mindestens 40 °C abgekühlt und anschließend in eine spezielle Pufferlösung abgestellt. Bei dieser Pufferlösung handelte es sich um einen Waschpuffer der Firma Dako (TRIS gepufferte Kochsalzlösung pH 7.6 + Tween, 10 fach konzentriert, Bestell-Nr. Dako S 3006) in einer Verdünnung von 1:10.

Die eigentliche spezifische Immunfärbung der entparaffinisierten Schnittpräparate erfolgte dann in einem Immunfärbeautomaten der Firma Dako (Code Nr. S 3400). Hierbei kam für die spezifische Färbung die LSAB-Methode (siehe oben Punkt 3.2.1.1) zur Anwendung. Speziell ist das darauf beruhende Detektionssystem der Firma Dako (Dako REAL Detection System Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse Kit, K 5001, www.dako.com) benutzt worden. Nach der entsprechenden Bestückung des Automaten mit den Schnittpräparaten und Reagenzien wurde die Immunfärbung unter Zuhilfenahme eines Softwareprogrammes nach einem festgelegten Protokoll durchgeführt. Im Übrigen erfolgte die u.g. Verdünnung der konzentriert gelieferten

Antikörper mittels Antibody Diluent der Firma Dako (Code Nr. S 2022). Nachfolgend wird das speziell angewandte Färbeprotokoll im Färbeautomaten dokumentiert:

- 5 min Blockierung mit Peroxidase (Dako REAL Peroxidase-Blocking Sol. S 2023)
- Spülen mit TRIS Puffer + Tween der Firma Dako S 3006
- Inkubation der verdünnten Primär-Antikörper nach Zeitvorgabe (i.d.R. 30 min)
- Spülen mit TRIS Puffer
- 15 min Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper (Flasche A aus Dako REAL Detection System Peroxidase/DAB Kit K 5001)
- Spülen mit TRIS Puffer
- 15 min Inkubation mit Streptavidin Peroxidase (Flasche B aus Dako REAL Detection Kit K 5001)
- Spülen mit TRIS Puffer
- 2 x 5 min Inkubation mit DAB (Flasche C aus Dako Detection Kit K 5001)
- Spülen mit Aqua dest.

Nach Abschluss der Immunfärbung wurden die Schnittpräparate aus dem Färbeautomaten genommen und in den o.g. Waschpuffer der Firma Dako abgestellt. Anschließend erfolgte die Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun und anschließender Bläuung unter fließendem Wasser für 7 min. Zur Konservierung des Gewebes ist abschließend ein Eindecken der Schnittpräparate unter Verwendung des Eindeckmediums Kaisers Glycerin Gelantine (Firma Merck Best. Nr. 109242) mit einem Deckgläschen erfolgt.

Nachstehend sind die verwendeten Antikörper mit den speziellen Protokollangaben aufgelistet:

1. **CA IX (Anti-Carbonic Anhydrase IX)**

Firma : Abcam Kat. Nr. 15086 , polyklonaler Antikörper

Verdünnung : 1 : 1000

Lokalisation : Zellkern, insb. Nukleolus, und Zellmembran

Vorbehandlung: Hitzedemaskierung im Wasserbad und Zitratpuffer pH 6,0

Antikörperinkubationszeit : 60 min

2. **p300**

Firma : Santa Cruz Biotechnology , polyklonaler Antikörper, Klon N-15

Verdünnung : 1 : 200

Lokalisation : Zellkern

Vorbehandlung: Hitzedemaskierung im Wasserbad und Zitratpuffer pH 6,0

Antikörperinkubationszeit : 120 min

3. **VHL (von Hippel-Lindau Protein)**

Firma : BD Pharmingen , monoklonaler Antikörper, Klon Ig 32

Verdünnung : 1 : 100

Lokalisation : Membranös

Vorbehandlung: Hitzedemaskierung im Wasserbad und Zitratpuffer pH 6,0

Antikörperinkubationszeit : 60 min

4. **FIH (Factor Inhibiting HIF 1)**

Firma : Novus Biologicals , polyklonaler Antikörper, Cat. Nr. NB 100-428

Verdünnung : 1 : 100

Lokalisation : Zellkern

Vorbehandlung: Hitzedemaskierung im Wasserbad und Zitratpuffer pH 6,0

Antikörperinkubationszeit : 60 min

5. HIF-1 alpha (Hypoxie induzierter Faktor 1 alpha)

Firma : BD Transduction Lab. ,Cat. Nr. 610959, Klon 54/HIF-1 a

Verdünnung : 1 : 50

Lokalisation : Zellkern

Vorbehandlung: Hitzedemaskierung im Wasserbad in EDTA-Puffer pH 8,0

Antikörperinkubationszeit : 120 min

6. HIF-2 alpha (Hypoxie induzierter Faktor 2 alpha)

Firma : Abcam , monoklonaler Antikörper, Klon ep190b

Verdünnung : 1 : 700

Lokalisation : Zellkern

Vorbehandlung: Hitzedemaskierung im Wasserbad in EDTA-Puffer pH 8,0

Antikörperinkubationszeit : 120 min

3.2.2 Tissue Microarray-Technik (TMA)

3.2.2.1 Allgemeine Grundlagen der Microarray-Technik

Die Microarray-Technik ist eine Sammelbezeichnung für moderne molekularbiologische Untersuchungssysteme, die die gleichzeitige Analyse von einer Vielzahl von Einzelnachweisen an einer geringen Menge biologischen Probematerials erlauben. Es existieren unterschiedliche Formen von Microarrays, die auch als „Genchips“ oder „Biochips“ bezeichnet werden, da sie wie ein Computer viele Informationen auf kleinstem Raum enthalten können.

Es existieren derzeit verschiedene nachstehende Microarray-Techniken, wobei im Rahmen der vorliegenden Studie der Tissue-Microarray Technik (TMA) eine besondere Bedeutung zukam und diese anschließend genauer beschrieben wird :

Protein-Microarrays

Antikörper-Microarrays

Tissue-Microarrays

DNA-Microarrays

Die Tissue Microarray-Technik (im Folgenden: TMA) ist methodisch erstmals von Battifora 1986 beschrieben worden [127]. Diese Technik ist dann 1998 von Kononen und Mitarbeitern in Kooperation mit dem Unternehmen Beechers Instruments Inc. (U.S.A) etabliert und technisch weiterentwickelt worden, wobei heutzutage bereits automatisierte TMA-Geräte mit EDV-Anbindung zur Auswertung verwendet werden [140]. Diese Technik ist in der neueren Literatur auch in Übersichtsarbeiten ausführlich beschrieben worden [141].

Grundsätzlich basiert das System der TMA auf dem kombinierten Einbringen einer Vielzahl archivierter unterschiedlicher Gewebeproben in einen einzigen Paraffinblock [142]. Diese Gewebeproben (ca. 0,6 bis 3 mm) werden dazu in einer genau definierten Reihenfolge in den Paraffinblock eingebracht, so dass dann nachfolgend auf dem gefärbten Schnittpräparat eine entsprechende Zuordnung gewährleistet ist [143]. Derzeit können mit diesem Verfahren bis zu 1000 Gewebeproben auf einen Objektträger simultan aufgebracht und in einem einzigen Arbeitsgang durch

unterschiedliche Analyseverfahren untersucht werden. Die Anwendung der TMA Technik bedeutet im Vergleich zur konventionellen Analyse (z.B. im Rahmen der Immunhistochemie) eine dramatische Steigerung der Effizienz und Kostenreduktion insbesondere bei der Untersuchung unterschiedlicher Gewebeproben. Somit erweitern sich deutlich die Möglichkeiten für die Identifizierung von neuen potentiellen Prognose- und prädiktiven Faktoren bzw. Biomarkern speziell bei malignen Tumoren [144]. Nachdem man ein bestimmtes Gen identifiziert hat, kann man mit der TMA-Technik das korrespondierende Protein (Genexpressionsprofil) an einer großen Zahl unterschiedlicher und genau morphologisch definierter Tumoren sehr schnell und ökonomisch austesten und so eine Aussage darüber treffen, ob das Proteinexpressionsmuster bei Kenntnis des klinischen Verlaufs prognostische und/oder prädiktive Bedeutung hat [145, 146].

Auch in der histologischen Routinediagnostik ist die Anwendung der TMA-Technik dann von großem Vorteil, wenn ein bereits etablierter oder auch neu eingeführter Antikörper bezüglich der Sensitivität und Spezifität an einem speziellen (meist malignen) Tumor ausgetestet werden soll und dafür Tumor-TMAs mit einer Vielzahl von Gewebeproben unterschiedlicher Herkunft dieser Tumorentität zur Verfügung stehen.

Neben der in dieser Arbeit angewendeten Multi-Tumor-TMA-Technik kommen noch weitere TMA-Analysemethoden zur Anwendung: Kryo-TMA, Progressions-TMA und Prognose-TMAs. Auch manuelle und sehr kostengünstige TMA-Verfahren sind in der neueren Literatur beschrieben worden [147].

Die wesentlichen Vorteile der TMA im Vergleich zur konventionellen Analyse an den üblichen Gewebeproben (Paraffinblöcken) lassen sich wie folgt zusammenfassen [148]:

1. Signifikant höherer Probendurchsatz pro Zeiteinheit.
2. Uniformer Analysevorgang für eine große Anzahl unterschiedlicher Tumoren unter identischen Bedingungen (Vorbehandlung, Anfärben etc.).
3. Analyse kann automatisiert und die Daten können per EDV ausgewertet werden.
4. Sehr ökonomisches Verfahren im Rahmen der Suche bzw. des Screenings nach prognostisch relevanten bzw. prädiktiven Biomarkern an Tumorproben großer Patientenzahlen mit entsprechender hoher statistischer Relevanz.

5. Sehr ökonomische Verfahren zur Austestung von bereits etablierten bzw. neu eingeführten kommerziellen Markern bzw. Antikörpern an Tumor-TMAs zur Frage der Sensitivität und Spezifität in der histologischen Routinediagnostik.
6. Möglichkeit der mehrmaligen Testung einer großen Zahl nahezu identischer Gewebeareale durch die Anfertigung serieller TMA-Schnitte (z.B. zum Nachweis einer Koexpression von Markern in einem Gewebe etc.).
7. Möglichkeit der Anwendung unterschiedlicher analytischer Verfahren wie der Histochemie, Immunhistochemie sowie der Molekularbiologie (z.B. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), chromogene in situ Hybridisierung (CISH), in situ-Polymerase Kettenreaktion (in situ-PCR), in situ reverse Transkriptase-PCR am TMA-Material.
8. Herstellung von Gewebekontrollblöcken für die Routinediagnostik.

Allerdings existieren auch Nachteile der TMA-Technik, die im Folgenden aufgezeigt werden [149]:

1. Frage der Repräsentativität der aus einem Paraffinblock herausgestanzten Gewebezylinder zur Herstellung eines TMA-Blockes im Vergleich zur Gesamtläsion. Diese Frage stellt sich insbesondere bei heterogen aufgebauten malignen Tumoren. Zum Beispiel zeigen Mammakarzinome nicht selten eine heterogene Expression des Progesteronrezeptors. Es ist deshalb eine Evaluierung notwendig, um festzustellen, wie hoch die Anzahl der aus einem Tumor zu entnehmenden Zylinder für eine spezielle repräsentative Charakterisierung sein muss [150, 151].
2. Die manuelle Herstellung von TMA-Blöcken ist sehr zeitintensiv.
3. Die Herstellung der TMA-Blöcke mit automatisierten TMA-Geräten ist kostenintensiv.
4. Die automatisierte Auswertung erfordert ein spezielles Software-Programm.

3.2.2.2 Herstellung der speziellen Tissue Microarray – Blöcke

Grundlage der Herstellung der Tissue Microarray Blöcke (TMA-Blöcke) war das archivierte Tumorblockmaterial von 1000 Mammakarzinom-Tumorproben des Instituts für Pathologie Paderborn und Höxter (siehe Punkt 3.1.) Die Herstellung der TMA-Blöcke erfolgte manuell durch Herrn Prof. Dr. H. Bürger vom Institut für Pathologie Paderborn / Höxter mit Hilfe eines sog. Arrayers der Firma Beecher Instruments Corp. .

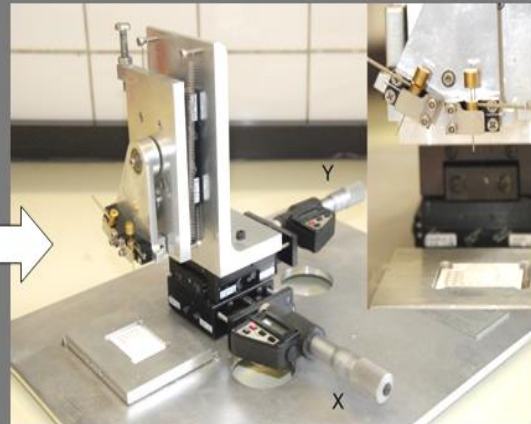
In der zugehörigen Datenbank wurden alle klinisch relevanten Daten erfasst. Zunächst sind von den paraffineingebetteten Tumorproben HE gefärbte Schnittpräparate angefertigt worden. Auf diesen Schnittpräparaten erfolgte dann die Markierung eines geeignet erscheinenden Tumorareals mit einem Faserstift. Diese Markierung diente dem Zweck, den entsprechenden Tumorausschnitt auf dem Paraffinblock wieder aufzufinden. Anschließend ist aus dem Spendertumorblock ein Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm mit einer Hohnadel herausgestanzt worden. Am Empfängerblock erfolgte bereits im Vorfeld eine gleichgroße Ausstanzung aus dem zunächst „leeren“ Paraffinmaterial, die verworfen und in deren dann freien Hohlraum der o.g. tumortragende Gewebezylinder eingesetzt worden ist. Die „Implantation“ der Tumorzylinder in den Empfängerblock erfolgte in einem Abstand von 0,2 mm. Somit ließen sich die 1000 Tumorproben auf nur 3 Empfängerblöcke verteilen. Danach wurde noch eine sog. Homogenisierung durchgeführt, die den Zweck hatte, die einzelnen Tumorstanzen mit dem Empfängerblock zu verschmelzen. Dazu wurden die Empfängerblöcke vorsichtig erwärmt. Als Endprodukt sind so TMA-Blöcke entstanden, von denen serielle Schnittpräparate für die immunhistochemische Untersuchung angefertigt werden konnten. Auf den fertigen Schnittpräparaten ist dann zur leichteren Orientierung ein Raster, das jeweils 100 Proben sektorenweise erfasst, eingerichtet worden (siehe Abbildung 8). Die einzelnen Sektoren wurden durch römische Ziffern in aufsteigender Reihenfolge nummeriert. Darüber hinaus erfolgte innerhalb eines Sektors eine Einteilung entlang der vertikalen Achse durch die Buchstaben A – J und in der horizontalen Achse mit den Ziffern 1 – 10. So konnte jede Tumorprobe genau in diesem Koordinatensystem lokalisiert werden. Speziell ließen sich die 865 Proben der Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom nach dem Koordinatenverfahren eindeutig zuordnen und entsprechend auswerten.

In den folgenden Abbildungen 5 und 6 wird die Herstellung von TMA-Schnittpräparaten zur histologischen Auswertung exemplarisch dargestellt. Dabei erfolgt im ersten Schritt die Anfertigung des TMA-Blockes und im zweiten Schritt wird vom TMA-Block ein HE-gefärbtes bzw. ein immungefärbtes Schnittpräparat erstellt.

Anfertigung eines TMA – Blockes



Primäre Paraffinblöcke jeweils mit differenten Mammakarzinomen



Sog. Arrayer zum Herausstanzen und Einsetzen von Gewebeproben



TMA-Block mit zahlreichen unterschiedlichen Gewebeproben

Abbildung 5: 1. Schritt : Anfertigung eines TMA – Blockes.

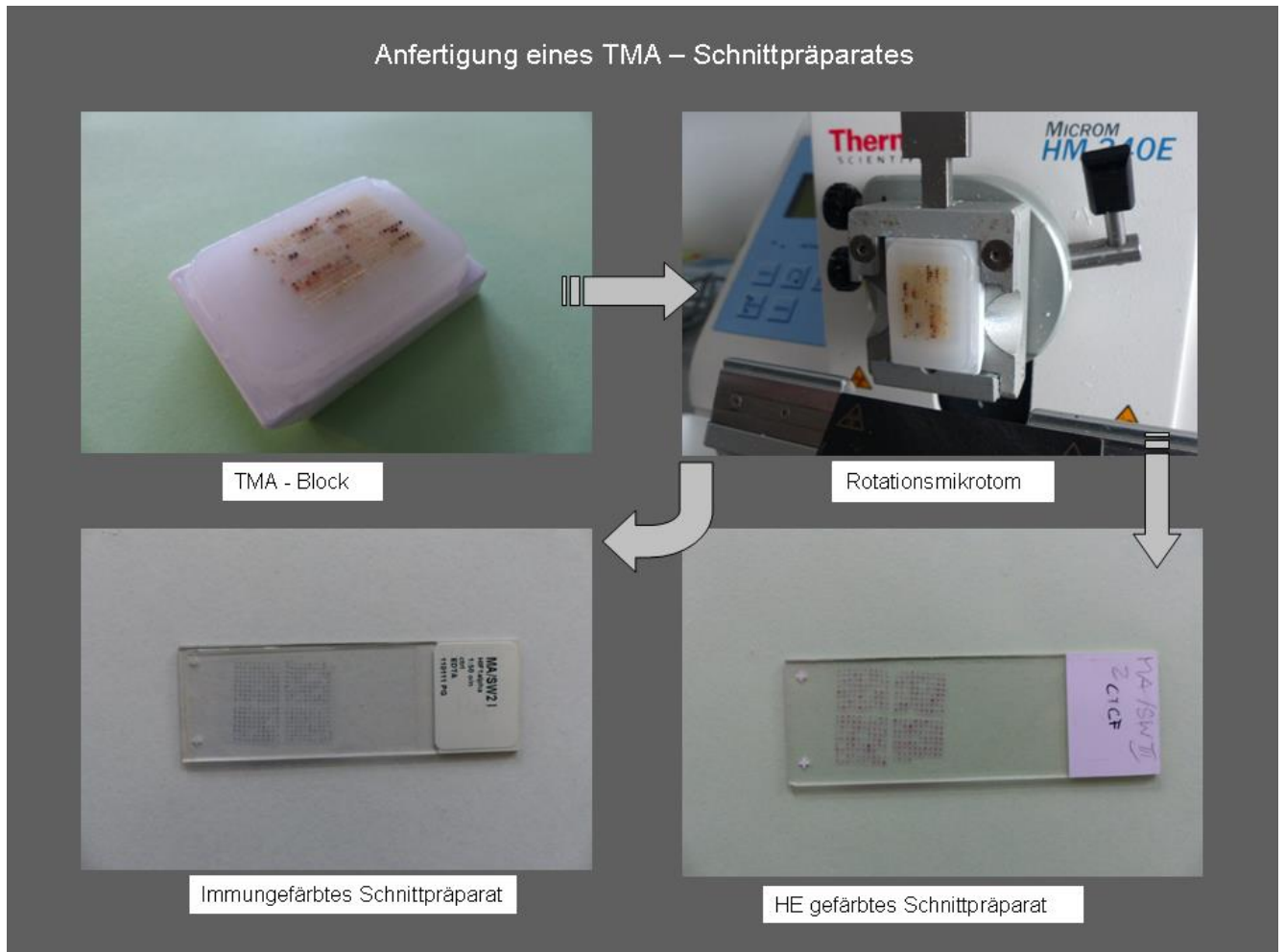


Abbildung 6: 2. Schritt : Anfertigung von TMA-Schnittpräparaten vom TMA-Block.

Die nachstehenden Abbildungen illustrieren einen TMA-Paraffinblock in starker Vergrößerung (Abbildung 7), das zugehörige HE (Hämatoxylin-Eosin)-gefärbte Schnittpräparat (Abbildung 8) sowie das mikroskopische Bild von einem TMA-Schnittpräparat bei einer 20 fachen Vergrößerung (Abbildung 9). Man erkennt auf dem HE-Schnittpräparat sehr gut die rasterförmige Unterteilung in 4 Sektoren.

