

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

DISSERTATION

Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von
Zellzyklusproteinen in verschiedenen Subgruppen des invasiven
Mammakarzinoms

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anika Krämer

aus Köln

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	2
1. EINLEITUNG	3
1.1 DEFINITION.....	3
1.2 EPIDEMIOLOGIE	4
1.3 ÄTIOLOGIE/ RISIKOFAKTOREN	4
1.4 PATHOLOGIE	6
1.4.1 Präneoplasien des Mammakarzinoms.....	6
1.4.2 Invasive Mammakarzinome	8
1.5 DIAGNOSTIK	9
1.5.1 Klinische Diagnostik	9
1.5.2 Bildgebende Diagnostik.....	10
1.5.3 Interventionelle Diagnostik	11
1.6 THERAPIE	12
1.6.1 Operative Therapie.....	12
1.6.2 Strahlentherapie	12
1.6.3 Systemische Therapie	13
1.7 PROGNOTISCHE UND PRÄDIKTIVE FAKTOREN.....	13
1.7.1 Klinisch morphologische Faktoren.....	13
1.7.2 Molekularbiologische Faktoren.....	16
1.8 MOLEKULARBIOLOGIE UND ZELLZYKLUS.....	19
1.8.1 Zellzykluskontrollsystem.....	20
1.8.2 Steuerung des Zellzykluskontrollsystems.....	20
1.8.3 Kontrolle der Cdk-Aktivität durch hemmende Proteine	21
2. FRAGESTELLUNG UND ZIELE	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 UNTERSUCHUNG ZUR EXPRESSION AUSGEWÄHLTER TUMORMARKER IM GEWEBE DES INVASIVEN MAMMAKARZINOMS	23
3.1.1 Überblick über die verwendeten Zellzyklusproteine.....	23
3.1.2 Die Tissue Microarray Technik	25
3.1.3 Tumorprobenkollektiv	26

3.1.4 Erstellung der speziellen Tissue Microarrays	28
3.1.5 Allgemeines Prinzip der immunhistochemischen Färbung	28
3.1.6 Immunhistochemisches Färbeprotokoll der Schnittpräparate	30
3.1.7 Übersicht über das angewendete Verfahren	33
3.1.8 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	34
3.1.9 Statistische Auswertung	36
4. ERGEBNISSE	37
4.1 HÄUFIGKEITSTABELLE ZUR VERTEILUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBEINTENSITÄTEN	37
4.2 KLINISCH-MORPHOLOGISCHE KORRELATION	38
4.3 TABELLE ZUR KORRELATION DER UNTERSUCHTEN PARAMETER UNTEREINANDER	38
4.4 ÜBERLEBENSKURVEN NACH KAPLAN-MEIER	40
4.4.1 Bcl2-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier	40
4.4.2 p16-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier	40
4.4.3 p21-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier	40
4.4.4 CyclinD1-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier	44
4.4.5 p53-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier	44
4.4.6 p27-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier	44
4.5 PERMUTATIONSTESTUNG	48
4.5.1 Korrelation der Kandidatenmarker zum Tumorgrad	48
4.5.2 Korrelation der Kandidatenmarker zum Tumorgrad im Östrogenrezeptor-positiven Kollektiv	49
4.5.3 Korrelation der Kandidatenmarker zum intrinsischen Subtyp	50
4.6 MIKROSKOPISCHE BILDER DER IMMUNFÄRBUNGEN	51
5. DISKUSSION	57
6. SCHRIFTENVERZEICHNIS	69
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	81
LEBENS LAUF	82
TEILPUBLIKATION	83
DANKSAGUNG	84

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9Ethylcarbazol
ALH	atypische lobuläre Hyperplasie
BRCA1	Breast Cancer Gen 1
BRCA2	Breast Cancer Gen 2
CCL	Cylindercelllesion
CDK	cyclin-dependent-kinase
CISH	Chromogene-in-situ-Hybridisierung
CKI	cyclin-dependent-kinase-inhibitor
DCIS	duktales Carcinoma in situ
dest.	destillata
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Östrogenrezeptor
FEA	flache epitheliale Atypie
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
HPF	High power field
IARC	International Agency for Research on Cancer
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LN	Lobuläre Neoplasie
LSAB	Labelled-Strept-Avidin-Biotin
MAI	mitotischer Aktivitätsindex
NOS	not otherwise specified
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonucleic acid
TDLE	terminale duktulo-lobuläre Einheit
TGF- α	Transforming-Growth-Factor alpha
TMA	Tissue Microarray Technik
TNM	Tumordurchmesser-Lymphknotenstatus(Nodus)-FernMetastasen
TP	Tumorprotein
UDH	Usual ductal Hyperplasia
UICC	Union International Contre le Cancer
WHO	World Health Organisation
ZZKS	Zellzykluskontrollsystem

Zusammenfassung

Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Zellzyklusproteinen in verschiedenen Subgruppen des invasiven Mammakarzinoms

Anika Krämer

Das invasive Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau mit einer immer noch hohen Sterblichkeitsrate. Trotz einer Vielzahl von Studien sind die genauen Abläufe zur Progression und Prognose des Mammakarzinoms immer noch in weiten Teilen unklar und bedürfen einer intensiven Erforschung. Die Tumorzellproliferation gilt als zentraler Prognosefaktor des Mammakarzinoms, und eine vermehrte Tumorzellproliferation stellt das Endresultat einer Störung im Ablauf des Zellzyklus dar. Der Zellzyklus wiederum wird von einem Netzwerk aus Proteinen reguliert das den regelrechten Ablauf eines jeden Zellzyklus kontrolliert, das sogenannte „Zellzykluskontrollsystem“. Die vorliegende Studie untersucht die prognostische Relevanz der immunhistochemischen Expression der Zellzyklusproteine p16, p21, p27, p53, Bcl-2 und CyclinD1 im invasiven Mammakarzinom sowie die Korrelation dieser Parameter zu bereits etablierten klinisch-pathologischen Parametern als auch den molekularen Subtypen.

In einer retrospektiven Studie wurden 865 Gewebeproben von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom aus dem Archiv des Instituts für Pathologie in Paderborn / Höxter mittels immunhistochemischer Verfahren und unter Zuhilfenahme der Tissue Microarray Technik untersucht. Die Expression der oben genannten Zellzyklusproteine wurde lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Evaluation der Zusammenhänge zwischen Antikörperexpression und klinischen Parametern erfolgte statistisch mittels Rank-Korrelation, Chi²-Tests und einer Permutationsanalyse. Die Überlebenskurven wurden an einem Patientenkollektiv von 465 primären Mammakarzinom-Fällen mittels Kaplan-Meier-Kurven erstellt.