(Quelle: Institut für Pathologie Paderborn-Höxter)

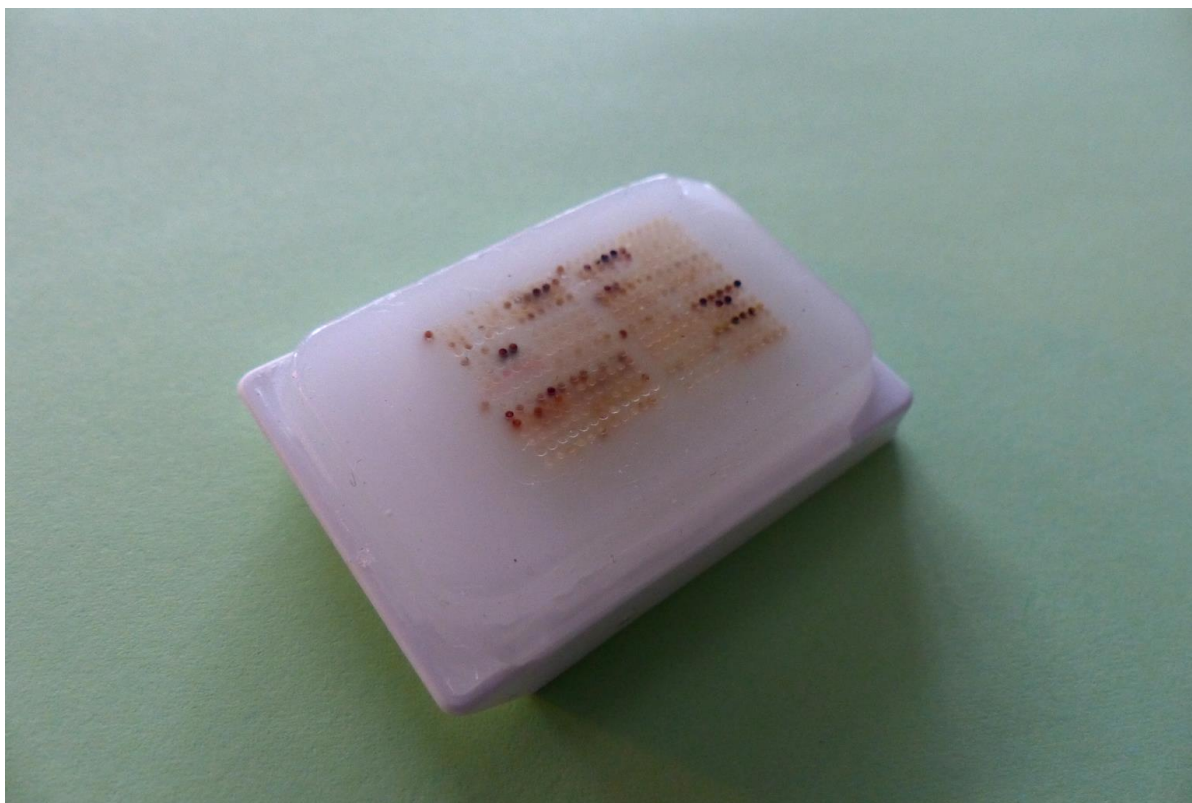


Abbildung 7: Tissue Microarray-Block (TMA-Block).

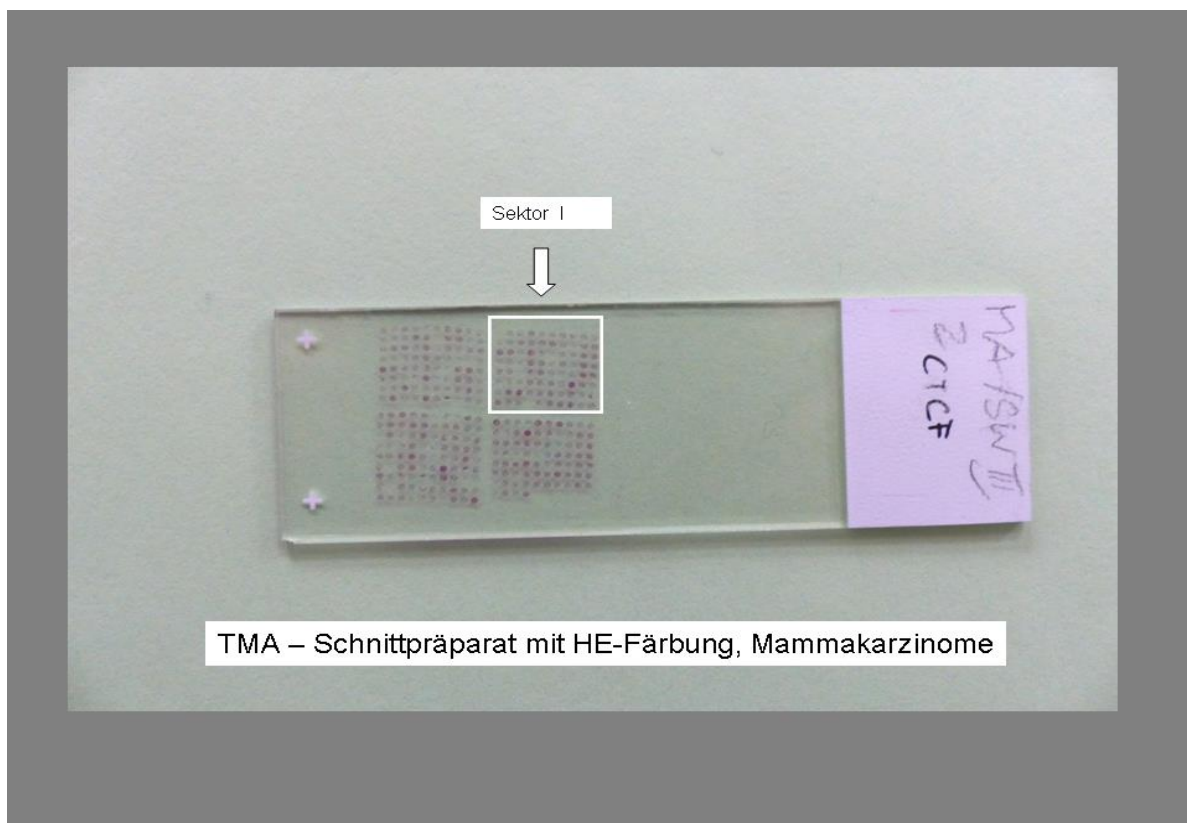


Abbildung 8: HE-gefärbtes Schnittpräparat vom TMA – Block.

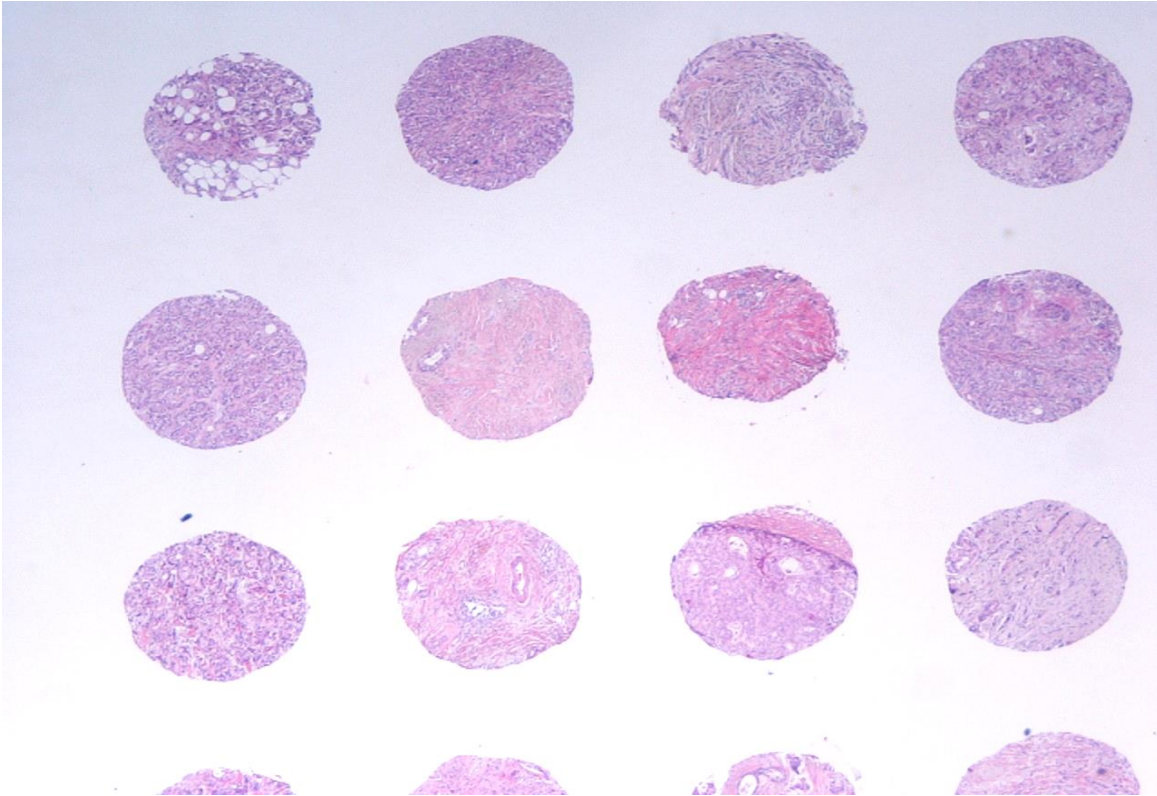


Abbildung 9: Microarray HE-Färbung, Mammakarzinome, 20 x Vergrößerung.

3.2.3 Lichtmikroskopische Analyse und Auswertungsmethodik

Die Erhebung der Ergebnisse der speziellen Immunfärbungen mit den Zielmarkern für die vorliegende Promotionsarbeit erfolgte mittels eines Lichtmikroskops der Firma Olympus vom Typ BX 51. Hierbei standen Objektive für unterschiedliche Vergrößerungen zur Verfügung. Diese Auswertung wurde durch Herrn Prof. Dr. H. Bürger vom Institut für Pathologie in 33098 Paderborn, Husener Str. 46 a, durchgeführt. Je nach Immunmarker ist die Membran- oder Zytoplasma- oder Kernanfärbung zur Auswertung herangezogen worden (siehe Tabelle unten). Die spezifische Immunreaktion ließ sich durch eine braune Farbe (Diaminobenzidin DAB) im TMA-Schnittpräparat darstellen. Jede Gewebeprobe auf den TMA-Schnittpräparaten ließ sich anhand vorher definierter Koordinaten eindeutig einem Tumor bzw. einer Patientin zuordnen (siehe auch Punkt 3.2.2.2).

Die Auswertung der Zielmarker wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Zielmarker	0	1+ Positivität	2+ Positivität	3+ Positivität
<i>CA IX</i>	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
<i>p 300</i>	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
<i>VHL</i>	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
<i>FIH</i>	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
<i>HIF-1 alpha</i>	<5% neg.	>= 5%	= positives Ergebnis	
<i>HIF-2 alpha</i>	<5% neg.	>= 5%	= positives Ergebnis	

Tabelle 4: Bewertungsschema der Färbungen.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die vorliegende Arbeit wurde mit einem statistischen Auswertungsprogramm (SPSS^R) bearbeitet, so dass dabei die Überlebenskurven mittels der Erstellung von Kaplan-Meier-Kurven bestimmt wurden. Die genaue Korrelation der Parameter untereinander erfolgte mittels Chi²-Tests und Rank-Korrelation. Des Weiteren wurden als statistisch signifikant alle Ergebnisse $p < 0,05$ bewertet. In Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. rer. nat. Eberhard Korsching, Institut für Bioinformatik, Universitätsklinikum Münster, erfolgte die Permutationstestung unter Verwendung eines speziellen, von PD Dr. Korsching und Herrn Prof. Bürger entwickelten biomathematischen Algorithmus [152].

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Expression der Marker zur Bestimmung des intrinsischen molekularen Subtyps sind in Tabelle 5 dargestellt. Nachfolgend wird dann die Häufigkeit der Expression von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300, VHL, FIH und CA IX in Tabelle 6 aufgelistet.

Eine Korrelation der Marker HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, CA IX, VHL, FIH und p300 mit klinisch-pathologischen Parametern wie der Tumorgröße, dem Nodalstatus und dem Malignitätsgrad wird in Tabelle 7 abgebildet.

Es zeigte sich eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen der Expression von **HIF-1 alpha** und Markern des basalen Phänotyps (CK5/6, CK14, CK17 und EGFR) sowie dem Malignitätsgrad. Eine signifikante, inverse Korrelation fand sich für ER und PR. Die Expression von HIF-1 alpha war zudem positiv korreliert mit der Expression von Her2, Ki-67, CA IX und VHL.

Auch **HIF-2 alpha** zeigt eine Korrelation mit dem Tumorgrad sowie basalen Markern (CK 5/6, EGFR und CK 17). Des Weiteren zeigte sich eine positive Korrelation mit HIF-1 alpha, VHL, CA IX und Her2 bei inverser Korrelation mit ER und PR.

Für **CA IX** konnte ebenfalls eine inverse Korrelation mit ER und PR beobachtet werden. Hingegen war die Expression von CA IX vor allem in Karzinomen mit der Expression basaler Marker (CK 5/6/14/17, EGFR), bei Karzinomen mit hoher Proliferationsfraktion (Ki-67) und/oder Her-2-Überexpression zu beobachten. Eine positive Korrelation fand sich zudem mit VHL, HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300 und FIH.

Eine erhöhte Expression von **VHL** zeigte sich in Karzinomen mit CK 5/14-Expression oder Her2-Überexpression. Eine inverse Korrelation war mit ER zu beobachten. Die Expression von VHL war mit der Expression von CA IX, HIF-1 alpha, HIF-2 alpha und p300 statistisch signifikant assoziiert.

p300 war positiv mit der Expression von CK 5/6, Her2, Ki-67, CA IX, HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, VHL und FIH korreliert.

Die Expression von **FIH** war vor allem in Mammakarzinomen mit der Expression von CK 5/6 zu beobachten. Zudem war die Expression von FIH mit der Tumorpheriferation (Ki-67), CA IX, HIF-1 alpha, HIF-2 alpha und p300 signifikant assoziiert.

4.1 Häufigkeitstabelle

Die nachfolgend abgebildeten Tabellen zeigen die Verteilung der immunhistochemischen Färbestärke (0-3) der einzelnen Faktoren. Die Färbeintensität wurde in folgende Kategorien eingeteilt: 0 keine Färbung, 1 schwache Intensität der Färbung, 2 mäßige Intensität der Färbung und 3 starke Intensität der Färbung.

Die Abweichungen zum Gesamtkollektiv ergeben sich daraus, dass nicht immer das gesamte TMA-Probenmaterial auswertbar war. Das lag insbesondere daran, dass es zum Anschnitt tumorfreier Bereiche gekommen war, gelegentlich nur in situ Karzinombereiche erfasst worden sind und nicht zuletzt auch durch Färbebedingten Materialverlust. Die Anzahl auswertbarer Proben rangiert zwischen 812-749 Proben.

	0	1	2	3
CK 5/6	753/803 (93%)	40/803 (5%)	5/803 (<1%)	3/803 (<1%)
CK 5/14	698/756 (93%)	34/756 (4%)	12/756 (2%)	10/756 (1%)
CK 17	777/812 (96%)	28/803 (3%)	5/803 (<1%)	1/803 (<1%)
Her2	384/768 (50%)	140/768 (18%)	145/768 (19%)	96/768 (12%)
ER	207/781 (27%)	114/781 (15%)	152/781 (19%)	306/781 (39%)
PR	324/799 (40%)	146/799 (18%)	142/799 (18%)	185/799 (24%)
EGFR	762/803 (95%)	20/803 (3%)	10/803 (1%)	9/803 (1%)
Ki-67	371/782 (47%)	275/782 (35%)	110/782 (15%)	24/782 (3%)

Tabelle 5: Die Häufigkeit der Expression der Marker zur Bestimmung des intrinsischen Subtyps.

	0	1	2	3
FIH	434/751 (59%)	233/751 (31%)	72/751 (9%)	10/751 (1%)
p300	307/755 (40%)	267/755 (36%)	151/755 (20%)	27/755 (4%)
VHL	116/787 (15%)	293/787 (37%)	276/787 (35%)	100/787 (13%)
CA IX	224/787 (29%)	401/787 (52%)	103/787 (15%)	31/787 (4%)
	negativ		positiv (≥ 5%)	
HIF-1α	534/743 (72%)		209/743 (28%)	
HIF-2α	701/770 (91%)		69/770 (9%)	

Tabelle 6: Die Häufigkeit der Expression von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300, VHL, FIH und CA IX.

4.2 Klinisch-morphologische Korrelation

Marker	Tumorgrosse	N-Status	Grading
HIF-1α	n.s	n.s	p<0,001
HIF-2α	n.s.	n.s.	p<0,01
FIH	n.s.	n.s	p<0,05
VHL	p<0,05	n.s	p<0,05
CA IX	n.s	n.s	p<0,0001
p300	n.s	n.s	p<0,0001

Tabelle 7: Korrelation der Marker mit klinisch-pathologischen Parametern wie der Tumorgröße, dem Nodalstatus und dem Malignitätsgrad.

4.3 Korrelationstabelle

Die folgende Tabelle 8 zeigt die Beziehung zwischen den diversen molekularen Parametern untereinander. In der Tabelle sind die Daten teilweise in farbigen Feldern dargestellt. Hierbei zeigt ein rotes Feld eine positive und ein gelbes Feld eine inverse Korrelation optisch an.

Im oberen Teil der Korrelationstabelle wird das jeweilige statistische Signifikanzniveau anhand des p-Wertes und im unteren Teil der Tabelle der entsprechende Korrelationskoeffizient aufgeführt.

	CK 5/6	CK 17	ER	CK 5/14	EGFR	PR	Ki-67	Her2	CA IX	VHL	HIF-1 α	HIF-2 α	p300	FIH
CK 5/6		p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	0,02	0,73	p<0,0001	0,13	p<0,0001	0,01	0,01	0,02
CK 17	0,66		p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	0,03	0,05	0,53	p<0,0001	0,3	p<0,0001	0,02	0,2	0,21
ER	-0,21	-0,18		p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	0,03	0,02	0,17	0,01
CK 5/14	0,47	0,44	-0,32		p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	0,26	p<0,0001	0,02	0,01	0,84	0,58	0,06
EGFR	0,22	0,24	-0,26	0,32		p<0,0001	0,7	0,85	0,01	0,08	p<0,0001	p<0,0001	0,88	0,6
PR	-0,15	-0,11	0,44	-0,21	-0,2		p<0,0001	p<0,0001	p<0,01	0,13	0,04	0,01	0,17	0,38
Ki-67	0,11	0,09	-0,03	0,16	0,03	-0,1		0,01	p<0,0001	0,4	p<0,0001	0,34	p<0,0001	p<0,0001
Her2	-0,03	-0,03	-0,06	-0,07	-0,03	-0,12			p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	0,02	p<0,0001	0,1
CA IX	0,18	0,17	-0,1	0,19	0,08	0,02	0,12	0,07		p<0,0001	p<0,0001	0,01	p<0,0001	p<0,0001
VHL	0,07	0,07	-0,13	0	0,1	-0,04	0,03	0,22	0,2		p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	0,12
HIF-1 α	0,18	0,18	-0,08	0,1	0,12	-0,07	0,23	0,11	0,19	0,24		p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001
HIF-2 α	0,09	0,08	-0,08	0,01	0,2	-0,09	0,03	0,08	0,09	0,13	0,19		p<0,0001	0,01
p300	0,1	0,08	0,01	0,07	0,02	-0,09	0,3	0,17	0,22	0,21	0,32	0,05		p<0,0001
FIH	0,05	0,05	0,02	0,07	0,01	-0,03	0,26	0,12	0,12	0,13	0,18	0,06	0,57	

Tabelle 8: Korrelationen zwischen den jeweiligen molekularen Parametern.
gelb=inverse Korrelation / **rot**=positive Korrelation

4.4 Überlebenskurven

4.4.1 CA IX, HIF-1 alpha, HIF-2 alpha

CA IX

In Abbildung 10 werden die jeweiligen Überlebenskurven für CA IX dargestellt. Die Expression von CA IX wies keine Signifikanz bezüglich des Gesamtüberlebens in der Gesamtkohorte auf. Ein gleichartiges Ergebnis ergab sich auch für die postmenopausalen Karzinome. Dies stand im Gegensatz zu der Gruppe der prämenopausalen Karzinome. In den ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung zeigte sich kein Unterschied bei den Patienten mit und ohne CA IX-Expression. Ab einer Nachbeobachtungszeit von circa 7 bis 8 Jahren zeigten prämenopausale Patientinnen mit einer CA IX-Expression eine etwa 10%ige bessere Prognose, allerdings fand sich keine statistische Signifikanz.

HIF-1 alpha

In Abbildung 11 werden die jeweiligen Überlebenskurven für HIF-1 alpha dargestellt. Ein gleichartiges Phänomen wie bei CA IX fand sich auch bezüglich der Expression von HIF-1 alpha. In den ersten 5 Jahren nach Erstdiagnose fand sich kein Unterschied bezüglich der Prognose. Hingegen zeigte sich nach 8 bis 10 Jahren ein Unterschied von bis zu einer 20%igen besseren Prognose bei Patientinnen ohne HIF-1 alpha-Expression.

HIF-2 alpha

In Abbildung 12 werden die jeweiligen Überlebenskurven für HIF-2 alpha dargestellt. Ab einer Nachbeobachtungszeit von circa 10 Jahren zeigten prämenopausale Patientinnen mit einer HIF-2 alpha Expression eine etwa 10%ige bessere Prognose, ohne dabei eine statistische Signifikanz aufzuweisen.

CA IX

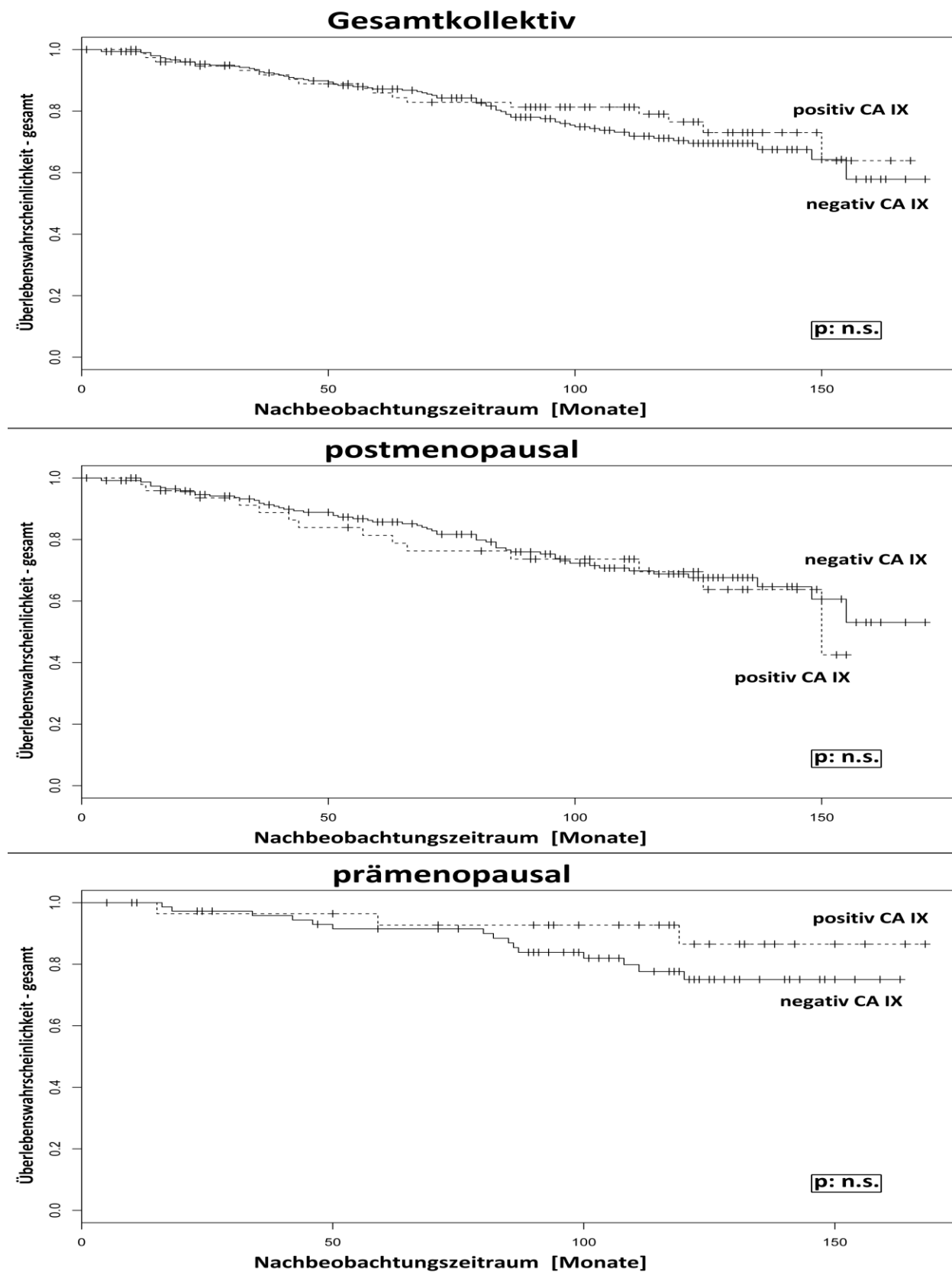


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für CA IX.

HIF-1 alpha

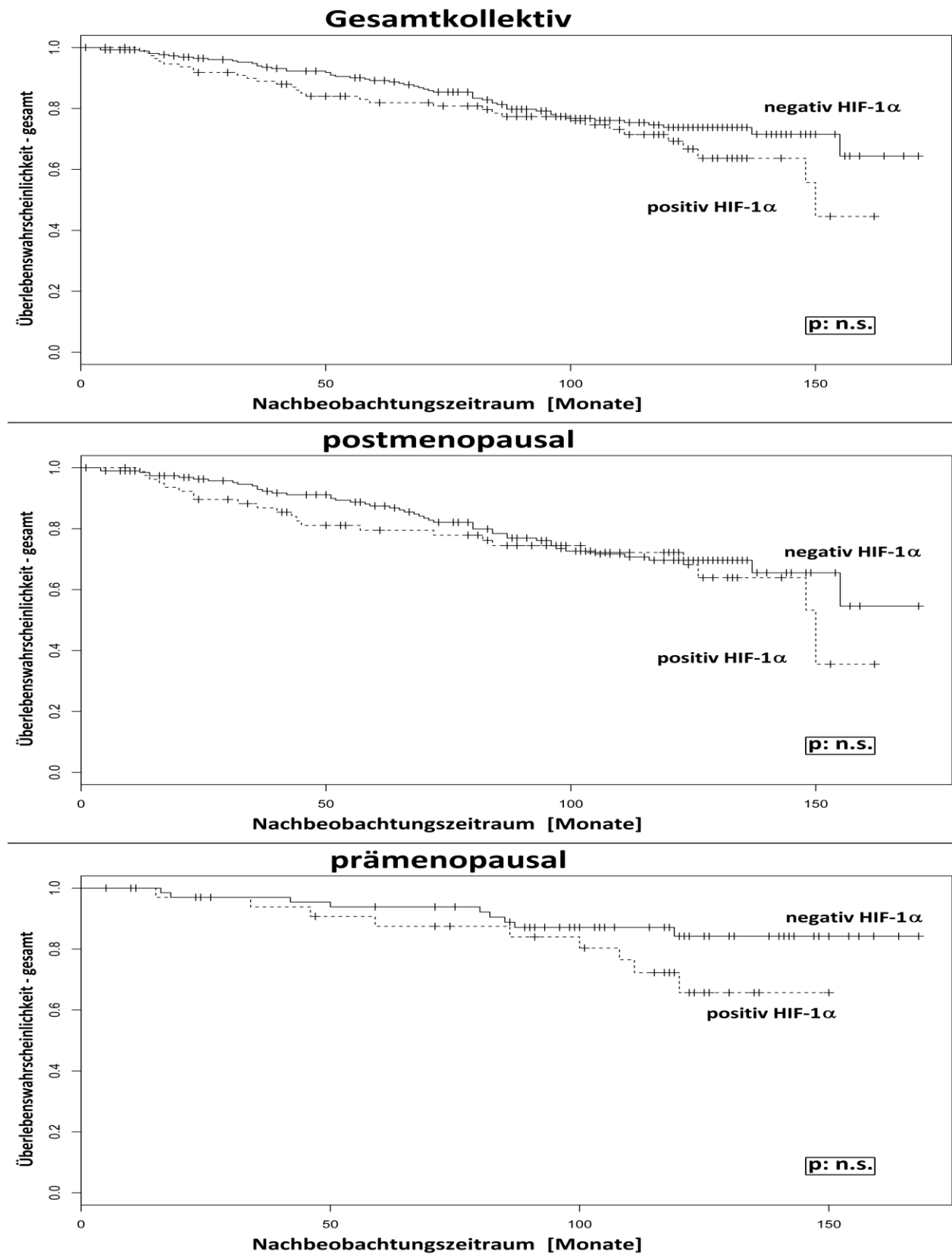


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für HIF-1 alpha.

HIF-2 alpha

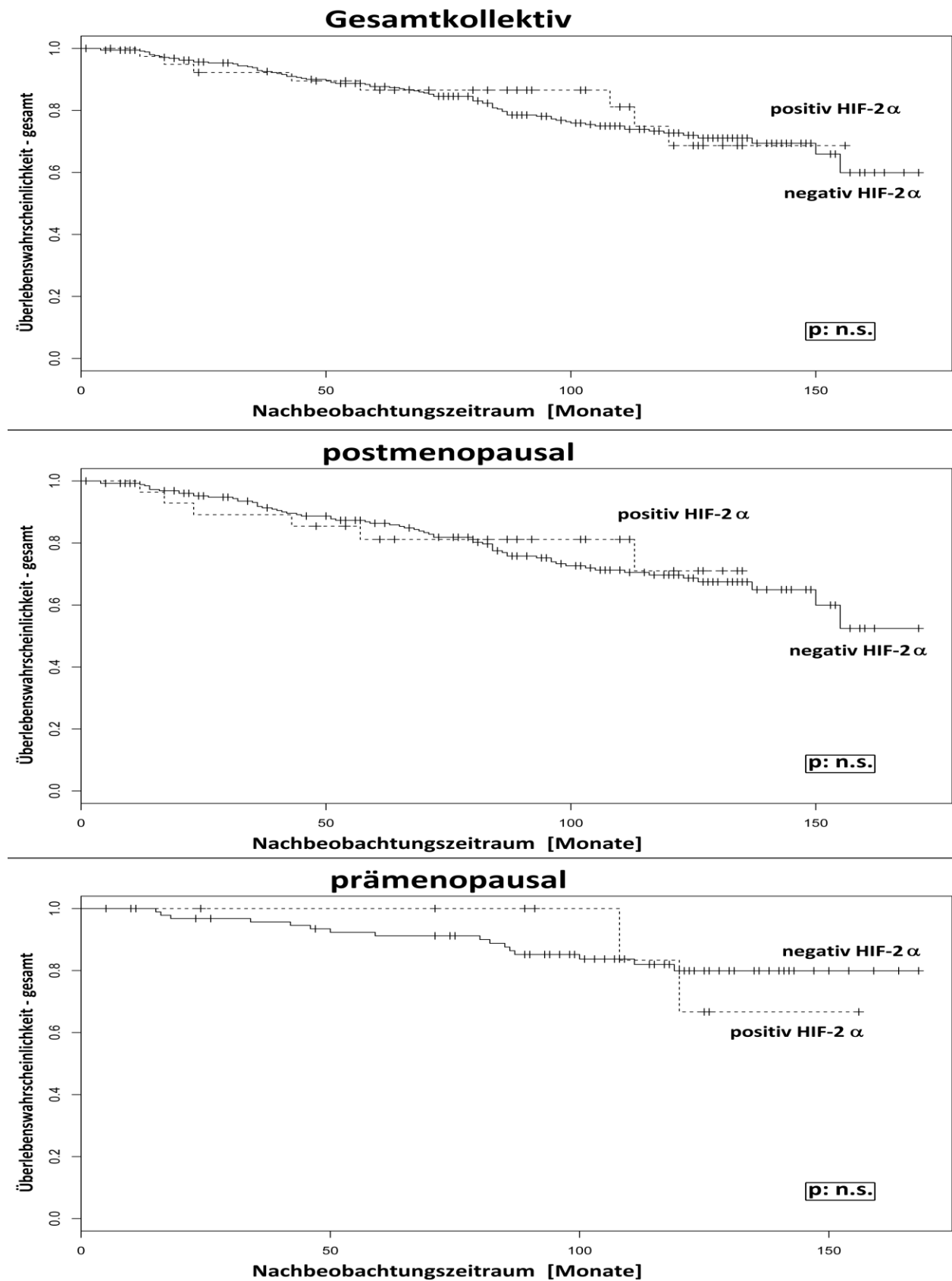


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für HIF-2 alpha.

4.4.2 p300, VHL, FIH

p300

In Abbildung 13 werden die jeweiligen Überlebenskurven für p300 dargestellt. Die Expression von p300 hatte, wie auch oben für HIF-2 alpha beschrieben, keinerlei prognostische Relevanz. Es ergab sich zwar eine geringe Diskriminierung in den ersten 5-6 Jahren nach Erstdiagnose. Diese verlor sich aber in den weiteren Jahren des Follow-up. Ein Unterschied in Korrelation zum Menopausenstatus fand sich nicht.

VHL

In Abbildung 14 werden die jeweiligen Überlebenskurven für VHL dargestellt. Hier wird deutlich, daß das Expressionsverhalten für VHL nicht mit der Prognose der Patientinnen assoziiert war. Weitestgehend überlappende bzw. sich überschneidende Kaplan-Meier-Kurven konnten in den verschiedenen Auswertungen beobachtet werden.

FIH

In Abbildung 15 werden die jeweiligen Überlebenskurven für FIH dargestellt. Hierbei war die Expression von FIH statistisch signifikant mit der Prognose von Mammakarzinompatientinnen assoziiert. Patientinnen mit einer FIH-Expression wiesen eine schlechtere Langzeitprognose auf. Dieses Ergebnis zeigte sich vor allem bei den postmenopausalen Mammakarzinompatientinnen. Bei prämenopausalen Patientinnen zeigte die FIH-Expression keinerlei prognostische Relevanz.

p300

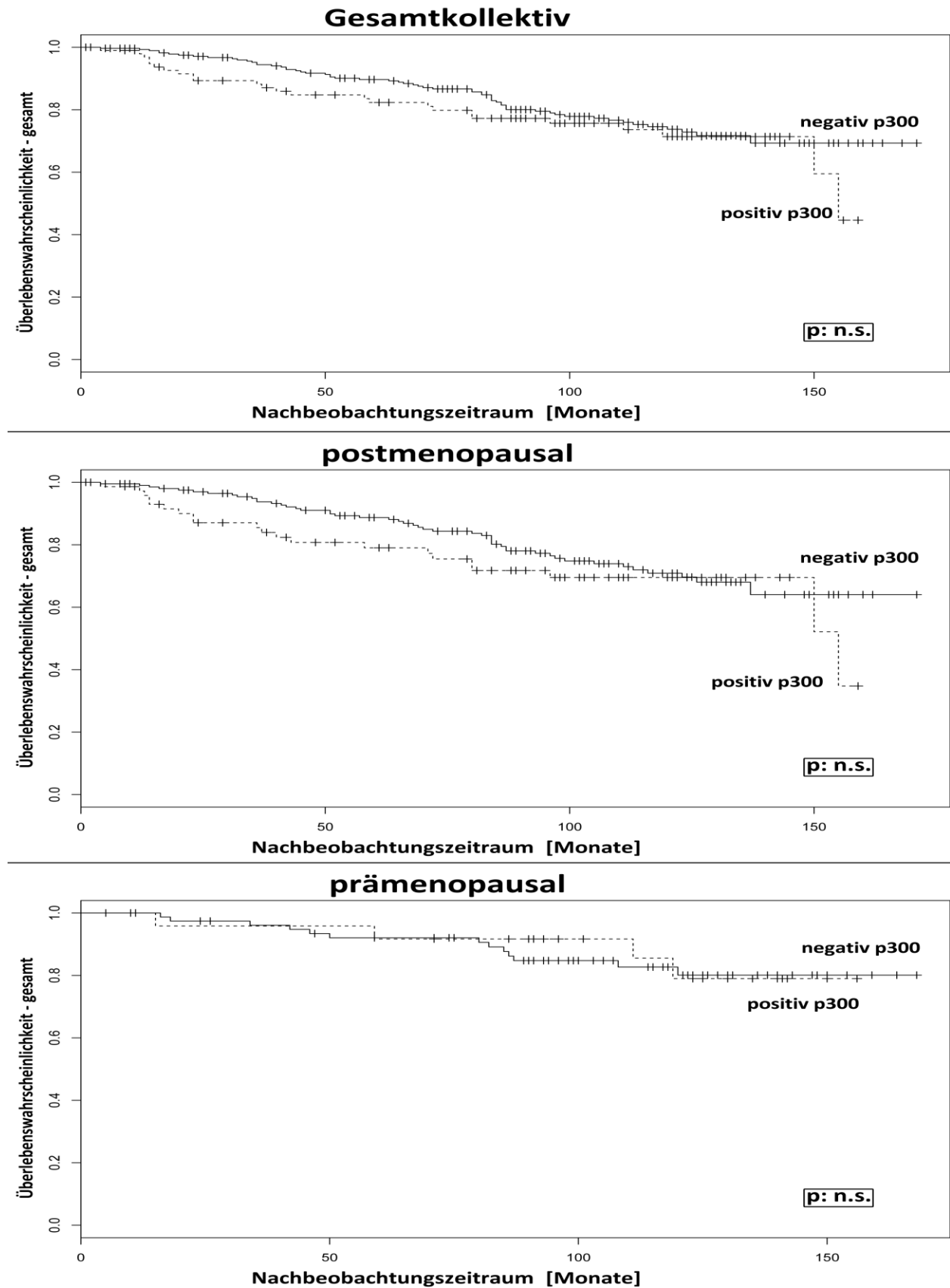


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für p300.

VHL

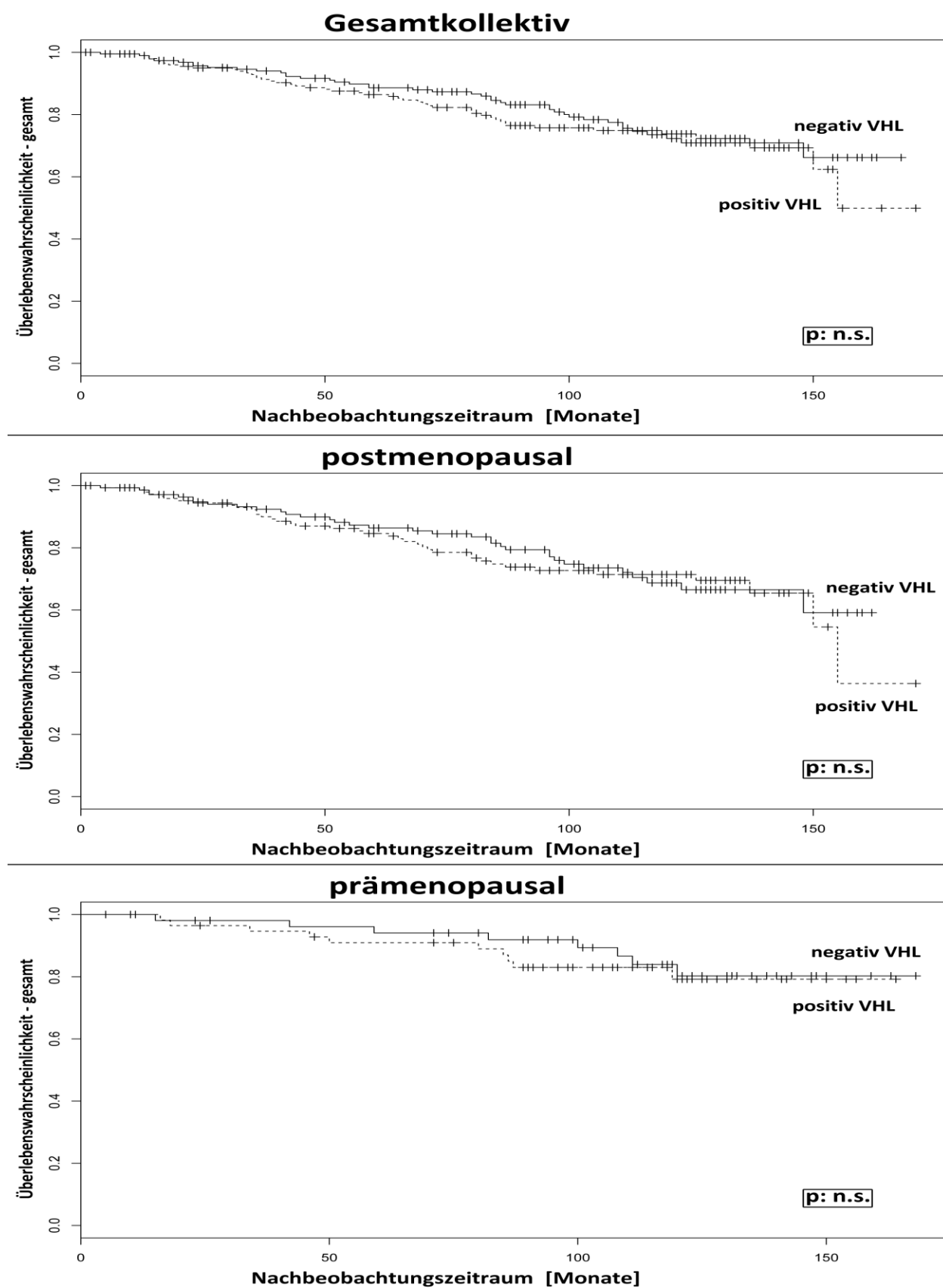


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für VHL.