In der Überlebensanalyse konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression von p53, Bcl-2 und p21 und der Gesamt-Überlebenswahrscheinlichkeit im Patientenkollektiv gefunden werden. Die prognostische Überlebenswahrscheinlichkeit bei der Expression von p16 unterschied sich signifikant in prä- und postmenopausalen Mammakarzinomen. Die Expression von p27 und CyclinD1 zeigte keine statistische Signifikanz. Die biomathematische Analyse ergab eindeutige Unterschiede im Expressionsverhalten der sechs Faktoren in ihrer Gesamtheit in den definierten molekularen Brustkrebssubtypen.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die untersuchten Parameter p53, Bcl-2 und p21 eine prognostische Relevanz beim invasiven Mammakarzinom haben. Des Weiteren ergaben die biomathematischen Analysen Hinweise auf die Existenz unterschiedlicher Regelkreisläufe in den verschiedenen molekularen Subtypen des invasiven Mammakarzinoms. Die Ergebnisse stützen somit das Postulat unabhängiger Entstehungswege der verschiedenen Mammakarzinom-Subtypen. Weitere Studien werden notwendig sein, um die prognostische Relevanz der molekularen Parameter in den verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms zu definieren.

Abstract

Immunohistochemical studies of cell cycle-associated protein expression in different subtypes of invasive breast cancer

Anika Krämer

Invasive breast cancer is the most frequent cancer in women, with a mortality rate still being high. Although a multitude of studies have been performed, the detailed chronological progression and prognosis of breast cancer remain in large parts unclear, and further research is necessary. Cancer cell proliferation is accounted for as the central prognostic factor in breast cancer, and an increased cell proliferation is thought to be the final result of a disruption of the cell cycle sequence. This regular sequence of every cell cycle of human cells is controlled by a complex network of regulating proteins commonly called the 'cell cycle control system'. The present study seeks to investigate the prognostic relevance of the immunohistochemical expression of the cell cycle proteins p21, p27, p16, p53, Bcl-2 and CyclinD1 in invasive breast cancer as well as the correlation between these parameters and already established clinico-pathological parameters and molecular determined breast cancer subtypes.

In a retrospective study 865 tissue samples from the archive of the institute of pathology in Paderborn/Höxter from patients with primary breast cancer were analyzed immunohistochemically using tissue microarrays. Expression of the cell cycle-associated proteins was analyzed by light microscopy. The statistical analysis of the relation between antibody expression and clinical parameters was done by rank-correlation, Chi2-tests and permutation tests. Survival analysis was done using Kaplan-Meier curves in a patient cohort of 465 patients with primary breast cancer.

The survival analysis showed a statistically significant correlation between the expression of p53, Bcl-2 and p21 and the overall survival rate of the sample patients. In the case of expression of p16 the prognostic survival probability was significantly different in pre- and postmenopausal breast cancers. The expression of p27 and CyclinD1 showed no statistical significance. Biomathematical analysis revealed definite differences in the expression behavior of the 6 factors in their entirety in the defined molecular breast cancer subtypes.

The results of this study suggest a prognostic relevance of the parameters p53, Bcl-2 and p21 in invasive breast cancer. Results of the biomathematical analysis hint towards the existence of distinct cell cycle control mechanisms in the different molecular subtypes of invasive breast cancer. These results thus support the hypothesis of independent development processes of the various breast cancer subtypes. Further studies are necessary to define the prognostic relevance of the molecular parameters in the various subtypes of breast cancer.

1. Einleitung

1.1 Definition

Ein Karzinom ist ein maligner Tumor der sich von Zellen epithelialen Ursprungs ableitet. Histopathologisch lassen sich maligne epitheliale Neoplasien in Karzinome des Deckepithels, des exokrinen Drüsenepithels, des diffusen oder organgebundenen endokrinen Epithels und solche mit gemischter Differenzierung unterscheiden [1]. Das Mammakarzinom leitet sich, als maligne Neoplasie der Brustdrüse, aus Zellen des Brustdrüsenparenchyms ab. Histologisch zeigt die Brustdrüse einen segmental strukturierten lobulären Aufbau. Jeweils mehrere Acini bilden einen Lobulus. Die Lobuli münden in ein Gangsystem (Ductus), welches bis zur Mamille reicht. Die Unterteilung der Karzinome erfolgt derzeit nach ihrer lichtmikroskopisch phänotypischen Differenzierung. Entstehungsort fast aller Mammakarzinome ist die terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLE). Phänotypisch handelt es sich ganz überwiegend um duktales Mammakarzinome [2]. Die Aggressivität des Mammakarzinoms wird maßgeblich durch den histologischen Malignitätsgrad bestimmt [3].

Die aktuelle WHO-Klassifikation (2012) der Mammatumoren grenzt invasive (infiltrativ-destruktiv wachsende) von den nicht-invasiven (in situ) Karzinomen ab. Bei den nicht-invasiven (in situ) Karzinomen wird das duktales Carcinoma in situ (DCIS) mit einer Häufigkeit von ca. 90-95% gegenüber dem lobulären Carcinoma in situ (LCIS) mit nur 5-10% der Fälle beobachtet [4]. Die invasiven Mammakarzinome werden pathomorphologisch in Subgruppen eingeteilt. Das invasive duktales Karzinom NOS (not otherwise specified) stellt hierbei den häufigsten Tumortyp der invasiven Mammakarzinome dar (60-75%), danach folgt das invasive lobuläre Karzinom (10-15%). Die restlichen Karzinomsubtypen sind selten und zeigen spezielle Differenzierungen. Hierbei können das medulläre, das muzinöse, das tubuläre und das papilläre Karzinom genannt werden.

1.2 Epidemiologie

Das Karzinom der Brustdrüse ist mit weltweit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste maligne Neoplasie der Frau [5]. Die IARC (International Agency for Research on Cancer) listet für das Jahr 2008 1.384.155 Neuerkrankungen sowie 458.503 Todesfälle weltweit auf [6]. Somit stellt es über 23% aller Karzinome der Frau und rangiert damit vor Darmkrebs, Tumoren des Gebärmutterhalses und dem Bronchialkarzinom auf Platz eins der Krebsinzidenzen [7, 8]. Frauen in Entwicklungsländern, wie Afrika und Süd/Ost-Asien, haben mit einer Wahrscheinlichkeit von 2% ein um zwei Drittel niedrigeres Risiko bis zu ihrem 75. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken im Vergleich zur weiblichen Bevölkerung westlicher Industrienationen, wie Europa, Nordamerika und Australien. Die Gründe hierfür werden in den Lebensgewohnheiten, vor allem dem kalorienreichen Essen und der fehlenden Bewegung gesehen [7]. Deutschland liegt mit einer Inzidenz von rund 58.000 Neuerkrankungen und etwas über 17.000 Sterbefällen im Jahr 2006 im internationalen Vergleich im mittleren Drittel [9].