FIH

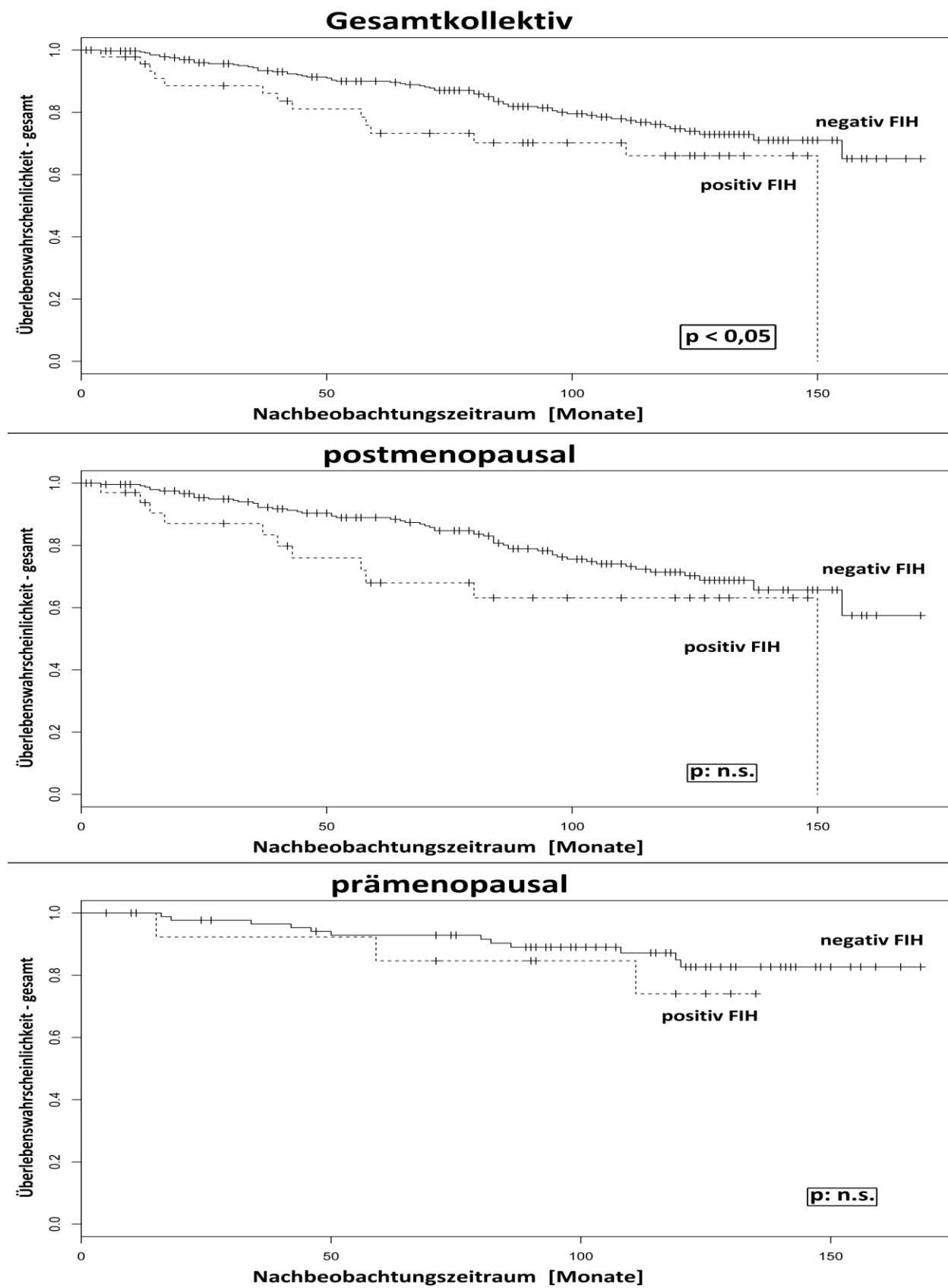


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurven für FIH.

4.5 Korrelationskurven

Die Regressionsgeraden zeigen die Übereinstimmung der Proteinexpression der untersuchten Marker in den verschiedenen molekularen Subtypen des invasiven Mammakarzinoms. Unterschiedliche Regressionsgeraden, speziell eine unterschiedliche Neigung der Regressionsgeraden würden auf unterschiedliche Expressionsmuster in den verschiedenen Subtypen hindeuten.

Insgesamt wurden 4 unterschiedliche Analyseansätze durchgeführt.

In der Abbildung 16 sind die luminal A, die luminal B, die Her2, die basale und die 'non-expressor' Gruppe jeweils dargestellt. Diese wurden in Bezug auf ihre Expression von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300, FIH, VHL und CA IX untersucht. Der generelle Kurvenverlauf (Neigung der Kurven) zwischen den verschiedenen Subgruppen ist im Prinzip identisch. Allerdings unterscheidet sich die luminal A Subgruppe von den anderen durch ausschliesslich negative Korrelationskoeffizienten im Gegensatz zu positiven Korrelationskoeffizienten in den luminal B, Her2 und basalen Subtypen. Dies spiegelt letztendlich die Korrelation mit dem Tumormaligntätsgrad wieder.

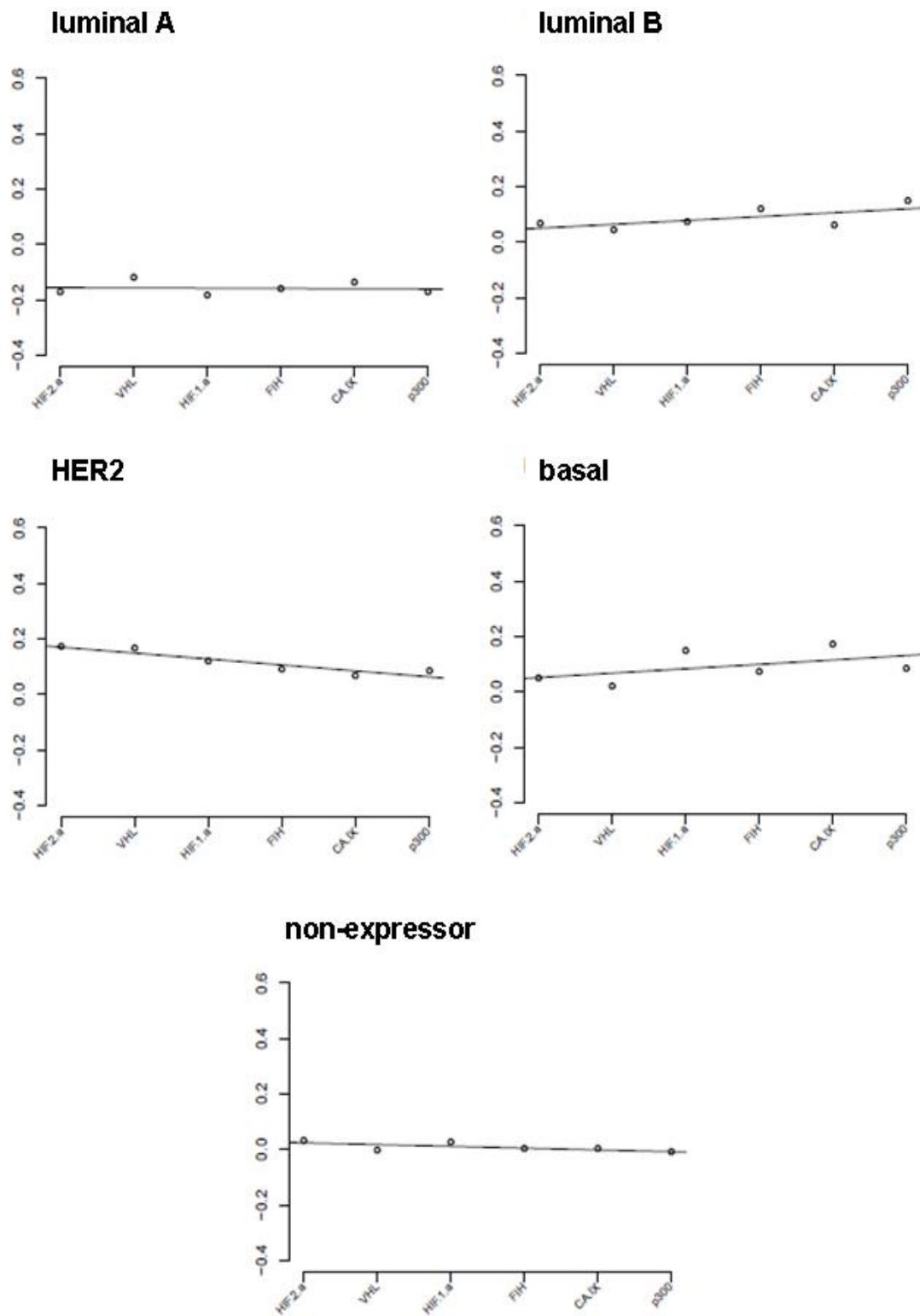


Abbildung 16: Permutationsanalyse der molekularen Subgruppen in Bezug auf die Expression von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300, FIH, VHL und CA IX.

Innerhalb der luminal B Subgruppe (ER positiv und Ki-67 erhöht, bzw. ER positive und Her2 positiv) wurden ebenfalls keine Unterschiede festgestellt.

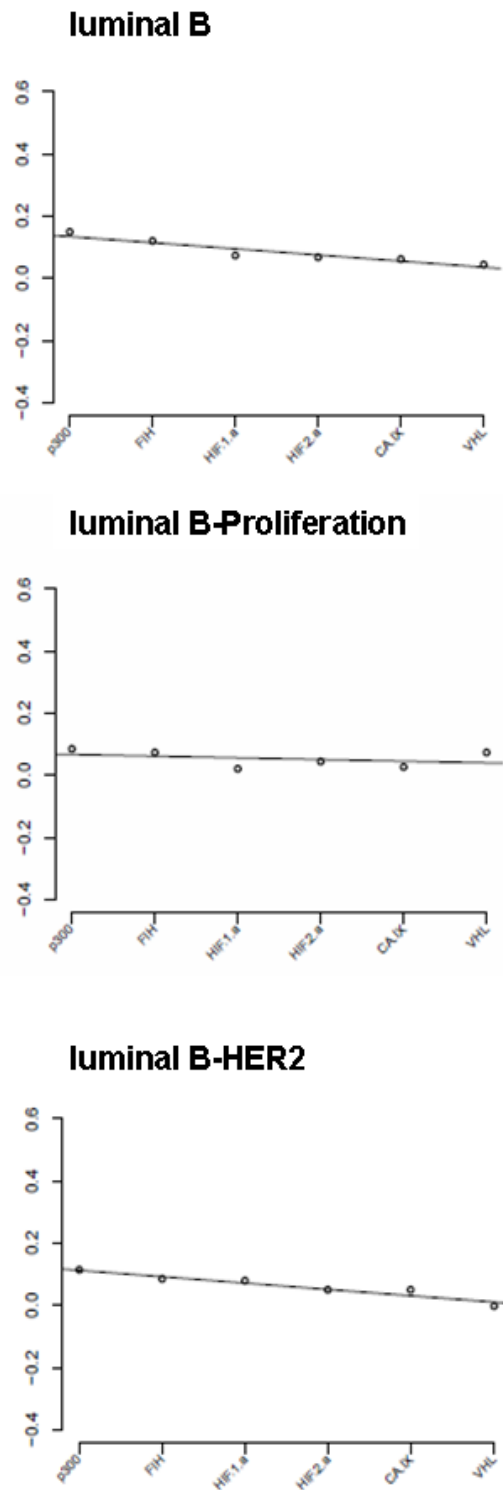


Abbildung 17: Permutationsanalyse der luminal B Subgruppen in Bezug auf die Expression von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300, FIH, VHL und CA IX.

Die Regressionsgeraden für die untersuchten Faktoren in Korrelation zum Tumorgrad zeigten geringe Unterschiede. G3-Karzinome wiesen vermehrt positive Korrelationskoeffizienten auf.

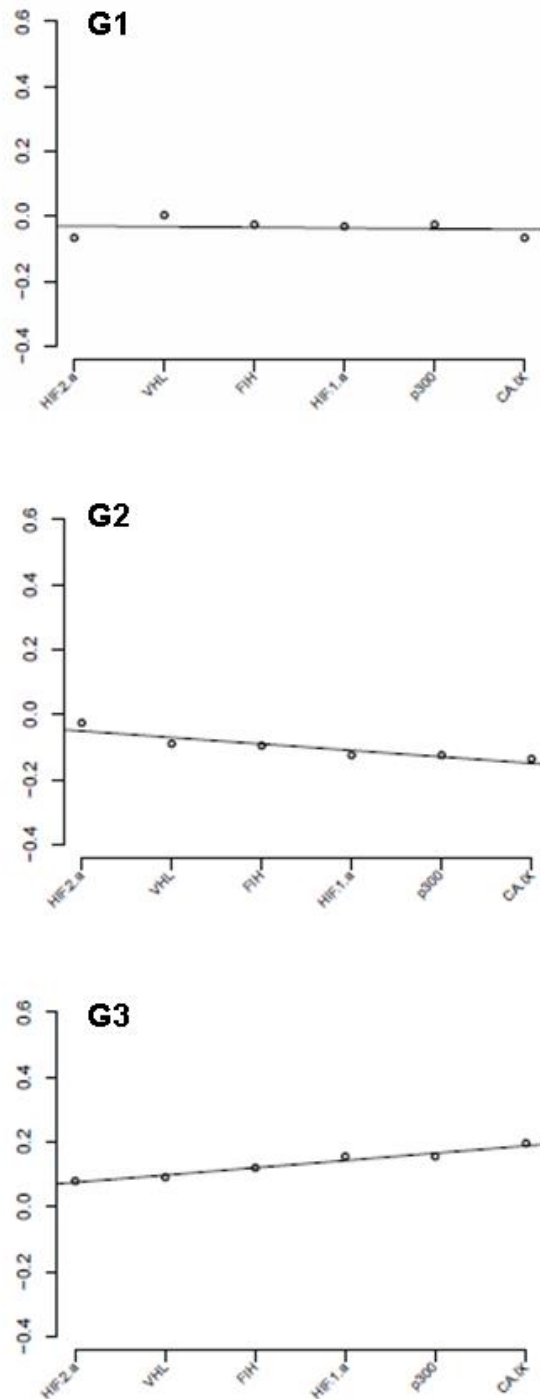


Abbildung 18: Permutationsanalyse von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300, FIH, VHL und CA IX im Bezug zum Tumorgrad.

Dieser Effekt (siehe Korrelation zum Tumorgrad Abbildung 18) konnte auch in der Analyse der ER-positiven Karzinome in Abhängigkeit vom Tumorgrad gesehen werden.

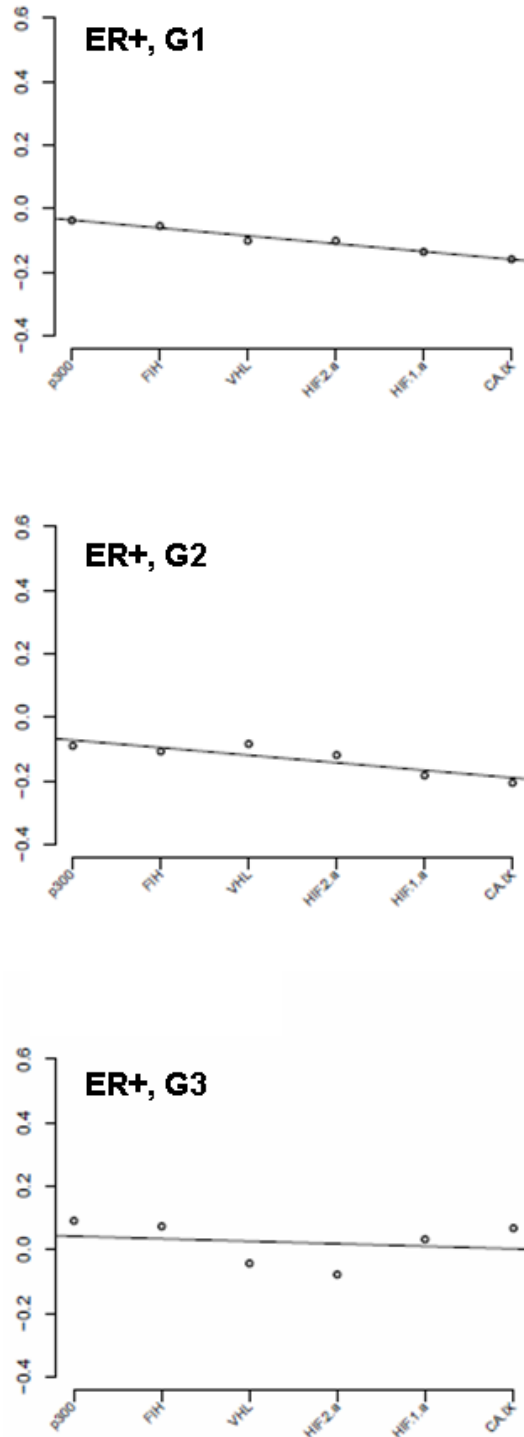
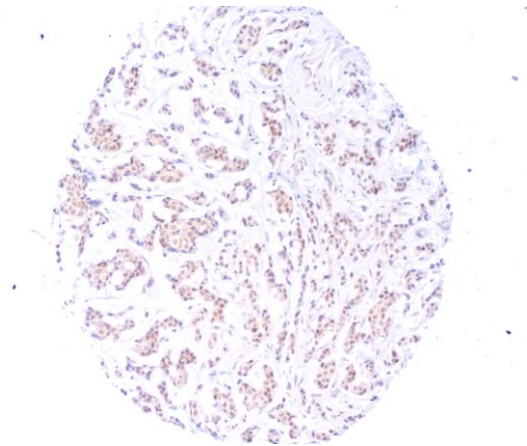
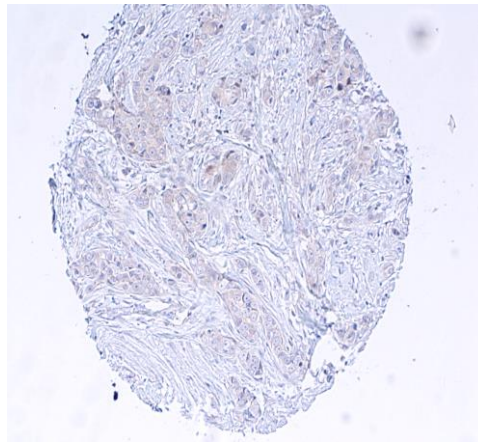


Abbildung 19: Permutationsanalyse von HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, p300, FIH, VHL und CA IX im Bezug zum Tumorgrad im Östrogenrezeptor positiven Mammakarzinom.