Statistisch gesehen erkrankt in Deutschland jede achte bis zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei rund 64 Jahren [10]. Während bei der Brustkrebsinzidenz seit 1980 ein stetiger Anstieg zu verzeichnen ist, zeigt sich bei der Mortalität eine relative Konstanz. Seit Mitte der neunziger Jahre ist sogar ein leichter Rückgang zu verzeichnen [9].

Die Gründe hierfür sind die verbesserten Möglichkeiten zur Früherkennung kleiner Tumoren durch mittlerweile flächendeckende Mammographie-Screening Programme und daraus resultierend einer relativen Vermehrung von Tumoren mit günstigerer Prognose [11].

Des Weiteren sind Fortschritte vor allem in der adjuvanten systemischen Therapie des Mammakarzinoms ausschlaggebend für die epidemiologischen Entwicklungen [12].

1.3 Ätiologie/ Risikofaktoren

Die Ursache der Entstehung eines Mammakarzinoms ist weitgehend unbekannt. Man geht jedoch von einem multifaktoriellen Geschehen aus [13].

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass verschiedene Faktoren die Entstehung begünstigen können. Das höchste individuelle Risiko einer Erkrankung stellt die familiäre Vorbelastung dar. Eine positive Familienanamnese, bei zwei oder mehr Familienmitgliedern unter 50 Jahren, oder 3 bzw. mehr Erkrankten jeglichen Alters, erhöht das individuelle Risiko um mehr als das Vierfache [14]. Die genetische Prädisposition wird jedoch nur bei 5-10% des Patientenkollektivs als Ursache gesehen. Bei der Hälfte dieser Patienten wiederum liegt eine Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA 1 und BRCA 2 vor [14]. Die Tumorsuppressorgene TP 53 und PTEN werden für weitere 5-10 % der genetischen Erkrankungen verantwortlich gemacht. Die restlichen 40-45% der erblich bedingten Mammakarzinome sind vermutlich auf weitere, noch nicht identifizierte Genmutationen zurückzuführen [14].

Studien zeigen eine generelle Korrelation zwischen einer erhöhten bzw. verlängerten Exposition gegenüber endogenen Östrogenen und einem Anstieg des Erkrankungsrisikos [15-17]. Der für diesen Anstieg verantwortliche Wirkungsmechanismus der Östrogene ist noch nicht vollständig geklärt. Östrogene haben unter anderem eine Rolle als Tumorpromotoren. Sie binden an die spezifischen Östrogenrezeptoren und induzieren so die Transkription von Proliferationsgenen. Jeder weitere DNA-Syntheszyklus potenziert das Risiko spontaner Replikationsfehler. Da die Reparaturmechanismen bei rasch proliferierenden Zellen reduziert ablaufen, kann eine bestimmte Zahl relevanter Mutationen zur malignen Transformation führen [18-22].

Potenziell gilt jegliche Steigerung der Östrogenbilanz als Risiko. Hierunter zählen [23, 24]:

- eine frühe Menarche (<12 Jahre)
- eine späte Menopause (>50 Jahre)
- eine hohe Dichte des Brustdrüsenkörpers
- eine postmenopausale Östrogen-Gestagen kombinierte Hormontherapie
- eine Nulliparität bzw. eine späte Erstschwangerschaft (>35 Jahre)

Neben der Neuentstehung von Tumoren besteht hierbei ebenso die Gefahr der Manifestation karzinogener Vorstufen zu invasiven Karzinomen. Diese wird induziert durch die mitogene Wirkung der Östrogene.

Ein erhöhtes Risiko stellen somit folgende Befunde dar [23]:

- die epitheliale Hyperplasie
- die atypische Hyperplasie
- vorausgegangene Ovarial-, Endometrium- oder Kolonkarzinome
- der Zustand nach bereits therapiertem Mammakarzinom

Adipositas erhöht das Erkrankungsrisiko überwiegend postmenopausal [25]. Die pathogenetische Ursache wird hierbei auf die im Fettgewebe stattfindende vermehrte Aromatisierung androgener Vorstufen zu Östrogenen gesehen [26, 27]. Ein Einfluss von Genussmitteln wie Tabak- oder Alkohol auf die Entwicklung eines Mammakarzinoms scheint noch nicht hinreichend geklärt zu sein. Während einige Studien eine Korrelation zwischen Alkoholkonsum und Risikoanstieg durchaus belegen, ist der Einfluss des Tabakkonsums auf das Brustkrebsrisiko umstritten [28-31]. Bei einer Kombination aus positiver Familienanamnese und exogenen Risikofaktoren potenziert sich das individuelle Risiko, sodass diesem Patientenkollektiv zu einer verantwortlichen Lebensführung geraten werden muss, um das eigene Risiko so gering wie möglich zu halten.

1.4 Pathologie

1.4.1 Präneoplasien des Mammakarzinoms

Flache epitheliale Atypie

Bei der flachen epithelialen Atypie (FEA) ist das sekretorische Epithel in den terminalen duktulo-lobulären Einheiten durch ein zylinderförmiges Epithel mit minimalen Atypien ersetzt [32]. Das Mammakarzinomrisiko ist bei der FEA sehr leicht erhöht [33].

Atypische duktale Hyperplasie

Die atypische duktale Hyperplasie (ADH) ist eine fokale, monomorphe (low grade) Proliferation neoplastischer Zellen des dukталen Typs mit Begrenzung auf die terminale duktulo-lobuläre Einheit. Sie ist qualitativ nicht von einem low grade DCIS zu unterscheiden, ist aber im Gegensatz zum low grade dukталen Carcinoma in situ auf die Drüsenläppchen begrenzt. Die Definition der ADH ist in der Literatur nicht einheitlich [34].

Die ADH geht mit einem moderat gesteigerten Krebsrisiko um das Vier- bis Fünffache einher [35, 36].

Lobuläre Neoplasie

Die lobuläre Neoplasie (LN) fasst die auch heute noch gebräuchlichen Bezeichnungen atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) und lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) zusammen [37]. Nach der aktuellen WHO-Klassifikation umfasst die LN das komplette Spektrum atypischer diskohäsiver Epithelproliferationen, die überwiegend auf die terminalen duktulo-lobulären Einheiten begrenzt sind und gelegentlich auch größere Milchgänge einbeziehen können [38]. In den meisten Fällen erfolgt die Diagnose LN als Zufallsbefund, da letztere in aller Regel keine klinischen Symptome hervorruft, sehr selten palpabel ist und nur in wenigen Fällen zu erkennbaren Veränderungen im mammographischen Bild führt [39, 40].

Auffällig ist die statistische Häufigkeit des Auftretens der Multizentrität (60-90%) und Bilateralität (35-59%) der lobulären Neoplasie [41]. Die lobulären Neoplasien werden als Indikatorläsionen und auch als nicht-obligatorische Vorläuferläsionen für invasiv lobuläre oder invasiv duktales Mammakarzinome angesehen. Neuere morphologische und molekularpathologische Studien deuten darauf hin, dass eine ausschließliche Einstufung als Risikoläsion unzureichend wäre, da diese Veränderungen auch als eine direkte Vorläuferläsion invasiver Karzinome auftreten können [42-45]. Das relative Mammakarzinomrisiko erhöht sich bei diagnostizierter LN gegenüber vergleichbaren Altersgruppen um das Fünf- bis Zwölffache. Bei positiver Familienanamnese steigt der Faktor sogar um das 13-fache an [46].