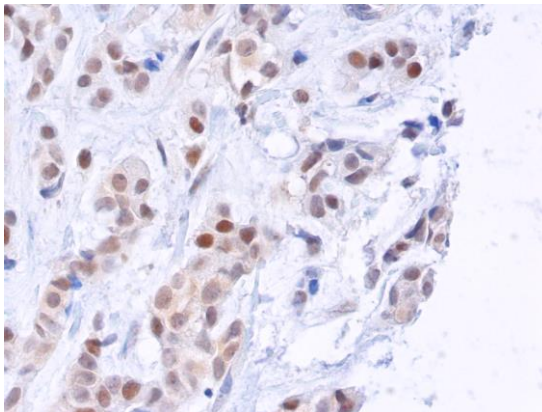
4.6 Mikroskopische Bilder der Immunfärbungen



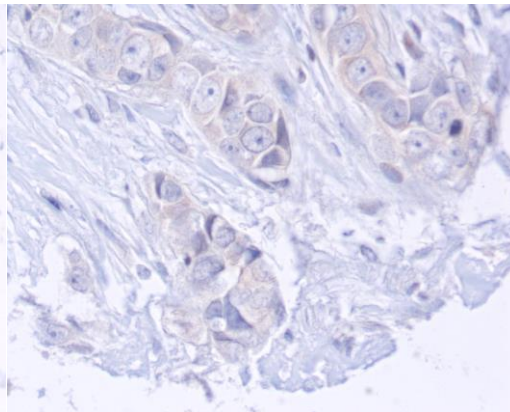
FIH 100 x positiv



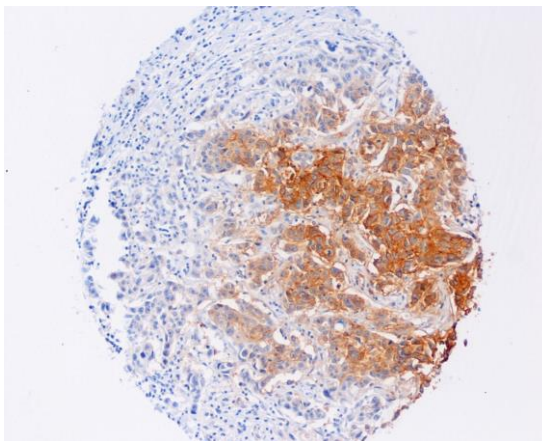
FIH 100 x negativ



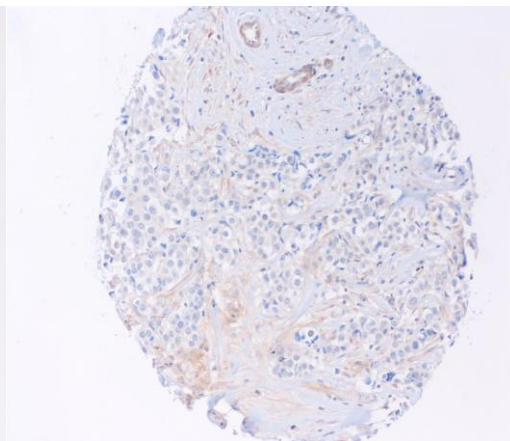
FIH 400 x positiv



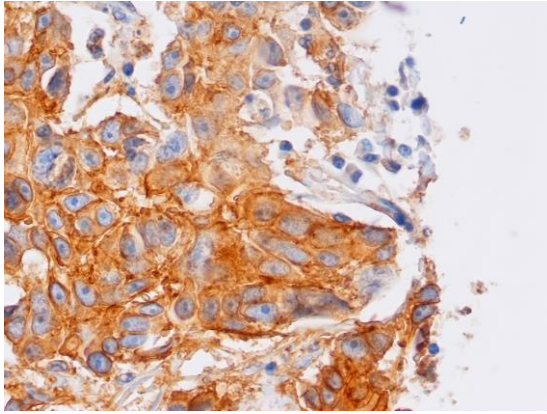
FIH 400 x negativ



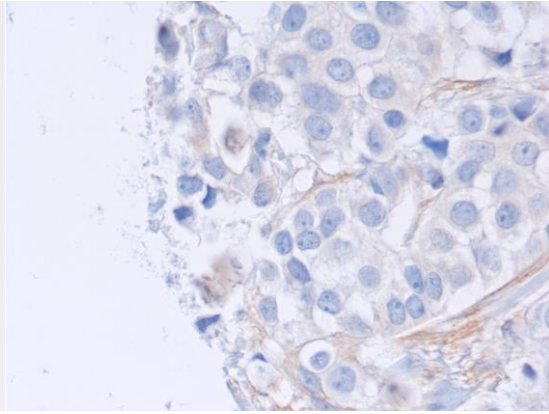
CA IX 100 x positiv



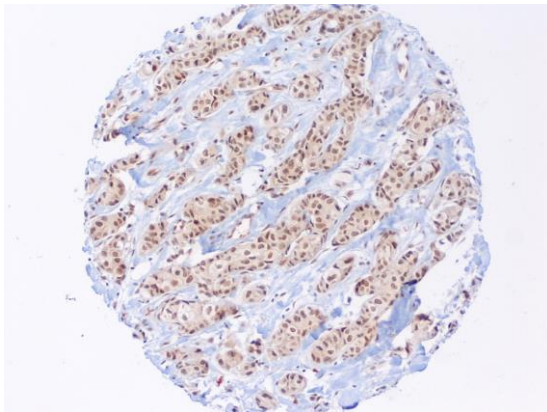
CA IX 100 x negativ



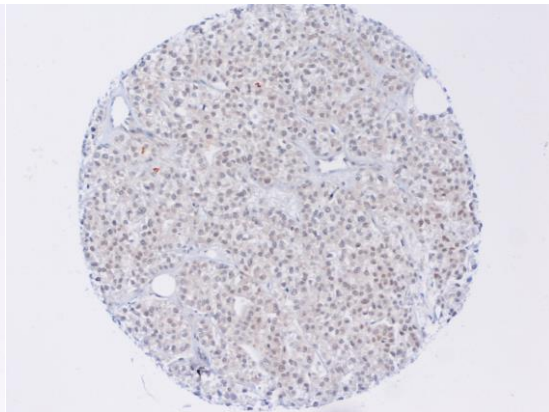
CA IX 400x positiv



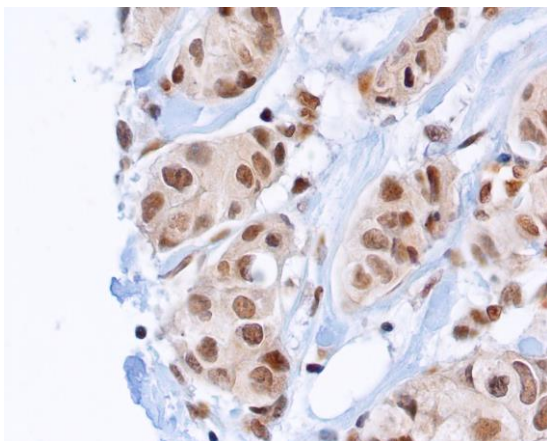
CA IX 400x negativ



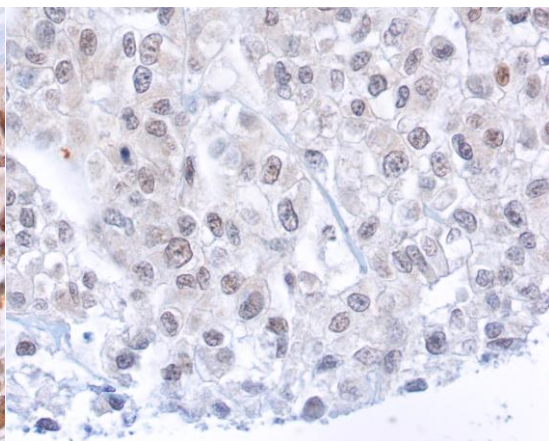
HIF-1 alpha 100x positiv



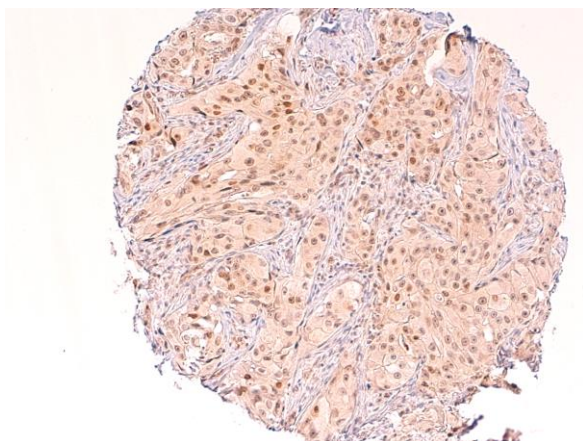
HIF-1 alpha 100x negativ



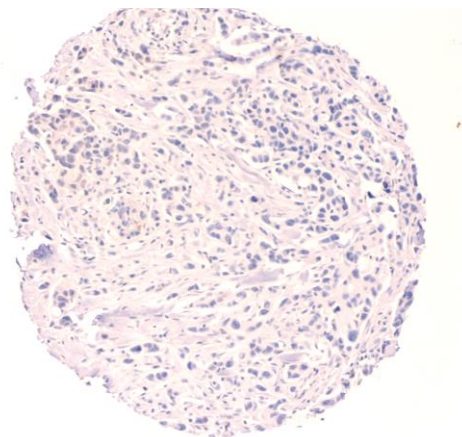
HIF-1 alpha 400x positiv



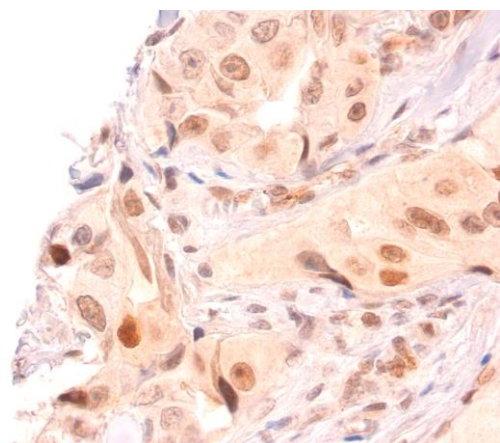
HIF-1 alpha 400x negativ



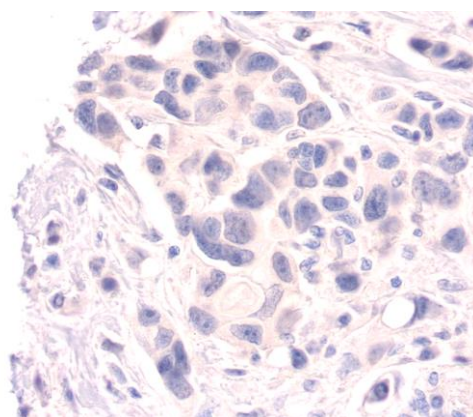
HIF-2 alpha 100x positiv



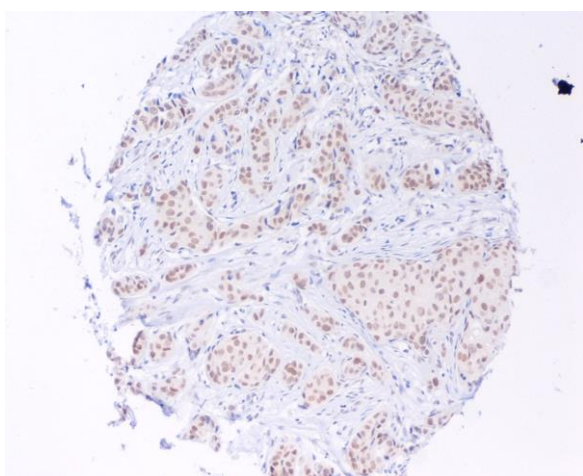
HIF-2 alpha 100x negativ



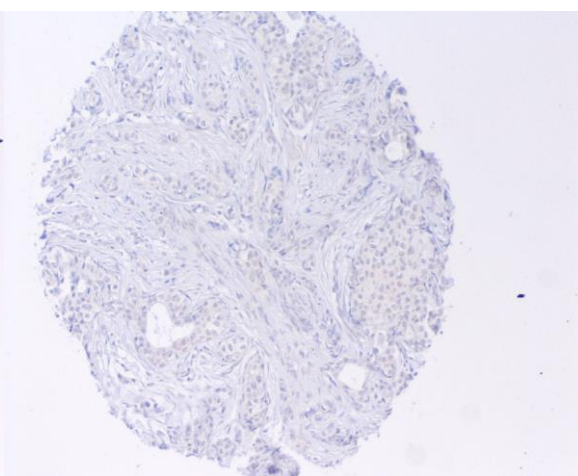
HIF-2 alpha 400x positiv



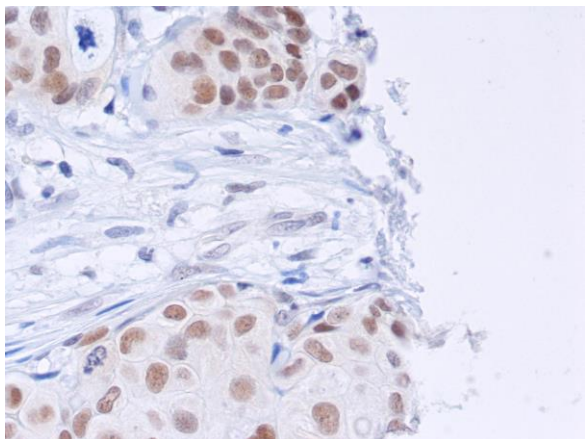
HIF-2 alpha 400x negativ



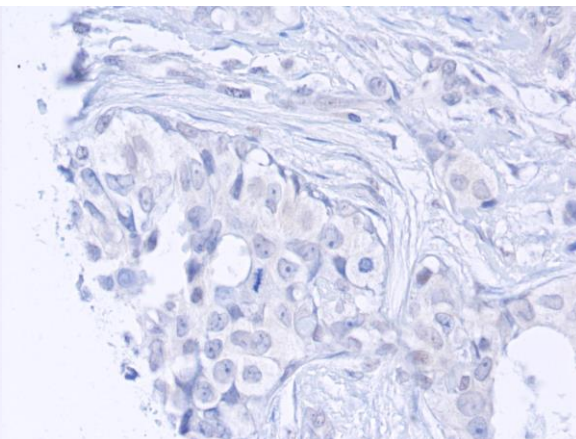
p300 100x positiv



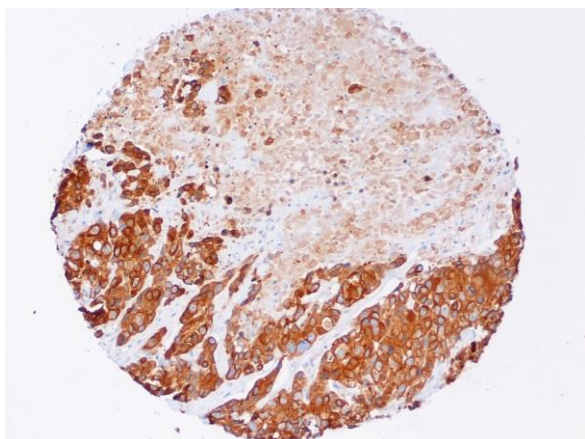
p300 400x negativ



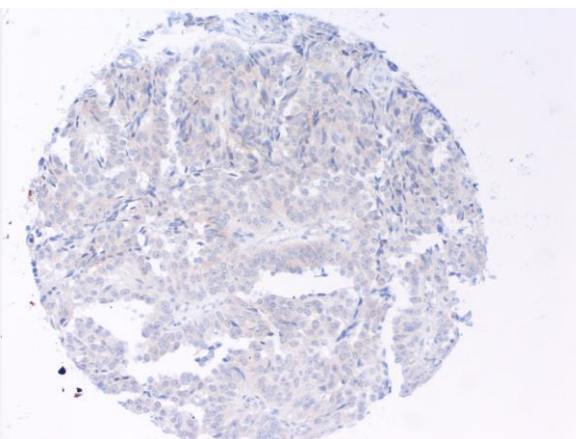
p300 400x positiv



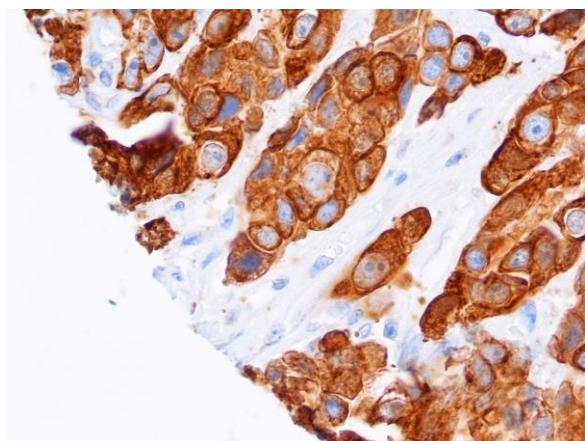
p300 400x negativ



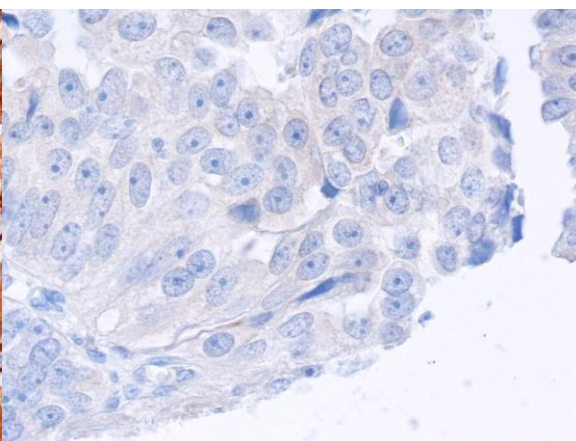
VHL 100x positiv



VHL 100x negativ



VHL 400x positiv



VHL 400x negativ

5. Diskussion

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau in Deutschland und nach den epidemiologischen Daten des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahre 2008 mit 17 209 Todesfällen pro Jahr die häufigste Krebs-Todesursache bei Frauen in Deutschland [2]. Um die Mortalität signifikant zu senken, kommt zunächst der Aufdeckung und Therapie von Vorstufen bzw. präkanzerösen Läsionen (insbesondere atypische duktale Hyperplasie, duktales Carcinoma in situ, lobuläre Neoplasie) z.B. im Rahmen eines Mammographie-Screenings große Bedeutung zu. Das gilt gleichzeitig auch für die Detektion von prognostisch günstigen Stadien des Mammakarzinoms (Tumoren mit einem Durchmesser von bis zu 15 mm und tumorfreiem Nodalstatus).

Hauptziel einer effektiven Therapie von Mammakarzinom-Patientinnen ist die Erstellung eines individuellen Therapiekonzeptes mit der größten Heilungschance für die *einzelne* Patientin und gleichzeitiger Ausschaltung einer Übertherapie. Dazu ist es erforderlich, den potentiellen Krankheitsverlauf möglichst korrekt vorausszusagen, um so ein individuelles Risikoprofil erstellen zu können. Darüber hinaus ist es notwendig, das Ansprechen auf eine geplante Therapie möglichst genau abschätzen zu können. Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, werden zum Zeitpunkt der Primärtherapie spezielle klinische und/oder morphologische Charakteristika der Tumorerkrankung bestimmt, die als sog. prognostische und prädiktive Faktoren bezeichnet werden [153].

Dabei geben prognostische Faktoren Auskunft über den zu erwartenden individuellen Krankheitsverlauf und ermöglichen somit die Abschätzung des Rezidiv- und Sterberisikos einer Patientin. Prädiktive Faktoren kennzeichnen dagegen Merkmale, die dabei helfen, die Wahrscheinlichkeit des Erfolges einer speziellen Therapie vorausszusagen und die damit zu einer selektiven Therapiewahl beitragen [46, 153]. In diesem Zusammenhang definierte Faktoren können ausschließlich eine prognostische Relevanz zeigen (z.B. Tumorstadium nach TNM-Klassifikation), können aber auch als prognostischer- *und* prädiktiver Faktor Bedeutung haben. Letztere Gruppe beinhaltet insbesondere die heute bereits etablierten Biomarker wie den Östrogen- und Progesteronrezeptoren- und Her2/neu Status eines Tumors. Bezüglich der schon laufenden klinischen Anwendung und erfolgten Validierung kann man *etablierte* und *potentielle* prognostische und/oder prädiktive Faktoren unterscheiden. Etablierte

prognostische und/oder prädiktive Faktoren sind die Tumorgroße, der axilläre Lymphknotenstatus, der histologische Tumortyp, der Malignitätsgrad des Tumors, das Alter der Patientin bzw. der Menopausenstatus, eine lymphovaskuläre Invasion, der Hormonrezeptoren- und Her2/neu-Status und seit kurzem (unter bestimmten Bedingungen) auch der Status der tumorassoziierten Proteolysefaktoren uPA / PAI-1 [154]. Durch die Bestimmung klinisch validierter prädiktiver Faktoren konnte dann durch die Einführung von zielgerichteten (Chemo)therapeutika die Prognose von bestimmten Subgruppen des Mammakarzinoms signifikant verbessert werden [46]. In diesem Zusammenhang können speziell die Blockierung des Östrogenrezeptors bei Östrogenrezeptor-positiven Karzinomen (z.B. durch Tamoxifen[®]) als auch die Einführung von Herceptin[®] in die Behandlung des Her2-positiven Karzinoms genannt werden [74, 75]. Da die Expression des Östrogenrezeptors als auch die Überexpression des Her2/neu-Rezeptors jedoch nur in speziellen Subgruppen des Mammakarzinoms beobachtet wird, ist schon an diesem Beispiel ersichtlich, dass es sich beim Mammakarzinom um eine biologisch heterogene Erkrankung handelt.

Um dem Ziel einer individuellen Therapie des Mammakarzinoms näher zu kommen, ist die Suche nach weiteren Faktoren mit potentieller prognostischer und vor allem prädiktiver Relevanz Gegenstand intensiver Forschungen und im Speziellen auch Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit. Grundsätzlich müssen aber prognostische und prädiktive Faktoren bestimmte Qualitätskriterien erfüllen, um definitiv als klinische Entscheidungshilfen herangezogen werden zu können [155]. Als Beispiele für potentielle, aber noch nicht klinisch etablierte Faktoren können Biomarker wie der Proliferationsmarker Ki 67 [156], Angiogenesefaktoren und verschiedene Onkogene und Suppressorgene (z.B. p53) genannt werden. Darüber hinaus sind bereits molekulare prognostische und prädiktive Tests (z.B. OncotypeDX) auf der Basis von Genexpressionsanalysen kommerziell erhältlich und werden bei bestimmten Konstellationen z.T. zur Therapieentscheidung herangezogen. Bislang liegen allerdings noch keine Daten aus prospektiven Studien vor [85, 154, 157].