Duktales Carcinoma in situ

Das DCIS ist keine einheitliche Erkrankung, sondern repräsentiert eine heterogene Gruppe nicht invasiver neoplastischer Läsionen mit duktaler Zelldifferenzierung und differentem klinischen Erscheinungsbild, morphologischen Phänotyp und biologischen Verhalten [47-50].

Diese morphologische und prognostische Heterogenität des DCIS mit variierendem malignem Potential und daraus resultierenden Unterschieden hinsichtlich Prognose, Rezidivhäufigkeit und Progression der Veränderung macht es schwierig, eine klare einheitliche und international akzeptierte Behandlungsstrategie für das DCIS

festzulegen. In der Vergangenheit wurden verschiedene Klassifikationen etabliert, die sich auf der histologischen Architektur, dem Kerngrading oder dem Vorhandensein von Komedo-Nekrosen begründen oder diese Parameter kombinieren. Die Bewertung des Kerngrads scheint hierbei am besten reproduzierbar, sowie prognostisch am aussagekräftigsten zu sein und wird daher in der aktuellen WHO-Klassifikation als Graduierungsschema empfohlen [51].

Das DCIS gilt als nicht obligate Vorläuferläsion des invasiven Mammakarzinoms. Es zeigt durchschnittlich in 43% der Fälle eine Transformation in eine invasive Karzinomform und ist somit als präkanzeröse Läsion einzuschätzen. Bis zu 85% der DCIS Diagnosen werden über mammographische Korrelate von Mikrokalzifikationen gestellt, so dass die Inzidenz dieser Veränderung eine starke Progression seit Einführung des Mammographie-Screenings aufweist [52, 53]. Durchschnittlich 20-30% aller im Screening detektierten Brustkrebsfälle sind einem DCIS zuzuordnen [54]. Das relative Risiko eines Patienten mit DCIS für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms ist gegenüber einem Gesunden um das Acht- bis Elffache erhöht [55].

1.4.2 Invasive Mammakarzinome

Die histologisch-phänotypische Einteilung der invasiven Mammakarzinome richtet sich nach der aktuellen WHO-Klassifikation 2012 (Tab.1). Die jeweiligen histologischen Typen unterscheiden sich in ihrer Aggressivität und in ihrem Ausbreitungsmuster. Einige Typen zeigen einen prognostisch günstigeren Verlauf, wie zum Beispiel das tubuläre, das kribriforme, das muzinöse oder auch das adenoid-zystische Mammakarzinom [56].

Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified (NOS)
Invasives lobuläres Karzinom
Tubuläres Karzinom
Kribriiformes Karzinom
Karzinom mit medullären Merkmalen
Muzinöses Karzinom und Karzinom mit Siegelringzellendifferenzierung
Neuroendokrines Karzinom
Invasives papilläres Karzinom
Invasives mikropapilläres Karzinom
Karzinom mit apokriner Differenzierung
Metaplastisches Karzinom
Lipidreiches Karzinom
Sekretorisches Karzinom
Onkozytäres Karzinom
Adenoid-zystisches Karzinom
Mukoepidermoidkarzinom
Polymorphes Karzinom
Azinuszell-Karzinom
Glykogenreiches hellzelliges Karzinom
Sebaziöses Karzinom
Inflammatorisches Karzinom
Bilaterales und nicht synchrones Karzinom
Speicheldrüsen/Hauptanhangsdrüsen-Typ Tumoren

Tab.1: Klassifikation der Mammakarzinome nach der WHO (2012) [7]

1.5 Diagnostik

1.5.1 Klinische Diagnostik

Die regelmäßige Inspektion und Palpation der Brust sowie der axillären Lymphabflussgebiete wird ab dem 30. Lebensjahr im Rahmen des gesetzlichen Brustkrebs-Früherkennungsprogramms des Bundesministeriums für Gesundheit empfohlen [57].

Der obere äußere Quadrant des Brustdrüsengewebes, mit direkter Anbindung an die axillären Lymphbahnen zeigt die größte Drüsendichte und ist als bevorzugte Lokalisation in rund 55% der Brustkrebsfälle betroffen. Mit einer jeweiligen Wahrscheinlichkeit von 10-15% finden sich positive Befunde im inneren oberen und

äußeren unteren Quadranten sowie retromamillär. Lediglich in 5% der Fälle liegt ein Brustkrebs im inneren unteren Quadranten vor [58].

1.5.2 Bildgebende Diagnostik

Mammographie

Die Mammographie, als wichtigstes Instrument moderner Brustkrebsdiagnostik, führt als einziges Früherkennungsverfahren nachweisbar zu einer Senkung der Brustkrebsmortalität [59].

Hierbei unterscheidet man zwei grundlegende diagnostische Intentionen:

- Das Screeningverfahren als Vorsorgeuntersuchung in einem symptomfreien Kollektiv
- Die Mammographie mit kurativer Intention bei klinisch auffälligen Mammabefunden

Grundsätzlich basiert die mammographische Befundung auf dem Detektieren von asymmetrischen suspekten Verdichtungen und/oder gruppierten suspekten Mikroverkalkungen. Die Befundung und Beurteilung der mammographischen Diagnostik orientiert sich am standardisierten BI-RADS-Katalog („Breast Imaging-Reporting and Data System“). Dieser unterscheidet sechs Kategorien, die jeweils mit einer Malignomwahrscheinlichkeit von 0-100% verbunden sind und eine Empfehlung zur weiteren Abklärung beinhalten [60].

Sonographie

Die Ultraschalluntersuchung erfolgt nicht routinemäßig, sondern wird als additives Verfahren eingesetzt, um unklare Befunde der mammographischen Diagnostik abzuklären. Die sonographische Diagnostik ist stark geräte- und untersucherabhängig und weist daher, verglichen mit der Mammographie, eine relativ niedrige Sensitivität auf. Lediglich 20% der mammographisch detektierten Mikroverkalkungen sind auch sonographisch erfassbar [61].

Die Befundung orientiert sich an standardisierten Kriterien und wird dann analog den BI-RADS-Kategorien eingeteilt. Bestätigt der sonographische Befund den Primärverdacht, folgt meist eine Stanzbiopsie zur histologischen Abklärung [62].

Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wird als Ergänzungsdiagnostik bei bleibenden Unklarheiten nach Ausschöpfung aller anderen diagnostischen Möglichkeiten eingesetzt. Grundlage für die MRT-Diagnostik bildet das unterschiedliche Kontrastmittel-Aufnahmeverhalten benigner und maligner Läsionen. Bedingt durch die erhöhte Gefäßdichte und Gefäßwandpermeabilität maligner Läsionen wird das Kontrastmittel beschleunigt aufgenommen. Dieser Umstand kann in Form einer Signalintensitätskurve graphisch dargestellt werden [63]. Im Gegensatz zu den malignen Läsionen zeigen benigne Veränderungen wenig bis keine Kontrastmittelinteraktionen [64].

Das MRT stellt das sensitivste bildgebende Mammadiagnostikverfahren dar. Studien zufolge liegt die Sensitivität für die Entdeckung eines invasiven Karzinoms bei über 90% [65, 66]. Die Interpretation des MRT-Befundes ergibt jedoch nur im Zusammenhang mit den restlichen Befunden Sinn, da alleine gesehen die niedrige Spezifität des Verfahrens zu einer hohen Zahl falsch positiver Befunde führen würde [67].

1.5.3 Interventionelle Diagnostik

Zur Gewinnung von Tumormaterial zum Zwecke der diagnostischen Begutachtung haben sich drei unterschiedliche invasive Methoden etabliert:

- Die Feinnadelaspirationszytologie
- Die Stanzbiopsie
- Die Vakuumbiopsie

Als Standardmethode zur Abklärung unklarer Herdbefunde wird heute die Stanzbiopsie eingesetzt. Um die Treffsicherheit zu erhöhen, wird die Probeentnahme unter Zuhilfenahme bildgebender Methoden durchgeführt. Hierbei kommt der sonographisch gesteuerten Stanzbiopsie eine große Bedeutung zu. Da über 80% der Herdbefunde ein sonographisches Korrelat zeigen, bietet die sonographische Stanzbiopsie ein breites

Anwendungsspektrum. Sie ermöglicht zudem eine kontinuierliche Bilddarstellung während des Biopsievorganges, ist zudem kostengünstig und nicht strahlenbelastend. Die Ergebnisse minimalinvasiver bioptischer Verfahren erzielen hohe diagnostische Sicherheiten (Sensitivität von 92-98% bei einer Spezifität von bis zu 100%) [68]. Allerdings muss das histologische Ergebnis des bioptischen Eingriffes mit den bildgebenden Befunden korrelieren. Lediglich die interdisziplinäre Auswertung aller Befundparameter erscheint sinnvoll und kann helfen, Fehleinschätzungen und potentielle Diagnoseverzögerungen zu vermeiden [68].

1.6 Therapie

1.6.1 Operative Therapie

Das oberste Ziel der operativen Therapie des primären Mammakarzinoms ist die Entfernung des Tumors im Gesunden, die sogenannte „R0-Resektion“, zur Sicherung der lokalen Tumorkontrolle im Bereich der befallenen Brust- und Lymph-Abflusswege. Es konnte aufgezeigt werden, dass ein tumorfreier Schnittrand mit einer geringeren Rezidivrate einhergeht [69]. Eine Reduktion der Rezidivrate korreliert mit einer Verbesserung des Gesamtüberlebens und wird neben der Schnittrandfreiheit auch von multimodalen Therapieoptionen wie der systemischen und der radiologischen Therapie beeinflusst [70]. Das operative Therapiekonzept muss in eine interdisziplinäre Behandlungsstrategie integriert werden. Die weiter unten erwähnte pTNM-Einteilung (Tumorstadium) gibt wichtige prognostische Informationen zur Festlegung einer adjuvanten Therapieplanung [71].

1.6.2 Strahlentherapie

Eine postoperative perkutane Strahlentherapie senkt die Rezidivrate signifikant [70]. Die brusterhaltende operative Therapie (BET) mit nachfolgender Bestrahlung ist der alleinigen modifizierten radikalen Mastektomie äquivalent und als Standardtherapie etabliert [72].

1.6.3 Systemische Therapie

Als integraler Bestandteil des multimodalen Behandlungskonzeptes gilt auch die adjuvante Chemotherapie, auf die nur bei einigen Niedrig-Risiko Patienten verzichtet werden kann [73]. Die Entscheidung über kombinierte chemo-endokrine Therapiekonzepte oder sogar die alleinige endokrine Therapieführung muss individuell unter Berücksichtigung des jeweiligen Risikofaktorprofils getroffen werden [74].

1.7 Prognostische und prädiktive Faktoren

Die Bestimmung von Prognosefaktoren soll den prospektiven Krankheitsverlauf so individuell als möglich vorhersagen. Abweichend hiervon haben die prädiktiven Faktoren zum Ziel ein Therapieansprechen abzuschätzen.

1.7.1 Klinisch morphologische Faktoren

Nach der aktuellen S3-Richtlinie gibt es neben der histologischen Typisierung weitere klinisch relevante Parameter, die herangezogen werden sollten, um therapeutische Konsequenzen entsprechend international anerkannter Leitlinien ziehen zu können. Hierzu zählen: die Tumorgröße in metrischen Maßen (mm/cm), das Vorliegen weiterer Tumorherde, der Resektionsrandstatus (Angabe des Abstandes zum nächstgelegenen Resektionsrand in metrischen Maßen (mm/cm)), das Vorliegen einer peritumoralen Gefäßinvasion, die pTNM-Klassifikation, der Hormonrezeptorstatus, der HER-2-Status, sowie das standardisierte Grading [75].

Grading

Das heute international anerkannte Grading nach Elston und Ellis, erstmalig eingeführt von Bloom und Richardson im Jahre 1957, und 1991 von Elston und Ellis in modifizierter Form übernommen, erfolgt bei allen invasiven Mammakarzinomen (Tab.2) [76, 77].

Als Bewertungsgrundlage dienen die drei folgenden zytologisch/histologischen Beurteilungsparameter:

- Tubulusbildung
- Kernpleomorphie
- Mitoserate

Im Allgemeinen erfolgt das Grading der invasiven Mammakarzinome am primär formalinfixierten Gewebe nach folgendem Schema in drei Stufen:

Punkte	Tubulusbildung	Kernpolymorphie	Mitosen je HPF (Standard HPF*)
1	> 75%	gering	0 - 5/ 10 HPF
2	10-75%	mittelgradig	6 -11/ 10 HPF
3	< 10%	Stark	> 12/ 10 HPF
	Grading	Scoresumme	Bezeichnung
	G1	3-5	gut differenziert
	G2	6-7	mäßig differenziert
	G3	8-9	schlecht differenziert

Tab.2: Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom nach Elston und Ellis [78]

*HPF - normiert für Sehfeldgröße von 0,45mm (Sehfeldzahl 18/Obj. 40x)

Da eine enge Korrelation zwischen der Graduierung und verschiedenen Prognoseparametern wie Lymphknotenstatus, Rezidivrate, Rezeptorstatus und Überlebensrate besteht, hat das Grading eine hohe prognostische Aussagekraft [79, 80].

Tumorstadium

Das meist verwendete System zur Brustkrebs-Stadieneinteilung stellt die von der UICC (Union International contre le Cancer) veröffentlichte TNM-Klassifikation dar (Tab.3) [81]. Die TNM-Klassifikation berücksichtigt Informationen über den Tumordurchmesser (T), den Lymphknotenstatus (N), sowie das Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen (M). Die klinische TNM-Klassifikation gibt entscheidende Informationen zur Festlegung einer individuellen Therapieplanung. Die mit dem Präfix „p“ versehene pTNM-Klassifikation der Karzinome erfolgt posttherapeutisch am Operationspräparat anhand der pathologisch-anatomischen bzw. histopathologischen Befunde und kann als etablierter Prognoseparameter eingeordnet werden.

pT - Primärtumor	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
TiS	Carcinoma in situ
pTiS (DCIS)	duktales Carcinoma in situ
pTiS (LCIS)	lobuläres Carcinoma in situ
pTiS (Paget)	Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbaren Tumor
pT1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b	mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pT4a	mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	mit Ödem(einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut derselben Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pN - Regionale Lymphknoten	
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
pN0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1mic	Mikrometastase (größer als 0,2mm, aber nicht größer als 2mm in max. Ausdehnung)
pN1	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
pN1a	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten , zumindest eine größer als 2mm in max. Ausdehnung
pN1b	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n) die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
pN1c	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n), die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
pN2	Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen

pN2a	Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2mm in max. Ausdehnung
pN2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbarer(en), mikroskopisch nachweisbarer(en) Metastase(n) in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pN3a	Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 2mm in Ausdehnung) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastase(n) in klinisch erkennbarem(en) Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Sentinellymphknoten-Dissektion, aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pM-Fernmetastasen	
pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tab.3: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (7. Auflage 2009) [81]

1.7.2 Molekularbiologische Faktoren

Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren modulieren die Differenzierung zu normalem Brustdrüsengewebe. Liegt eine Dysfunktion der für die Wachstumsregulation verantwortlichen zellulären Mechanismen vor, kann es zur Tumorentstehung kommen [82].

HER-2/neu Rezeptorstatus

Die immunhistochemische Bestimmung des HER-2 Rezeptorstatus zählt mittlerweile zu den Routineuntersuchungen der Primärdiagnostik bei invasiven Mammakarzinomen.

Das HER-2 Onkogen ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert und codiert für den membranständigen Wachstumsfaktorrezeptor c-erb B2, welcher auf der Oberfläche regelrechter Brustepithelzellen in geringen Mengen exprimiert wird. Das c-erb B2-Gen gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR) und fungiert als transmembranöser Tyrosinkinase-Rezeptor. Durch Bindung eines Liganden an diesen Rezeptor wird die Tyrosinkinase aktiviert. Diese setzt wiederum intrazelluläre Signalübertragungen in Gang, welche Wachstum, Differenzierung und Überleben der Zelle steuern. Eine HER-2 Überexpression oder Punktmutation kann über die vermehrte Stimulation der Zellproliferation und einer übermäßigen Apoptosehemmung die onkogene Aktivierung der Zelle zur Folge haben [83]. Studien zeigen, dass eine Überexpression des HER-2-Gens in rund 15-20% der primären Mammakarzinome vorliegt [84]. Aus prognostischer Sicht korreliert eine HER2-Überexpression mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall sowie einer Downregulation des Hormonrezeptorstatus, welches die Prognose verschlechtert [85, 86]. Als prädiktiver Parameter gibt der HER-2/neu Status Auskunft über die therapeutische Ansprechbarkeit auf den humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin) oder den Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (Tyverb). Trastuzumab wird im Zuge einer Antikörpertherapie bei HER-2 positiven Befunden eingesetzt, um das Wachstum HER-2/neu überexprimierender Mammakarzinomzellen zu hemmen [87].

Hormonrezeptorstatus

Die Bestimmung von Östrogen- (ER) und Progesteron-Rezeptoren (PR) zählt zu den obligatorisch durchzuführenden diagnostischen Verfahren. Die Bestimmung sollte immunhistochemisch und wenn möglich bereits präoperativ in der Stanzbiopsie erfolgen [59]. Zur Grenzwertdefinition sinnvoller Therapieeinsätze sollte jeweils der Prozentsatz positiver Tumorzellkerne bestimmt werden [59].

Die prognostische Aussagekraft ist hierbei als eher gering einzuschätzen und nimmt des Weiteren noch mit der Dauer des Nachbeobachtungszeitraumes ab [88]. Aus therapeutischer Sicht hingegen stellen sie den stärksten prädiktiven Parameter zur Messung des Ansprechens adjuvanter endokriner Therapieverfahren [88]. Steroidrezeptor-positive Tumoren sprechen signifikant besser auf endokrine Therapieverfahren an, während rezeptornegative Tumoren scheinbar eine bessere Ansprechbarkeit auf primäre Chemotherapien zeigen [89]. Die Bindung von Östrogen

an einen membranständigen Östrogenrezeptor (ER) setzt eine Signalkaskade in Gang, welche das Zellwachstum und die Proliferation stimuliert und die Apoptose hemmt [90]. Die Bindung an einen nicht membranständigen Östrogenrezeptor führt zur Translokation dieses Rezeptors in den Zellkern. Im Nukleus wird dann die Synthese von Proteinen angeregt, die Wachstum und Proliferation der Zelle stimulieren. Das Ziel endokriner Therapiestrategien ist es, über eine Blockade oder Synthesehemmung der Östrogenrezeptoren (Tamoxifen, Fulvestrant) bzw. einer Senkung des Plasma-Östrogenspiegels (GnRH Analoga, Aromatasehemmer) die Östrogenrezeptoraktivität zu senken und somit letztendlich die hormoninduzierte Tumorzellproliferation zu reduzieren [91].-

Urokinase-Plaminogen-Aktivator und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1

Der Urokinase-Plaminogen-Aktivator und der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (uPA/PAI-1) haben sich als Prognose und Prädiktionsfaktoren bei Patientinnen mit nodal negativen Mammakarzinomen auch im klinischen Alltag etabliert. Prospektive Studien haben die Validität und Standardisierung des Faktors bestätigt [92]. Erhöhte Konzentrationen des Faktors korrelieren eher mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf, während niedrige Konzentrationen einen günstigeren Verlauf zeigen.

Auch hinsichtlich der prädiktiven Relevanz des Faktors zeigen sich deutliche Unterschiede. Während Patientinnen mit erhöhter uPA/PAI-1-Expression eine Chemotherapie benötigen und von dieser profitieren, zeigen Patientinnen mit niedrigen Gewebekonzentrationen (nodal-negative Patientinnen mit G2-Tumoren) ein sehr viel niedrigeres Rezidivrisiko und benötigen auch keine adjuvante Chemotherapie.