Im Rahmen der Suche nach neuen prognostischen und prädiktiven Faktoren und des besseren Verständnisses der Biologie des Mammakarzinoms ist eine molekulare Tumorklassifikation mit der Etablierung sog. intrinsischer molekularer Mammakarzinom-Subtypen aufgestellt worden, die auch in der vorliegenden Studie modifiziert

immunphänotypisch zur Anwendung kam [82]. Diese Klassifikation trägt der biologischen Heterogenität des Mammakarzinoms potentiell eher Rechnung, als die schon historische, auf einer lichtmikroskopisch-phänotypischen Analyse basierende WHO-Klassifikation der Mammakarzinome [37]. Letztere hat allerdings den Vorteil der internationalen Akzeptanz, der Herausstellung bestimmter prognostisch günstiger Karzinomtypen (z.B. tubuläre Mammakarzinome) und der Durchführbarkeit mit relativ einfachen, leicht reproduzierbaren und kostengünstigen Mitteln (Lichtmikroskop, HE-Färbung, ggf. Immunhistochemie). Als Nachteil dieser histologischen Tumorklassifikation (nach WHO) sind die teilweise subjektive Charakterisierung der verschiedenen Karzinomtypen, der große „Sammeltopf“ der invasiven duktaalen Karzinome (no special type) und die teilweise fehlende therapeutische Relevanz der Subtypisierung zu nennen.

Die oben genannte molekulare Klassifikation des Mammakarzinoms basiert auf Genexpressionsanalysen an Microarrays unter Verwendung einer sog. hierarchischen Clusteranalyse und spiegelt die Heterogenität des Mammakarzinoms auf molekularer Ebene wieder [80]. Grundsätzlich werden dabei zwei Hauptsubtypen unterschieden: Zum Einen handelt es sich um Östrogenrezeptor-negative Tumoren, die als basal-ähnliche und Her2 überexprimierte („enriched“) Tumoren subtypisiert werden. Die basal-ähnlichen Karzinome (ca. 15%) exprimieren myoepitheliale/basale Gene wie Keratin 5, 14 und 17, zeigen jedoch keine Östrogenrezeptorenexpression und keine Überexpression von Her2. Bei den Her2 überexprimierten Tumoren kann eine Überexpression des Her2-Gens bei fehlender Expression des Östrogenrezeptors beobachtet werden. Zum Anderen liegen Östrogenrezeptor-positive Karzinome vor, die in Luminal A und Luminal B Tumoren unterteilt werden. Die luminalen Tumoren exprimieren den Östrogenrezeptor und sog. luminalen Zytokeratine wie Keratin 8 und 18. Luminal A Tumoren stellen zahlenmäßig den größten Subtyp dar (ca. 40%) und weisen neben einer starken Expression des Östrogenrezeptors eine weitgehend fehlende Expression des Her2-Gens bei gleichzeitig niedriger Expression von Proliferationsgenen auf. Die weniger häufigen Luminal B Tumoren (ca. 20%) sind neben einer Expression des Östrogenrezeptors durch eine variable Expression des Her2 Gens und einer höheren Expression von Proliferationsgenen charakterisiert. Für diese molekulare Klassifikation ist eine prognostische Relevanz in der Literatur beschrieben worden [41]. Des Weiteren ist für diese molekularen Subtypen auch ein prognostisches

Modell (risk of relapse score ROR-S) erstellt worden [81]. Im Allgemeinen zeigen Patientinnen mit Luminal A Karzinomen die beste Prognose, Frauen mit Luminal B-Tumoren dagegen ein signifikant schlechteres outcome. Die Her2-überexprimierten und die basal-ähnlichen Karzinome sind mit der ungünstigsten Prognose assoziiert [60, 158]. Ungeachtet dieser prognostischen Daten sollte nach der Mehrheitsentscheidung der Panel-Mitglieder auf der St. Gallen-Konferenz 2011 die Entscheidung über die Therapie beim Mammakarzinom nicht anhand einer molekularen Genexpressionsanalyse und des darüber definierten Tumortyps getroffen werden [154]. Die Experten wiesen auf diesem Treffen darauf hin, dass ein intrinsischer molekularer Tumortyp derzeit kein standardisierter prädiktiver Faktor ist. In diesem Zusammenhang muss allerdings betont werden, dass die intrinsischen molekularen Mammakarzinom-Subtypen ursprünglich zur Identifizierung relevanter biologischer Gruppen definiert worden sind, und nicht als prognostische oder prädiktive Faktoren. Auch wenn somit der klinische Gebrauch dieser neuen, auf sog. intrinsischen Subtypen beruhenden molekularen Klassifikation limitiert ist bzw. derzeit keine klinische Anwendung findet, so eignet sich diese Typisierung dennoch für allgemeine tumorbiologische Fragestellungen bzw. als praktisches Denkmodell. Diese molekulare Klassifikation diene in der vorliegenden Studie deshalb als Grundlage zur Korrelation der Ergebnisse, da sie für experimentelle Untersuchungen die biologische Heterogenität des Mammakarzinom besser widerspiegelt als die histologisch-phänotypische WHO-Tumorklassifikation.

Die molekulare Tumorklassifikation mit definierten intrinsischen Subtypen erfordert allerdings spezielle molekulargenetische Techniken, die relativ teuer und kompliziert in der Anwendung sind. Für den praktischen Gebrauch sind daher auf der St. Gallen Konferenz 2011 die intrinsischen Subtypen mittels immunhistochemischer Surrogat (Ersatz)-marker definiert worden [83, 154]. Hierbei kamen die Marker Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, Her2/neu-Rezeptor, EGFR-Rezeptor und der Proliferationsfaktor Ki-67 zur Anwendung. Es handelt sich somit um eine immunphänotypische molekulare Klassifikation des Mammakarzinoms, die mit der eigentlichen molekularen Typisierung zwar relativ gut korreliert, aber dennoch Diskrepanzen zeigt [40].

Diese Diskrepanzen ließen u.a. Zweifel an der generellen klinischen Verwendbarkeit dieser neuen Klassifikation aufkommen. Speziell die Tatsache, dass per Genexpressionsanalyse Östrogenrezeptor-positive oder Her2-Rezeptor überexprimierte Karzinome auf der Proteinebene jeweils negativ waren, beeinflusste die Akzeptanz

dieser neuen Einteilung beträchtlich. Infolge dessen und der oben bereits erwähnten, noch fehlenden klinischen Validierung insbesondere als prädiktiver Faktor existiert bislang noch keine einheitliche, international akzeptierte und klinisch orientierte molekulare Tumorklassifikation für das Mammakarzinom.

In der vorliegenden Promotionsarbeit sind bezüglich der molekularen Klassifikation immunphänotypisch 5 Tumorsubtypen definiert worden [159]. Grundlage der immunphänotypischen molekularen Klassifikation waren hierbei die gut verfügbaren Surrogatmarker Östrogen- und Progesteronrezeptor, der Ki 67-Proliferationsfaktor (MIB 1), die Zytokeratine 5, 14 und 17, der EGFR-Rezeptor sowie der Her2 neu-Rezeptor. Die Subtypisierung erfolgte in Luminal A Tumoren (Östrogen-und/oder Progesteronrezeptor positiv, Her 2 negativ, Ki 67 Proliferation niedrig), Luminal B Tumoren (Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positiv, hoher Ki-67-Proliferationsindex und/oder Her2neu-positiv), Her 2-überexprimierte Tumoren (Her2 positiv, Östrogen- und Progesteronrezeptor negativ) und basal-ähnliche Tumoren (Östrogen-, Progesteron- und Her2-Rezeptor negativ, hochmolekulare Zytokeratine positiv oder EGFR positiv). Darüber hinaus wurde ein sog. non expressor-Subtyp definiert, bei dem keine der o.g. Marker exprimiert wurden. Der in dieser immunphänotypischen Klassifikation definierte Ki-67-Proliferationsindex zur Unterscheidung von Luminal A- und einer Subgruppe von Luminal B-Tumoren von 14 % wird allerdings für klinische Belange in einer aktuellen Studie in Frage gestellt [40, 84].

Die luminalen (Östrogenrezeptor positiven) Karzinome und speziell auch die luminalen B Tumoren haben hierbei ein großes Interesse geweckt [84, 85, 157]. In verschiedenen Arbeiten wurde postuliert, dass es sich bei den Luminal B Tumoren möglicherweise um die Endstufe im Sinne einer Entdifferenzierung von luminalen A Karzinomen handelt [160]. Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen konnten diese These allerdings nicht überzeugend stützen. Speziell die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der diversen intrinsischen Subtypen ergaben Hinweise, dass es sich bei den Östrogenrezeptor-positiven, invasiv duktalem G3-Karzinomen (luminalen B-Karzinome) um eine eigenständige Tumorgruppe handelt und nicht um die Endstufe der Entdifferenzierung von luminalen A-Karzinomen [159].

Die Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre zu allgemeinen Mechanismen der Tumorentstehung ergaben ein sehr komplexes Bild mit einer Vielzahl von unterschiedlichen, sich teilweise ergänzenden, teilweise sich überschneidenden Regelkreisläufen. Wie von Hanahan und Weinberg beschrieben, beinhalten diese Mechanismen Faktoren zur Veränderung der Zellproliferation (Aktivierung bzw. Inaktivierung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen), der Umgehung der Apoptose, der zellulären Unsterblichkeit, der Angiogenese sowie der destruktiven Tumorzellinvasion und der letztendlich zum Tode führenden Metastasenbildung [91, 97]. Hinzu kommen immunologische Mechanismen, eine deutliche Störung im Potential zum Erhalt der genetischen Stabilität sowie die Fähigkeit der unter Stress stehenden Tumorzelle, ihren initial aeroben Energiehaushalt auf einen anaeroben, glykolytischen Stoffwechsel umzustellen. Letzteres kann eine unmittelbare Folge einer erhöhten Tumorzellproliferation und damit eines daraus resultierenden erhöhten Nährstoff- und Sauerstoffbedarfs, als auch die Folge eines ungenügenden Gefäßnetzes mit wiederum sekundärer Hypoxie sein. Das expansive Wachstum von soliden Tumoren aufgrund einer erhöhten Proliferationsrate und/oder einer verminderten Apoptoserate (sog. programmierter Zelltod) führt zu einer mangelnden Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen. Der Tumor versucht dann, diese Defizitsituation durch zwei Adaptationsmaßnahmen zu begegnen: Einerseits stimuliert er das Wachstum neuer Blutgefäße und andererseits versuchen die Tumorzellen, der Defizitregion durch eine Invasion in die besser versorgte Peripherie zu entkommen. Bei diesem Prozess ist der Mangel an Sauerstoff ein entscheidender Faktor, der das invasive Wachstum und die Angiogenese stimuliert [161]. Eine Vielzahl zellulärer Antworten auf eine Hypoxie sind auf eine veränderte Expression kritischer Gene zurückzuführen. Die Transkriptionsfaktoren, die vorrangig die Expression von Genen auf einen hypoxischen Stimulus hin regulieren, werden als Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIFs) bezeichnet [162, 163].

Die HIF-Familie ist diesbezüglich eine der am besten untersuchten Genfamilien mit einer Einbindung in eine Vielzahl unterschiedlicher, teils unabhängiger, teils konkurrierender, daneben auch gegensätzlicher intrazellulärer Regulationskaskaden [161]. Neben der Hypoxie-induzierten HIF-Expression kommt z.B. der Wachstumsfaktorrezeptor vermittelten HIF-Expression über die PI3K-Kaskade und dem mTOR-Pathway sowie den entsprechenden „upstream-pathways“ eine weitere wichtige

Rolle zu [164]. Neuere Studien zeigten zudem enge Interaktionen mit p53 und dem Östrogenrezeptor [165, 166]. So konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass HIF-1 alpha die Transkription des Östrogenrezeptors inhibiert, zugleich aber auch der Östrogenrezeptor die Transkriptionsaktivität von HIF-1 alpha negativ beeinflusst [167, 168].

Die molekularen Mechanismen für HIF-1 und HIF-2 sind hierbei oft identisch, wenngleich HIF-2 in gewebespezifischer Weise exprimiert wird, während HIF-1 in nahezu allen Organen nachzuweisen ist. Die Sequenzhomologie beider Proteine auf der Aminosäureebene beträgt nahezu 50% [101, 169, 170].

Die Expression von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha ist bei einer Vielzahl von malignen epithelialen (z.B. Mammakarzinom, kolorektales Karzinom, Harnblasenkarzinom) neuroektodermalen (z.B. Glioblastom) und mesenchymalen Tumoren (z.B. Osteosarkom) mit einer ungünstigen klinischen Prognose assoziiert [171-173]. In einzelnen Studien wies allerdings die Expression von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha auf eine bessere klinische Prognose hin [174]. Dies mag damit zusammenhängen, dass neben überwiegend tumorigenen Wirkungen von HIF-Faktoren auch wachstumshemmende Funktionen von Mitgliedern der HIF-Familie bekannt sind.

In der Gesamtschau der bislang vorliegenden Literatur wird somit klar, dass die Aktivität und letztendlich auch die Funktionalität von HIF-1 alpha von der Expression, aber auch dem Mutationsstatus zahlreicher weiterer Faktoren abhängt. Beispielsweise konkurrieren p53 und p300 um dieselben Transkriptionsinsertionsstellen bestimmter Zielgene. Die höchste HIF-1 alpha induzierte Transkriptionsaktivität wird dementsprechend bei hoher p300 Expression und hoher mutationsbedingter p53 Expression gesehen. Das erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich. Da eine hohe p53-Expression jedoch meist mit einer Mutation im p53-Gen einhergeht, ist das entsprechende Gen nicht mehr bindungsfähig und kann mit p300 nicht mehr konkurrieren [175]. Letztendlich wirken HIF-1 und HIF-2 somit als Transkriptionsfaktoren, welche in eine direkte Wechselwirkung mit der DNA eintreten und damit die Expression einer inzwischen nahezu unüberschaubaren Anzahl von Faktoren induziert.

Ein weiterer wichtiger klinischer Aspekt der HIF-Expression betrifft die Strahlenresistenz maligner Tumoren. Zwar führt die Bestrahlung maligner Tumoren auch zu einer HIF-abhängigen Induktion der Apoptose. Angesichts der Tatsache, dass in Tiermodellen

HIF-1 alpha-defiziente Tumoren unter Strahlentherapie generell kleiner sind als HIF-intakte Tumoren, scheint die Induktion der Strahlentherapieresistenz im Vordergrund zu stehen [174].

Die HIF-assoziierten intrazellulären Signalkaskaden sind somit Ausgangspunkt für zahlreiche der oben beschriebenen zellulären Regulationen. Die Expression der aktiven Alpha-Untereinheiten von HIF-1 und HIF-2 ist überwiegend gewebespezifisch und in der weiblichen Brust wurde HIF-1 alpha als der wichtigere der beiden Faktoren beschrieben. In der Literatur wurden speziell für HIF-1 und HIF-2 ein Einfluss auf die Angiogenese, die Tumorzellproliferation sowie die Umstellung/Anpassung des intrazellulären Energiehaushaltes beschrieben [114]. Die Ergebnisse dieser Arbeit (siehe Tabelle 6) bestätigen dies und zeigten eine stärkere Expression von HIF-1 alpha als von HIF-2 alpha (28% vs. 9%) bei einem definierten Schwellenwert von 5% analog der Arbeiten von Bos et al. [176]. Die Expression von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha als auch der damit unmittelbar funktionell verbundenen Proteine stieg mit zunehmenden Tumorgrad, wie bereits beschrieben und in Tabelle 7 dargestellt. Eine statistisch signifikante Koexpression von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha fand sich nicht, so dass angenommen werden muss, dass die Expression der beiden Faktoren voneinander unabhängig erfolgt. Die Expression von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha war in unserer Studie statistisch hochsignifikant positiv mit der Koexpression von hochmolekularen Zytokeratinen (CK5/14, CK5/6 und CK17), EGFR, Her2 und Ki-67 assoziiert. Dies bestätigt die Erfahrungen aus der Literatur und den oben aufgeführten zellbiologischen Untersuchungen. Speziell Her2 und EGFR führen über eine Aktivierung des PI3K-Pathways zu einer gesteigerten Zellproliferation und damit zu einer Aktivierung von HIF-1 alpha. Die Expression von EGFR und hochmolekularen Zytokeratinen ist typischerweise in sporadischen und erblichen Mammakarzinomen mit dem basalen Phänotyp assoziiert. Wie in Abbildung 16 und Tabelle 8 dargestellt, konnte dies auch in dieser Studie gezeigt werden mit einer deutlichen Korrelation von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha mit dem basalen Phänotyp. Dieser ist unter anderem durch eine sehr hohe Tumorzellproliferation und einen hohen Prozentsatz von Nekrosen gekennzeichnet, das auf einen per se hypoxischen Zustand der Tumorzelle hindeutet [176]. Hingegen war die Expression des Östrogen- und Progesteronrezeptors statistisch hochsignifikant invers mit HIF-1 alpha und HIF-2 alpha assoziiert. Dieser Befund kann basierend auf den Daten aus der Literatur funktional erklärt werden. Ryu et al. beschrieben, dass die

Expression von HIF-1 alpha die Expression des Östrogenrezeptors hemmt [177]. Desgleichen existieren aber auch zellbiologische Experimente, welche zeigten, dass der Östrogenrezeptor auch die Transkription und Expression von HIF-1 alpha negativ beeinflusst [178]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde erlauben keine endgültige Beantwortung dieser Frage. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf einen weiteren, bislang nicht bekannten Mechanismus hin. Dies wird offensichtlich bei der Betrachtung der Ergebnisse der HIF-1 alpha und HIF-2 alpha Expression in den beiden Subgruppen der Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinome, d.h. der luminalen A und luminalen B Subtypen. Der luminalen A Subtyp zeigte für alle untersuchten Faktoren eine negative signifikante Korrelation, was die oben angeführte Hypothese bestätigen würde. Für den luminalen B-Subtyp stellt sich das Bild deutlich anders dar. Zwar sind die Korrelationen nicht so prägnant ausgeprägt wie beim basal-ähnlichen oder dem HER2-Subtyp, aber die Korrelationskoeffizienten bewegen sich allesamt auf einem positiven Niveau. Es ist somit anzunehmen, dass entweder die Hemmung von HIF-1 durch den Östrogenrezeptor als alleiniger Faktor nicht ausreicht. Alternativ wäre zu spekulieren, dass möglicherweise die Funktion des Östrogenrezeptors im luminalen B Subtyp gestört ist.

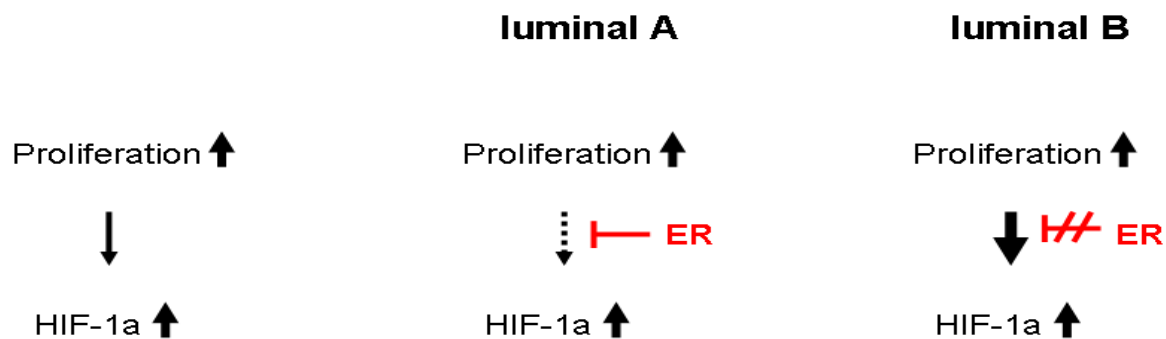


Abbildung 20: Modell einer Interaktion des Östrogen-Rezeptors und HIF-1 alpha in luminalen Mammakarzinomen.