Für die Bestimmung der uPA und PAI-1-Werte benötigt man Frischgewebe aus dem Tumor, welches entweder über eine Stanze vor der OP entnommen oder über eine Gewebeentnahme während der OP gewonnen wird.

Tumorzellproliferation

In der einfachsten Form kann die Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels der einfachen Zählung von Mitosefiguren in einem Mammakarzinom erfolgen und ist dann ein obligater Bestandteil des aktuellen Tumorgradings. Andere Autoren beschrieben alternativ den Mitotischen Aktivitätsindex (MAI), welcher ebenfalls auf der Auszählung

einer absoluten Mitosezahl in einem definierten Areal beruht [93]. Frühere Verfahren beruhten auf durchflusszytometrischen Ansätzen mit der Bestimmung des DNA-Gehaltes und der daraus resultierenden Ableitung der Proliferationsfraktion [94]. Mit der breiten Anwendung der Immunhistochemie in der Routinediagnostik konnte dann mit spezifischen Antikörpern gegen Ki-67 (MiB 1) ein sehr gängiges, jedoch noch nicht allgemein anerkanntes Verfahren etabliert werden [95]. Speziell technische Unterschiede in der Materialaufarbeitung und der Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse lassen einen weitläufigen Gebrauch dieses Verfahrens in vielen Fällen als noch nicht vollständig evaluiert erscheinen [96].

Ungeachtet der verschiedenen, oben dargestellten technischen Ansätze ist jedoch die Tumorzellproliferation Ausdruck einer tiefen Störung im Ablauf des Zellzyklus einer Tumorzelle.

1.8 Molekularbiologie und Zellzyklus

Der Zellzyklus bildet die Basis der Vermehrung aller Lebewesen. Der ihm zugrunde liegende Mechanismus versteht sich als geordnete Abfolge von Ereignissen, die in der Zweiteilung der Zelle resultieren. Funktionelles Grundprinzip stellt hierbei die identische Verdoppelung der in Chromosomen organisierten Erbinformation der Zelle und die darauffolgende Teilung des verdoppelten Erbmaterials dar. Am Ende dieses Prozesses stehen zwei genetisch identische Tochterzellen. Je komplexer der Organismus strukturiert ist, desto komplexer ist auch die Abfolge von Ereignissen des dem Organismus zugrunde liegenden Zellzyklus [97].

Der Zellzyklus gliedert sich in zwei Phasen. Die M-Phase, in der die Zellteilung (Mitose) stattfindet, und die Interphase (Zwischenphase), in der unter anderem die DNA dupliziert wird, um die Zelle auf die nächste Teilung vorzubereiten. Die Interphase teilt sich wiederum in drei Stationen; in die G1-, S- und G2 Phase. G1- und G2 Phase (G=gap=Lücke) stellen Verzögerungsphasen dar, die der Zelle Zeit geben zu wachsen und ihre Organellen zu verdoppeln. Als wichtiges Rückkopplungselement wird in diesen Phasen immer wieder der Abgleich mit der Umgebung vorgenommen, der es der Zelle ermöglicht, sofort auf ungünstige Umweltbedingungen zu reagieren. Insbesondere die Dauer der G1-Phase hängt direkt von den Umgebungsbedingungen ab. Sollte die chromosomale DNA, beispielsweise durch ionisierende Strahlung, beschädigt sein, wird

die G-Phase solange verlängert bis der Schaden behoben ist. Die Zelle kann in eine Art Warteschleife eintreten (G0-Phase) und dort bis zu einer Besserung der Bedingungen im Ruhezustand verharren. Von hier aus ist sowohl ein Wiedereintritt in den G1-Status als auch der Übergang in den programmierten Zelltod (Apoptose) denkbar. Am Übergang zur S-Phase überprüft ein Restriktionspunkt letztmalig, ob der Übergang in die S-Phase zum gegebenen Zeitpunkt sinnvoll erscheint. Ab hier läuft der weitere Zyklus weitgehend autonom von den Umgebungsbedingungen ab. In der folgenden S-Phase (S=Synthese) wird das Erbmateriale repliziert und dann in die G2-Phase eingeleitet. Zu Beginn der G2-Phase löst sich die Zelle vom Zellverband der Nachbarzellen und verstärkt die Produktion mitosespezifischer Proteine als Vorbereitung für den nun folgenden Eintritt in die Mitose [98, 99].

1.8.1 Zellzykluskontrollsystem

Menschliche Zellen verfügen über ein komplexes Netzwerk regulierender Proteine, die den regelrechten Ablauf eines jeden Zellzyklus kontrollieren. Das sogenannte „Zellzykluskontrollsystem“ (ZZKS) verfügt unter anderem über eine Reihe aufeinander abgestimmter biochemischer Schalter, die einzelne Schritte des Zellzyklus an verschiedenen Kontrollpunkten überwachen und gegebenenfalls auch blockieren können. Sie ermöglichen einerseits die Reparatur entstandener Genom-Schäden, andererseits führen sie defekte Zellen in den „programmierten Zelltod“ (Apoptose). Zwar könnte der Zellzyklus an sich auch ohne Kontrollpunkte regelrecht ablaufen, die fehlende Regulation würde aber zu vermehrten Mutationen führen [100].

Das ZZKS reagiert auch auf zellexterne Veränderungen, indem es Signale benachbarter Zellen registriert und seine Aktivität an die Umgebungsbedingungen anpasst. Werden diese Kontrollmechanismen in ihrer Funktion beeinträchtigt, so kann eine autonome ungehemmte Zellteilung zur Tumorentstehung führen [100, 101].

1.8.2 Steuerung des Zellzykluskontrollsystems

Die Steuerung des ZZKS übernehmen die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks, Cyclin-dependent kinases), eine Familie von Proteinkinasen, deren Aktivität zyklischen

Schwankungen unterliegt. Die Schwankungen der Cdks haben direkten Einfluss auf den Phosphorylierungszustand und somit auf die Aktivität intrazellulärer Proteine, die wesentliche Zellzyklusvorgänge steuern. Der periodische Verlauf der Cdk-Aktivität erfolgt nicht willkürlich, sondern unterliegt der Bindung regulierender Untereinheiten, der Cycline. Die Cycline, als Hauptregulatoren, binden an Cdks und führen über diese Komplexbildung zu einer enzymatischen Aktivierung der Cdks, die daraufhin substratspezifisch intrazelluläre Proteine aktivieren. Der Mensch verfügt über vier verschiedene Cdks, die an unterschiedlichen Stellen des Zellzyklus ins Geschehen eingreifen können [100].

1.8.3 Kontrolle der Cdk-Aktivität durch hemmende Proteine

Grundsätzlich wird die Cdk-Aktivität durch die periodisch schwankenden Cyclinspiegel reguliert. Über die Bindung spezieller Hemmproteine (Cdk-Inhibitorproteine, CKIs) kann eine zusätzliche Regulierung vor allem der G1- und S-Phase stattfinden. Die CKIs bewirken eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum der Cdks, wodurch diese inaktiviert werden. Über eine Blockade der ATP-Bindestelle am Cdk kann die Kinaseaktivität noch weiter gehemmt werden [101].