Es ist festzuhalten, dass sich die Resultate in den beiden Subgruppen der luminal B-Karzinome nicht unterscheiden, so dass der Einfluss von Her2 in der Her2-positiven luminalen B-Subgruppe nicht dominierend zu sein scheint. Im Übrigen fanden sich sehr ähnliche Befunde wie in Abbildungen 18 und 19 dargestellt in Östrogenrezeptor-positiven Karzinomen in Abhängigkeit vom Tumorgrad. Östrogenrezeptor-positive G1 und G2 Karzinome wiesen ein gleichsinniges Verhalten bezüglich der HIF-Kaskade, im

Gegensatz zu Östrogenrezeptor-positiven G3 Karzinomen auf. Letztere waren im Prinzip identisch mit luminalen B-Karzinomen. Im Vergleich zu einer kürzlich publizierten Arbeit wird nun offensichtlich, dass somit die intrazellulären HIF-assoziierten Reaktionskaskaden in den verschiedenen Subgruppen des Mammakarzinoms konserviert sind. Dies scheint im Gegensatz zu verschiedenen Faktoren der Tumorzellproliferation zu stehen, welche in ihrem Expressionsverhalten einen deutlichen Unterschied aufwiesen [159]. In der Gesamtschau der oben genannten Ergebnisse scheint somit das Expressionsmaß und damit wahrscheinlich auch die Aktivität der HIF-assoziierten Faktoren in den verschiedenen molekularen Subgruppen unterschiedlich zu sein. Von einer Intaktheit der Reaktionskaskade ist allerdings auszugehen, da sich das Expressionsverhalten der Faktoren zueinander nicht veränderte. Die Neigung der Regressionsgeraden in den verschiedenen molekularen Subtypen unterschied sich nicht.

In der Literatur wurde eine Expression von HIF-1 alpha mit deutlich erhöhter Frequenz in BRCA-1 mutierten erblichen Mammakarzinomen beschrieben [179]. In unserem Untersuchungskollektiv ist die familiäre Anamnese nur teilweise bekannt und dementsprechend kann hierzu keine Aussage getroffen werden. Eine Assoziation mit dem Lebensalter – ein möglicher Surrogatmarker für einen familiären Hintergrund eines Mammakarzinoms – konnte in unseren Untersuchungen nicht gesehen werden.

Unsere Ergebnisse bezüglich des prognostischen Werts der HIF-1 alpha, der HIF-2 alpha Expression und der damit assoziierten Faktoren stehen teilweise im Widerspruch als auch im Einklang mit den Berichten aus der Literatur. Für fast alle Faktoren, außer FIH, konnte keine statistisch signifikante prognostische Relevanz evaluiert werden. Dies betraf jeweils das gesamte Kollektiv als auch die getrennte Betrachtung der prä- und postmenopausalen Karzinome. Allerdings zeigt die genaue Betrachtung der Überlebenskurven nach einer Nachbeobachtungszeit von mehr als 10 Jahren zum Beispiel einen Überlebensvorteil von bis zu knapp 20% für Patientinnen mit geringer Expression von HIF-1 alpha.

Die prognostische Relevanz speziell der HIF-1 alpha Expression wurde in der Literatur oftmals sehr unterschiedlich betrachtet. Die Diskrepanz unserer Ergebnisse zu anderen Erfahrungen beim invasiven Mammakarzinom mag zum Teil auf die Verwendung von Gewebemikroarrays zurückzuführen sein [150, 151, 180]. In zahlreichen Studien

wurden komplette histologische Schnitte verwendet. Dieses Verfahren ist bei teilweise sehr heterogener Expression von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha dem Verfahren der Gewebemikroarrays vorzuziehen. Letzteres hat naturgemäß den Nachteil, dass eine größere Expressionsheterogenität eines bestimmten Faktors in einem Karzinom nicht erfasst wird. Zudem existieren für HIF-1 alpha und HIF-2 alpha keine generell akzeptierten Richtlinien für die Auswertung. Bos et al. unterschieden z.B. zwischen einer diffusen, über dem gesamten Karzinom verteilten und unterschiedlich starken, jedoch gleichmäßigen HIF-Expression sowie einer perinekrotischen und somit nur fokalen, meist HIF-1 alpha-Expression [176]. Interessanterweise war nur letztere von prognostischer Relevanz. Zudem ist festzuhalten, dass auch ein genereller Grenzwert für eine HIF-1- oder HIF-2-Positivität nicht existiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Grenzwerte (1%, 2% 5% und 10%) aller Zellen getestet, ohne dass sich hierbei ein wesentlicher, statistisch signifikanter Unterschied ergab und somit ein Schwellenwert von 5% verwendet wurde. Auf diese Ergebnisse wurde aber nicht weiter eingegangen. Unterschiedliche verwendete Primärantikörper oder divergente Färbeprotokolle als Begründung für die fehlende prognostische Relevanz scheiden aus, da diese identisch waren. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz für die divergenten Ergebnisse mag auch in dem untersuchten Patientinnenkollektiv aus dem Jahr 1997 bis 2003 liegen. Die Patientinnen erhielten teilweise sehr unterschiedliche, überwiegend adjuvante, teilweise auch neoadjuvante chemotherapeutische Behandlungsansätze. Eine detaillierte Analyse der verschiedenen Subgruppen war nicht möglich, da die Behandlungsschemata zu unterschiedlich waren und dementsprechend die Subgruppen zu klein gewesen wären.

Hingegen war die nukleare Expression von FIH mit einem statistisch signifikanten Überlebensvorteil im Gesamtkollektiv assoziiert. Eine identische Beobachtung konnten auch Hyseni et al. machen [181]. In dieser niederländischen Studie wurde beschrieben, dass die zytoplasmatische Expression von FIH mit einer verschlechterten Prognose einhergeht. Die Interpretation dieses Befundes ist schwierig, da es die bislang bekannte Funktion von FIH um eine weitere, bisher unbekannt Facette erweitert. Unter physiologischen Umständen ist FIH im Zytoplasma der Tumorzelle lokalisiert und verhindert eine Aktivierung von HIF-1 alpha und konsekutiv die Transkription der entsprechenden Targetgene. Unter diesem Aspekt wäre FIH als Tumorsuppressorgen zu betrachten und ein Verlust der Expression wäre mit einem Tumorwachstum und

entsprechend verschlechterter Prognose assoziiert. Warum nun der Verlust mit einem verbesserten Überleben der Patientinnen einhergeht, ist unklar und deutet auf eine Wechselwirkung mit weiteren intrazellulären Regulationsmechanismen hin. Zheng et al. wiesen in diesem Zusammenhang auf den Notch-Pathway hin [182].

Die Expression von p300 war statistisch signifikant mit der Expression von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha, CA IX als auch dem Tumorgrad assoziiert, zeigte aber keine prognostische Relevanz. Da p300 durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen aktiviert werden kann, ist letzteres leicht zu erklären. Eine Assoziation zwischen p300 und den HIF-Faktoren sowie p53 wurde bereits beschrieben, und die vorliegende Arbeit bestätigt somit bereits publizierte Befunde zur Rolle von p300 als transkriptionellen Koaktivator von HIF-1 [175].

Mit der zentralen Rolle von HIF-1 alpha in der Tumorentstehung wurde speziell HIF-1 wiederholt als Zielstruktur für eine gerichtete molekulare Therapie diskutiert. Die Entwicklung einer solchen Therapie ist allerdings naturgemäß problematisch, da DNA-bindende Proteine wie z.B. HIF-1 alpha in ihrer Rolle als Transkriptionsfaktoren vielseitige Bindungsstellen haben und durch Pharmaka schwer zu erreichen sind.

Die zentrale Rolle wird weiter durch die Beobachtung betont, dass eine Vielzahl von den derzeit gebräuchlichen und in der Behandlung maligner Tumoren eingesetzten Chemotherapeutika indirekt die Aktivität von HIF-1 alpha bis zu einem gewissen Maß beeinflusst. So interferieren Topoisomerasehemmer Typ I und II bzw. Medikamente mit einer DNA-interkalierenden Wirkung mit der DNA-Bindung von HIF-1 alpha und konsekutiv der Transkriptionsaktivität. Auch die derzeit schon bei einer Vielzahl von Mammakarzinompatientinnen im Rahmen von adjuvanten, neoadjuvanten und palliativen Therapieansätzen eingesetzten Rezeptortyrosinkinasen (z.B. Herceptin®) führen zu einer Reduktion der HIF-1-Aktivität wie auch die mTOR-Inhibitoren [174]. Es ist derzeit unklar, ob eine direkte Hemmung von HIF-1 alpha einen größeren Effekt auf das Tumorstadium als die bereits bekannte, oben beschriebene indirekte Aktivitätsreduktion von HIF-1 alpha haben würde. Bislang vorliegende in vitro und in vivo Daten weisen allerdings noch auf ein generelles Problem hin, welches auch beim invasiven Mammakarzinom möglicherweise beachtet werden muss. Die Wirkung von HIF-1 alpha und HIF-2 alpha beim Mammakarzinom ist meist gleichsinnig und vorwiegend über HIF-1 alpha determiniert. Es häufen sich allerdings Beobachtungen,

welche HIF-1 alpha und HIF-2 alpha in einem gewissen Rahmen als sich gegenseitig kontrollierende Wechselspieler charakterisieren [183, 184]. Die Hemmung des einen Faktors würde somit zu einer vermehrten Aktivierung des anderen mit allen bekannten Konsequenzen führen. Es zeichnet sich somit ab, dass die zielgerichtete Therapie gegen HIF-Faktoren teils tumor- aber auch faktorspezifisch sein muss. Klinische Daten im Rahmen von Phase-1- oder 2-Studien liegen derzeit nicht vor und die prädiktive Funktion von HIF-1 alpha muss somit weiter charakterisiert werden.

Die Assoziation von HIF-1 alpha mit dem Tumorgrad als auch Differenzierungsmarker wie EGFR und hochmolekularen Zytokeratinen legt allerdings nahe, dass HIF-1alpha positive Karzinome möglicherweise eine intensivere Chemotherapie benötigen. Interessanterweise wurde HIF-1 alpha als einer der zentralen Faktoren einer prädiktiven, immunhistochemisch validierten und reproduzierten Genexpressionssignatur beschrieben [185]. Ob HIF-1 alpha dabei als prädiktiver Faktor bei einer beschriebenen Assoziation mit EGFR und Her2 diesen Faktoren überlegen ist, ist unklar.

Weitere Studien werden notwendig sein, um diese oben aufgeworfenen Fragen im Detail klären zu können. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass HIF-1 alpha und die damit verbundenen Faktoren in den verschiedenen Subgruppen des invasiven Mammakarzinoms gleichartig, jedoch in unterschiedlicher Intensität, reguliert sind. Damit steht in Zukunft möglicherweise ein neuer Therapieansatz zur Verfügung, welcher eine optimierte, individuelle Therapie für das Mammakarzinom ermöglicht.

6. Schriftenverzeichnis

1. World-Health-Organization, *International Agency for Research on Cancer (2008) World Cancer Report*. Lyon. 2008.
2. Robert Koch Institut, *Krebs in Deutschland 2007/2008. Häufigkeiten und Trends.*, Berlin 2012. p. 64 - 67.
3. Harris, J.R., Lippman, M.E., Veronesi, U., et al., *Breast cancer (3)*. N Engl J Med, 1992. 327: p. 319-328.
4. Klöppel, G., Kreipe, H., Remmele, W., et al., *Pathologie : Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen* Prognostische und prädiktive Faktoren, ed. T. Decker and W. Böcker. Vol. 3., Aufl. . Dezember 2012, Berlin Springer Berlin XVIII, 700 S. : 70 schw.-w. Ill., 800 farb. Ill.
5. National-Cancer-Institute, *SEER Cancer Statistics Review 1997-2007*. 2011.
6. Klöppel, G., Kreipe, H., Remmele, W., et al., *Pathologie : Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen* Karzinogenese der Mammakarzinome, ed. H. Bürger and W. Böcker. Vol. 3., Aufl. . Dezember 2012, Berlin: Springer Berlin XVIII, 700 S. : 70 schw.-w. Ill., 800 farb. Ill.
7. Newcomb, P.A., Trentham-Dietz, A., Hampton, J.M., et al., *Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer*. Cancer, 2011. 117(9): p. 1946-56.
8. Maass, H., *Mammakarzinom:Epidemiologie*. Gynäkologie 1994. 27: p. 3-6.
9. Tworoger, S.S., Missmer, S.A., Barbieri, R.L., et al., *Plasma sex hormone concentrations and subsequent risk of breast cancer among women using postmenopausal hormones*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(8): p. 595-602.
10. Chen, C.L., Weiss, N.S., Newcomb, P., et al., *Hormone replacement therapy in relation to breast cancer*. JAMA, 2002. 287(6): p. 734-41.
11. Feige, A., Rempfen, A., Würfel, W., et al., *Frauenheilkunde*. Vol. 2.Auflage. 1997, München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg Verlag.
12. Goss, P.E. and Sierra, S., *Current perspectives on radiation-induced breast cancer*. J Clin Oncol, 1998. 16(1): p. 338-47.
13. Lee, J.S., John, E.M., McGuire, V., et al., *Breast and ovarian cancer in relatives of cancer patients, with and without BRCA mutations*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. 15(2): p. 359-63.
14. Peto, J., Easton, D.F., Matthews, F.E., et al., *Cancer mortality in relatives of women with breast cancer: the OPCS Study*. Office of Population Censuses and Surveys. Int J Cancer, 1996. 65(3): p. 275-83.

15. Walsh, T. and King, M.C., *Ten genes for inherited breast cancer*. *Cancer Cell*, 2007. 11(2): p. 103-5.
16. Honrado, E., Benitez, J. and Palacios, J., *The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications*. *Mod Pathol*, 2005. 18(10): p. 1305-20.
17. Honrado, E., Osorio, A., Palacios, J., et al., *Pathology and gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1, BRCA2 and CHEK2 gene mutations*. *Oncogene*, 2006. 25(43): p. 5837-45.
18. Rahman, N. and Scott, R.H., *Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players*. *Hum Mol Genet*, 2007. 16 Spec No 1: p. R60-6.
19. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. *Science*, 1994. 266(5182): p. 66-71.
20. Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., et al., *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. *Science*, 1994. 265(5181): p. 2088-90.
21. King, M.C., Marks, J.H. and Mandell, J.B., *Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2*. *Science*, 2003. 302(5645): p. 643-6.
22. Hubert, A., Peretz, T., Manor, O., et al., *The Jewish Ashkenazi founder mutations in the BRCA1/BRCA2 genes are not found at an increased frequency in Ashkenazi patients with prostate cancer*. *Am J Hum Genet*, 1999. 65(3): p. 921-4.
23. Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., et al., *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. *Nat Genet*, 2010. 42(5): p. 410-4.
24. Schnitt, S.J., *Clinging carcinoma: an American perspective*. *Semin Diagn Pathol*, 2010. 27(1): p. 31-6.
25. Fitzgibbons, P.L., Henson, D.E. and Hutter, R.V., *Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement. Cancer Committee of the College of American Pathologists*. *Arch Pathol Lab Med*, 1998. 122(12): p. 1053-5.
26. Schnitt, S.J., *Benign breast disease and breast cancer risk: morphology and beyond*. *Am J Surg Pathol*, 2003. 27(6): p. 836-41.
27. Schnitt, S.J. and Collins, L.C., *Biopsy Interpretation of the Breast*. 2nd ed. Intraductal Proliferative Lesions: Usual ductal hyperplasia, atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ, ed. J.I. Epstein. Vol. 2nd edition. Oktober 2012, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 58 - 106.

28. Silverstein, M.J. and Lagios, M.D., *Choosing treatment for patients with ductal carcinoma in situ: fine tuning the University of Southern California/Van Nuys Prognostic Index*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2010. 2010(41): p. 193-6.
29. Ernster, V.L., Barclay, J., Kerlikowske, K., et al., *Mortality among women with ductal carcinoma in situ of the breast in the population-based surveillance, epidemiology and end results program*. Arch Intern Med, 2000. 160(7): p. 953-8.
30. Page, D.L., Schuyler, P.A., Dupont, W.D., et al., *Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study*. Lancet, 2003. 361(9352): p. 125-9.
31. Ansquer, Y., Delaney, S., Santulli, P., et al., *Risk of invasive breast cancer after lobular intra-epithelial neoplasia: review of the literature*. Eur J Surg Oncol, 2010. 36(7): p. 604-9.
32. Page, D.L., Dupont, W.D., Rogers, L.W., et al., *Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study*. Cancer, 1985. 55(11): p. 2698-708.
33. Wellings, S.R., Jensen, H.M. and Marcum, R.G., *An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions*. J Natl Cancer Inst, 1975. 55(2): p. 231-73.
34. Borst, M.J. and Ingold, J.A., *Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast*. Surgery, 1993. 114(4): p. 637-41; discussion 641-2.
35. Arpino, G., Bardou, V.J., Clark, G.M., et al., *Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome*. Breast Cancer Res, 2004. 6(3): p. R149-56.
36. Ferlicot, S., Vincent-Salomon, A., Medioni, J., et al., *Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast*. Eur J Cancer, 2004. 40(3): p. 336-41.
37. Lakhani, S.R., Ellis, I.O., Schnitt, S.J., et al., *WHO classification of tumors of the breast*. 4th ed, ed. F.T. Bosman, et al.2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
38. Lakhani, S.R., Ellis, I.O., Schnitt, S.J., et al., *WHO classification of tumors of the breast*. 4th ed. Invasive lobular carcinoma, ed. S.R. Lakhani, E. Rakha, and P.T. Simpson2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC). 40 - 76.
39. Lakhani, S.R., Ellis, I.O., Schnitt, S.J., et al., *WHO classification of tumors of the breast*. 4th ed. Invasive carcinoma of no special type, ed. I.O. Ellis, et al.2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC). 34.
40. Guiu, S., Michiels, S., Andre, F., et al., *Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement*. Ann Oncol, 2012. 23(12): p. 2997-3006.

41. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(14): p. 8418-23.
42. Fitzgibbons, P.L., Page, D.L., Weaver, D., et al., *Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999*. Arch Pathol Lab Med, 2000. 124(7): p. 966-78.
43. McGuire, W.L., Tandon, A.K., Allred, D.C., et al., *How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 1990. 82(12): p. 1006-15.
44. Kreienberg R, M.V., Jonat W, Kühn T, *Mammakarzinom Interdisziplinär. Prognostische und prädiktive Faktoren (unter Berücksichtigung von Genexpressionsanalysen)*, ed. M.V. Jänicke F, Harbeck N. Vol. 4. Auflage. 2010, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
45. Bundred, N.J., *Prognostic and predictive factors in breast cancer*. Cancer Treat Rev, 2001. 27(3): p. 137-42.
46. Weigel, M.T. and Dowsett, M., *Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction*. Endocr Relat Cancer, 2010. 17(4): p. R245-62.
47. Untch, M. and Sittek, H., *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms: State of the Art*. Pathomorphologische Begutachtung bei primärer Operation und nach präoperativer Chemotherapie, ed. A. Lebeau. Vol. 5. Auflage. 2008, München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag. 145 - 156.
48. Untch, M. and Sittek, H., *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms: State of the Art*. Praxisrelevante evidenzbasierte prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom, ed. E. Kantelhardt, et al. Vol. 5. Auflage. 2008, München, Wien, New York: W. Zuckschwerdt Verlag.
49. Bauerfeind, I., *Mammakarzinome Manual: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom, ed. G. Schaller, et al. Vol. 13. Auflage. 2011, München: Tumorzentrum München ; Zuckerschwerdt Verlag.
50. Krebsforschungszentrum/Krebsinformationsdienst, D. *Krebsarten: Brustkrebs*. Brustkrebs: Lymphknotenentfernung und Sentinel-Lymphknoten-Biopsie, 2012.
51. Cabioglu, N., Hunt, K.K., Sahin, A.A., et al., *Role for intraoperative margin assessment in patients undergoing breast-conserving surgery*. Ann Surg Oncol, 2007. 14(4): p. 1458-71.
52. Elston, C.W. and Ellis, I.O., *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. 19(5): p. 403-10.
53. Genestie, C., Zafrani, B., Asselain, B., et al., *Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825*

- cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. Anticancer Res, 1998. 18(1B): p. 571-6.*
54. Pereira, H., Pinder, S.E., Sibbering, D.M., et al., *Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. Histopathology, 1995. 27(3): p. 219-26.*
 55. Sundquist, M., Thorstenson, S., Brudin, L., et al., *Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish breast cancer population. South East Swedish Breast Cancer Study Group. Breast Cancer Res Treat, 1999. 53(1): p. 1-8.*
 56. Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Lee, A.H., et al., *Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. J Clin Oncol, 2008. 26(19): p. 3153-8.*
 57. Javid, S.H., Smith, B.L., Mayer, E., et al., *Tubular carcinoma of the breast: results of a large contemporary series. Am J Surg, 2009. 197(5): p. 674-7.*
 58. Bettelheim, R., Penman, H.G., Thornton-Jones, H., et al., *Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. Br J Cancer, 1984. 50(6): p. 771-7.*
 59. Clemente, C.G., Boracchi, P., Andreola, S., et al., *Peritumoral lymphatic invasion in patients with node-negative mammary duct carcinoma. Cancer, 1992. 69(6): p. 1396-403.*
 60. Schnitt, S.J. and Collins, L.C., *Biopsy Interpretation of the Breast. 2nd ed. Invasive Breast Cancer, ed. J.I. Epstein October 2012, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 282 - 362.*
 61. Irie, J., Manucha, V., Ioffe, O.B., et al., *Artefact as the pathologist's friend: peritumoral retraction in in situ and infiltrating duct carcinoma of the breast. Int J Surg Pathol, 2007. 15(1): p. 53-9.*
 62. Rudiger, T., Hofler, H., Kreipe, H.H., et al., *[Interlaboratory trial 2000 "Immunohistochemistry" of the German Society for Pathology and the Professional Association of German Pathologists]. Pathologe, 2003. 24(1): p. 70-8.*
 63. Maass, H. and Jonat, W., *Steroid receptors as a guide for therapy of primary and metastatic breast cancer. J Steroid Biochem, 1983. 19(1C): p. 833-7.*
 64. Stegner, H.E., Jonat, W. and Maass, H., *[Immunohistochemical detection of nuclear estrogen receptors with monoclonal antibodies in different types of breast cancer]. Pathologe, 1986. 7(3): p. 156-63.*
 65. Hammond, M.E., Hayes, D.F., Wolff, A.C., et al., *American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Oncol Pract, 2010. 6(4): p. 195-7.*

66. Goldhirsch, A., Glick, J.H., Gelber, R.D., et al., *Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005*. *Ann Oncol*, 2005. 16(10): p. 1569-83.
67. Allred, D.C., Harvey, J.M., Berardo, M., et al., *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. *Mod Pathol*, 1998. 11(2): p. 155-68.
68. Remmele, W. and Stegner, H.E., [*Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue*]. *Pathologe*, 1987. 8(3): p. 138-40.
69. Regan, M.M., Viale, G., Mastropasqua, M.G., et al., *Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays*. *J Natl Cancer Inst*, 2006. 98(21): p. 1571-81.
70. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. 235(4785): p. 177-82.
71. Press, M.F., Bernstein, L., Thomas, P.A., et al., *HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas*. *J Clin Oncol*, 1997. 15(8): p. 2894-904.
72. Ross, J.S., Fletcher, J.A., Linette, G.P., et al., *The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy*. *Oncologist*, 2003. 8(4): p. 307-25.
73. Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. *Arch Pathol Lab Med*, 2007. 131(1): p. 18-43.
74. Metzger-Filho, O., de Azambuja, E., Bradbury, I., et al., *Analysis of Regional Timelines To Set Up a Global Phase III Clinical Trial in Breast Cancer: The Adjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization Experience*. *Oncologist*, 2013.
75. Press, M.F., Sauter, G., Bernstein, L., et al., *Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials*. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(18): p. 6598-607.
76. Harbeck, N., Dettmar, P., Thomssen, C., et al., *Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: 6-year median follow-up*. *Br J Cancer*, 1999. 80(3-4): p. 419-26.
77. Kuhn, W., Schmalfeldt, B., Reuning, U., et al., *Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc*. *Br J Cancer*, 1999. 79(11-12): p. 1746-51.

78. Scharl, A., *Aktuelle Empfehlung zur Prävention, Diagnostik und Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome* 2011, München: Zuckerschwerdt.
79. Dowsett, M., Nielsen, T.O., A'Hern, R., et al., *Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group*. J Natl Cancer Inst, 2011. 103(22): p. 1656-64.
80. Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. 406(6797): p. 747-52.
81. Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. J Clin Oncol, 2009. 27(8): p. 1160-7.
82. Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(19): p. 10869-74.
83. Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. 22(8): p. 1736-47.
84. Cheang, M.C., Chia, S.K., Voduc, D., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. 101(10): p. 736-50.
85. Curtis, C., Shah, S.P., Chin, S.F., et al., *The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups*. Nature, 2012. 486(7403): p. 346-52.
86. Sparano, J.A. and Paik, S., *Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials*. J Clin Oncol, 2008. 26(5): p. 721-8.
87. Buyse, M., Loi, S., van't Veer, L., et al., *Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2006. 98(17): p. 1183-92.
88. Bloom, H.J. and Richardson, W.W., *Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years*. Br J Cancer, 1957. 11(3): p. 359-77.
89. Markopoulos, C., *Overview of the use of Oncotype DX((R)) as an additional treatment decision tool in early breast cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2013. 13(2): p. 179-94.
90. Drukker, C.A., Bueno-de-Mesquita, J.M., Retel, V.P., et al., *A prospective evaluation of a breast cancer prognosis signature in the observational RASTER study*. Int J Cancer, 2013.
91. Hanahan, D. and Weinberg, R.A., *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.

92. Holland, R., Peterse, J.L., Millis, R.R., et al., *Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification*. Semin Diagn Pathol, 1994. 11(3): p. 167-80.
93. Aulmann, S., Elsayaf, Z., Penzel, R., et al., *Invasive tubular carcinoma of the breast frequently is clonally related to flat epithelial atypia and low-grade ductal carcinoma in situ*. Am J Surg Pathol, 2009. 33(11): p. 1646-53.
94. Holland, R. and Hendriks, J.H., *Microcalcifications associated with ductal carcinoma in situ: mammographic-pathologic correlation*. Semin Diagn Pathol, 1994. 11(3): p. 181-92.
95. Lagios, M.D., Margolin, F.R., Westdahl, P.R., et al., *Mammographically detected duct carcinoma in situ. Frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence*. Cancer, 1989. 63(4): p. 618-24.
96. Silverstein, M.J., Lagios, M.D., Craig, P.H., et al., *A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast*. Cancer, 1996. 77(11): p. 2267-74.
97. Hanahan, D. and Weinberg, R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
98. Wang, G.L. and Semenza, G.L., *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1995. 270(3): p. 1230-7.
99. Acker, T. and Plate, K.H., *A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology*. J Mol Med (Berl), 2002. 80(9): p. 562-75.
100. Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., et al., *Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha*. Blood, 1998. 92(7): p. 2260-8.
101. Tian, H., McKnight, S.L. and Russell, D.W., *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes Dev, 1997. 11(1): p. 72-82.
102. Beasley, N.J., Wykoff, C.C., Watson, P.H., et al., *Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density*. Cancer Res, 2001. 61(13): p. 5262-7.
103. Trastour, C., Benizri, E., Ettore, F., et al., *HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome*. Int J Cancer, 2007. 120(7): p. 1451-8.
104. Iyer, N.G., Ozdag, H. and Caldas, C., *p300/CBP and cancer*. Oncogene, 2004. 23(24): p. 4225-31.
105. Goodman, R.H. and Smolik, S., *CBP/p300 in cell growth, transformation, and development*. Genes Dev, 2000. 14(13): p. 1553-77.

106. Chan, H.M. and La Thangue, N.B., *p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 13): p. 2363-73.
107. Geng, H., Liu, Q., Xue, C., et al., *HIF1alpha protein stability is increased by acetylation at lysine 709*. J Biol Chem, 2012. 287(42): p. 35496-505.
108. Groulx, I., Bonicalzi, M.E. and Lee, S., *Ran-mediated nuclear export of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein occurs independently of its assembly with cullin-2*. J Biol Chem, 2000. 275(12): p. 8991-9000.
109. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. 399(6733): p. 271-5.
110. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., et al., *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. EMBO J, 2000. 19(16): p. 4298-309.
111. Jones, M.K., Szabo, I.L., Kawanaka, H., et al., *von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis*. FASEB J, 2002. 16(2): p. 264-6.
112. Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., et al., *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor*. Genes Dev, 2002. 16(12): p. 1466-71.
113. Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., et al., *Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous*. FASEB J, 2001. 15(7): p. 1312-4.
114. Rankin, E.B. and Giaccia, A.J., *The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis*. Cell Death Differ, 2008. 15(4): p. 678-85.
115. Mahon, P.C., Hirota, K. and Semenza, G.L., *FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity*. Genes Dev, 2001. 15(20): p. 2675-86.
116. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., et al., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. Science, 2001. 292(5516): p. 464-8.
117. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. 292(5516): p. 468-72.
118. Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S.G., et al., *Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1783(3): p. 394-404.
119. Lando, D., Peet, D.J., Whelan, D.A., et al., *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. Science, 2002. 295(5556): p. 858-61.

120. Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. 271(51): p. 32529-37.
121. Freedman, S.J., Sun, Z.Y., Poy, F., et al., *Structural basis for recruitment of CBP/p300 by hypoxia-inducible factor-1 alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(8): p. 5367-72.
122. Flagg, S.C., Martin, C.B., Taabazuing, C.Y., et al., *Screening chelating inhibitors of HIF-prolyl hydroxylase domain 2 (PHD2) and factor inhibiting HIF (FIH)*. J Inorg Biochem, 2012. 113: p. 25-30.
123. Brenton, J.D., Carey, L.A., Ahmed, A.A., et al., *Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?* J Clin Oncol, 2005. 23(29): p. 7350-60.
124. Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. 10(16): p. 5367-74.
125. Kornegoor, R., Verschuur-Maes, A.H., Buerger, H., et al., *Molecular subtyping of male breast cancer by immunohistochemistry*. Mod Pathol, 2012. 25(3): p. 398-404.
126. Colozza, M., Sidoni, A. and Piccart-Gebhart, M., *Value of Ki67 in breast cancer: the debate is still open*. Lancet Oncol, 2010. 11(5): p. 414-5.
127. Battifora, H., *The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing*. Lab Invest, 1986. 55(2): p. 244-8.
128. Matos, L.L., Trufelli, D.C., de Matos, M.G., et al., *Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice*. Biomark Insights, 2010. 5: p. 9-20.
129. Idikio, H.A., *Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains*. Int J Clin Exp Pathol, 2009. 3(2): p. 169-76.
130. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., et al., *Immunobiology*. 5th ed. The Immune System in Health and Disease 2001, New York: Garland Science.
131. Boenisch, T., Farmilo, A.J., Stead, R.H., et al., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Antikörper 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 5 - 13.
132. Boenisch, T., Farmilo, A.J., Stead, R.H., et al., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Färbemethoden - Detektionssysteme 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 34 - 42.

133. Boenisch, T., Farnilo, A.J., Stead, R.H., et al., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Automatisierung in der Immunhistochemie 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 53 - 54.
134. Boenisch, T., Farnilo, A.J., Stead, R.H., et al., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Fixierung 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 23 - 29.
135. Boenisch, T., Farnilo, A.J., Stead, R.H., et al., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Antigendemaskierung (Epitop - Retrieval) 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 30 - 33.
136. Shi, S.R., Shi, Y. and Taylor, C.R., *Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades*. *J Histochem Cytochem*, 2011. 59(1): p. 13-32.
137. Boenisch, T., Farnilo, A.J., Stead, R.H., et al., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Gewebeverarbeitung 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 59 - 62.
138. Boenisch, T., Farnilo, A.J., Stead, R.H., et al., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Fehlersuche und -Behebung 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 63 - 79.
139. Boenisch T., F.A., Stead R.H., Key M., Welcher R., Harvey R., Atwood K.N., *Handbuch: Immunchemische Färbemethoden*. 3rd ed. Kontrollen 2006, Carpinteria + Hamburg: Dako North America + Dako Deutschland 43 - 45.
140. Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. *Nat Med*, 1998. 4(7): p. 844-7.
141. Simon, R.G., *Tissue microarrays : methods and protocols* 2010, New York, N.Y: Humana Press.
142. van de Rijn, M. and Gilks, C.B., *Applications of microarrays to histopathology*. *Histopathology*, 2004. 44(2): p. 97-108.
143. Kramer, M.W., Merseburger, A.S., Hennenlotter, J., et al., *Tissue microarrays in clinical urology--technical considerations*. *Scand J Urol Nephrol*, 2007. 41(6): p. 478-84.
144. Merseburger, A.S., Hennenlotter, J., Simon, P., et al., *Activation of the PKB/Akt pathway in histological benign prostatic tissue adjacent to the primary malignant lesions*. *Oncol Rep*, 2006. 16(1): p. 79-83.
145. Moch, H., Kononen, T., Kallioniemi, O.P., et al., *Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology?* *Adv Anat Pathol*, 2001. 8(1): p. 14-20.
146. Camp, R.L., Dolled-Filhart, M., King, B.L., et al., *Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows that both high and normal levels of HER2 expression are associated with poor outcome*. *Cancer Res*, 2003. 63(7): p. 1445-8.

147. Tsao, S.C., Wu, C.C., Wen, C.H., et al., *Improved technique for manually constructing tissue microarrays for large-core arrays*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2013. 21(1): p. 85-9.
148. Merseburger, A.S., Horstmann, M., Hennenlotter, J., et al., *Die Tissue Microarray-Technik als neues "high throughput-tool" für den Nachweis differentieller Proteinexpression*. Journal für Urologie und Urogynäkologie 2003;10 (3): 7–11., 2003.
149. Camp, R.L., Charette, L.A. and Rimm, D.L., *Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma*. Lab Invest, 2000. 80(12): p. 1943-9.
150. Lin, Y., Hatem, J., Wang, J., et al., *Tissue microarray-based immunohistochemical study can significantly underestimate the expression of HER2 and progesterone receptor in ductal carcinoma in situ of the breast*. Biotech Histochem, 2011. 86(5): p. 345-50.
151. van Zwieten, A., *Tissue microarray technology and findings for diagnostic immunohistochemistry*. Pathology, 2013. 45(1): p. 71-9.
152. Buerger, H., Boecker, F., Packeisen, J., et al., *Analyzing the basic principles of tissue microarray data measuring the cooperative phenomena of marker proteins in invasive breast cancer*. Open Access Bioinformatics, 2013. 5(1): p. 1 - 21.
153. Harbeck, N., Aigner, M., Kuschel, B., et al., *Mammakarzinom - prognostische und prädiktive Faktoren*, in *Der Onkologe* 2002, Springer-Verlag. p. pp 808-816
154. Untch, M., Gerber, B., Möbus, V., et al., *St.-Gallen-Konferenz 2011 zum primären Mammakarzinom*. Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie, 2011. 8(02): p. 106-115.
155. Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., et al., *American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. 25(33): p. 5287-312.
156. Dowsett, M., Smith, I.E., Ebbs, S.R., et al., *Prognostic Value of Ki67 Expression After Short-Term Presurgical Endocrine Therapy for Primary Breast Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2007. 99(2): p. 167-170.
157. Geyer, F.C., Rodrigues, D.N., Weigelt, B., et al., *Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers*. Adv Anat Pathol, 2012. 19(1): p. 39-53.
158. Naume, B. and Sorlie, T., *Molecular profiling of early breast cancer in relation to detection of micrometastases and outcome*. Breast Cancer Research, 2005. 7(Suppl 2): p. S.35.
159. Schymik, B., Buerger, H., Kramer, A., et al., *Is there 'progression through grade' in ductal invasive breast cancer?* Breast Cancer Res Treat, 2012. 135(3): p. 693-703.
160. Natrajan, R., Lambros, M.B., Geyer, F.C., et al., *Loss of 16q in high grade breast cancer is associated with estrogen receptor status: Evidence for progression in*

- tumors with a luminal phenotype?* Genes Chromosomes Cancer, 2009. 48(4): p. 351-65.
161. Wagener, C. and Müller, O., *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3rd ed 2009, Stuttgart Thieme. 317ff.
 162. Pouyssegur, J., Dayan, F. and Mazure, N.M., *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. Nature, 2006. 441(7092): p. 437-43.
 163. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(10): p. 721-32.
 164. Majumder, P.K., Febbo, P.G., Bikoff, R., et al., *mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways*. Nat Med, 2004. 10(6): p. 594-601.
 165. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z.M., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev, 2000. 14(1): p. 34-44.
 166. Shapochka, D.O., Zaletok, S.P. and Gnidyuk, M.I., *Relationship between NF-kappaB, ER, PR, Her2/neu, Ki67, p53 expression in human breast cancer*. Exp Oncol, 2012. 34(4): p. 358-63.
 167. Lim, W., Park, Y., Cho, J., et al., *Estrogen receptor beta inhibits transcriptional activity of hypoxia inducible factor-1 through the downregulation of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator*. Breast Cancer Res, 2011. 13(2): p. R32.
 168. Lim, W., Cho, J., Kwon, H.Y., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha activates and is inhibited by unoccupied estrogen receptor beta*. FEBS Lett, 2009. 583(8): p. 1314-8.
 169. Loboda, A., Jozkowicz, A. and Dulak, J., *HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical*. Mol Cells, 2010. 29(5): p. 435-42.
 170. Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., et al., *A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(9): p. 4273-8.
 171. Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., et al., *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages*. Am J Pathol, 2000. 157(2): p. 411-21.
 172. Schindl, M., Schoppmann, S.F., Samonigg, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer*. Clin Cancer Res, 2002. 8(6): p. 1831-7.

173. Yang, Q.C., Zeng, B.F., Dong, Y., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome*. Jpn J Clin Oncol, 2007. 37(2): p. 127-34.
174. Keith, B., Johnson, R.S. and Simon, M.C., *HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression*. Nat Rev Cancer, 2012. 12(1): p. 9-22.
175. Vleugel, M.M., Shvarts, D., van der Wall, E., et al., *p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer*. Hum Pathol, 2006. 37(8): p. 1085-92.
176. Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C.F., et al., *Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis*. J Natl Cancer Inst, 2001. 93(4): p. 309-14.
177. Ryu, K., Park, C. and Lee, Y., *Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogen receptor alpha gene in human breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. 407(4): p. 831-6.
178. Kimbro, K.S. and Simons, J.W., *Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2006. 13(3): p. 739-49.
179. van der Groep, P., Bouter, A., Menko, F.H., et al., *High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. 111(3): p. 475-80.
180. Kyndi, M., Sorensen, F.B., Knudsen, H., et al., *Tissue microarrays compared with whole sections and biochemical analyses. A subgroup analysis of DBCG 82 b&c*. Acta Oncol, 2008. 47(4): p. 591-9.
181. Hyseni, A., van der Groep, P., van der Wall, E., et al., *Subcellular FIH-1 expression patterns in invasive breast cancer in relation to HIF-1alpha expression*. Cell Oncol (Dordr), 2011. 34(6): p. 565-70.
182. Zheng, X., Linke, S., Dias, J.M., et al., *Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(9): p. 3368-73.
183. Blancher, C., Moore, J.W., Talks, K.L., et al., *Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines*. Cancer Res, 2000. 60(24): p. 7106-13.
184. Ratcliffe, P.J., *HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia?* J Clin Invest, 2007. 117(4): p. 862-5.
185. Charpin, C., Tavassoli, F., Secq, V., et al., *Validation of an immunohistochemical signature predictive of 8-year outcome for patients with breast carcinoma*. Int J Cancer, 2012. 131(3): p. E236-43.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ulli Voß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Bedeutung von HIF-1 alpha und ausgewählter assoziierter Regulatoren beim Mammakarzinom unter Berücksichtigung einer molekularen Tumorklassifikation und Anwendung der TMA-Technik] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Teilpublikation

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ulli Voß hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und Erstellung der klinisch-pathologischen Korrelationen.

Erarbeitung der klinischen Verläufe in einer Subgruppe des Gesamtkollektivs.

Lesen und Korrektur der Arbeit.

Publikation:

Schymik B, Buerger H, **Voss U**, Kraemer A, van der Groep P, Meinerz W, van Diest PJ, Korsching E.

Is there 'progression through grade' in ductal invasive breast cancer?

Breast Cancer Research and Treatment, 2012. 135(3): p. 693-703.

Epub 2012 Aug 12.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.- Doz. Dr. med. habil. Stefan Koch vom Institut für Pathologie in Bad Saarow, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die Korrektur der Arbeit.

Außerdem gilt auch ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Horst Bürger vom Institut für Pathologie in Paderborn/Höxter für die unermüdliche, intensive und umfassende Unterstützung während der gesamten Promotionszeit sowie bei der Korrektur der Arbeit.

Ein weiterer Dank richtet sich an Herrn Priv.- Doz. Dr. rer. nat. Eberhard Korsching vom Institut für Bioinformatik der Westfälischen Wilhelms Universität Münster für die biomathematische Permutationsanalyse der immunhistochemischen Daten.

Besonderer Dank gilt meiner Mutter Liane Voß, die sich während der gesamten Zeit liebevoll und aufmunternd um mich gekümmert hat.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinem Vater Dr. Wolfgang Voß, der sich jederzeit allen meinen Fragen gestellt hat, und bei der Durchsicht der Arbeit geholfen hat.

Danken möchte ich unter anderem auch Herrn Dr. med. Lars-Immo Krämer für seine Hilfe bei allen Computerfragen.