Die Cdk-Hemmung wird unter anderem indirekt durch das Tumorsuppressorgen p53 reguliert. Eine Schädigung des Erbmateriels führt zur Aktivierung von Proteinkinasen, die das Genregulatorprotein p53 phosphorylieren. Dessen Aktivität bewirkt die Transkription von verschiedenen Genen zum Beispiel p21, die unter anderem für die CKI-Proteine codieren. Auf diese Weise bewirkt ein biochemischer Prozess, dass beschädigte DNA den Zellzyklus nicht durchlaufen kann und somit Mutationen, welche die Krebsentstehung fördern, unterbunden werden [102].

2. Fragestellung und Ziele

Die Tumorzellproliferation ist ein wichtiger zentraler Prognosefaktor des invasiven Mammakarzinoms und steigt mit zunehmendem Tumorgrad. Eine vermehrte Tumorzellproliferation ist das Endresultat einer Störung im Ablauf des Zellzyklus. Die Regulation des Zellzyklus unterliegt einem Netzwerk von sich gegenseitig teils verstärkenden beziehungsweise teils sich blockierenden Molekülen, wobei die Expression einzelner dieser Moleküle auch einen eigenständigen prognostischen Wert haben kann.

Ziel dieser Arbeit soll es sein

- die immunhistochemische Expression von p16, p21, p27, p53, Bcl-2 und Cyclin D1 an einem Kollektiv von 865 Mammakarzinomen mittels Gewebearrays zu bestimmen,
- die Expression mit den klinisch-morphologischen Befunden zu korrelieren,
- die Ergebnisse mit der Expression des Östrogenrezeptors, des Progesteronrezeptors, von HER2, und verschiedenen Markern des „sogenannten „basalen“ Phänotyps zu korrelieren,
- die Expression der Proliferationsmarker mit den klinischen Verlaufsdaten zu korrelieren,

um damit neue Erkenntnisse zur Biologie, Pathogenese und Prognose des invasiven Mammakarzinoms zu erhalten.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchung zur Expression ausgewählter Tumormarker im Gewebe des invasiven Mammakarzinoms

3.1.1 Überblick über die verwendeten Zellzyklusproteine

p21

p21, auch Cdk-Inhibitor 1 genannt, ist ein Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen. Das für das Protein p21 codierende Gen liegt auf dem Chromosomenabschnitt 6p21.2. p21 spielt eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, es unterdrückt unter anderem das Krebswachstum. Die Stimulation der Transkription von p21 bewirkt den Stillstand des Zellzyklus [103]. Die Expression von p21 wird auf Transkriptionsebene von p53 reguliert und inhibiert die Aktivität des Cyclin E/Cdk2-Kinase-Komplexes [104]. Dies bewirkt eine vorübergehende Stagnation der beschädigten Zellen in der G1-Phase, welche es der Zelle ermöglicht, die an der DNA gesetzten Schäden zu reparieren.

p53

Das p53 Protein stellt ein zentrales Protein der Zellzykluskontrolle dar, es ist an der Regulierung der Zellteilung, der DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt [105]. Das gleichnamige, für p53 codierende Tumorsuppressorgen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 17p.13 lokalisiert [106]. Die Funktion des p53-Proteins beruht auf seiner Fähigkeit, den Zellzyklus zu unterbrechen und damit die Proliferation einer beschädigten Zelle zu verhindern. Die Zelle gewinnt somit Zeit, die DNA-Schäden zu reparieren oder gegebenenfalls die Apoptose einzuleiten. p53 induziert unter anderem die Expression des Proteins p21 [104]. p21 bindet an Cdk-Komplexe, die für das Eintreten und Durchlaufen der S-Phase wichtig sind (siehe oben) und hemmt deren Kinase-Aktivität. So verhindert p53 indirekt den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Ist die DNA repariert, sinkt der p53-Spiegel, p21 wird nicht mehr transkribiert und der Zellzyklus kann fortgesetzt werden. Kommt es jedoch zum Beispiel durch zu starke Schädigung der Zelle zu einer Überexpression von p53 werden Gene der Bcl-2 Familie

aktiviert, die wiederum eine Signalkaskade auslösen an deren Ende der programmierte Zelltod der Zelle steht [107, 108].

Bcl-2

Das Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Protein gehört zu einer Familie von Regulatorproteinen, welche eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose spielen [109]. Bcl-2, als wichtigster Vertreter dieser Familie, ist ein Inhibitor der Apoptose. Seine anti-apoptotische Wirkung besteht in der Hemmung der Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien [110]. Eine Translokation des Bcl-2-Gens führt zu einer verstärkten Bcl-2-Expression und somit zu einer reduzierten Ansprechbarkeit der Zellen auf Apoptose-Reize. So führt die Überexpression des Bcl2-Proteins über die ungehemmte Zellproliferation zur Tumorentstehung. Daher gilt Bcl-2 als Protoonkogen [111].

p27

Das Protein p27, auch Cyclin-dependent-kinase 1B (Cdk1B) genannt, wird durch das zugehörige Cdk1B-Gen codiert. Das Cdk1B Gen wird als Tumorsuppressorgen bezeichnet. p27 bindet an CyclinE/Cdk2- oder CyclinD/Cdk4-Komplexe und hemmt so deren Aktivität [112]. Die Aktivitätshemmung bewirkt eine Unterbrechung des Zellzyklus am G1 Restriktionspunkt. So können, je nach Expressionslevel von p27, mitogene oder antiproliferative Signale gesendet werden und somit eine Entscheidung über eine Ruhe- oder eine Proliferationsphase einer Zelle getroffen werden.

p16

Das Protein p16, auch Cdk-Inhibitor-2a genannt, ist ein Inhibitor der Cyclin abhängigen Kinasen (Cdk4/Cdk6) [113]. Das gleichnamige Gen liegt auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 und kann kategorisch den Tumorsuppressorgen zugeordnet werden [114, 115]. p16 kommt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Wachstumskontrolle zu. Eine Überexpression, meist stressbedingt, verhindert die Bildung eines aktiven CyclinD1/Cdk-Komplexes und blockiert so den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus [116].

Cyclin D1

Cycline sind Proteine, die eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus einnehmen [117]. Cyclin D1 bildet einen Komplex mit den Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk4/Cdk6) und bewirkt damit die Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (Rb) [118, 119]. Das Rb-Protein bindet im nicht phosphorylierten Zustand an Genregulatorproteine. Diese exprimieren Gene, deren Produkte für den Ablauf des Zellzyklus notwendig sind [120]. Durch die Bindung des Rb-Proteins werden die Genregulatorproteine gehemmt und verhindern so den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus [121, 122]. Die Phosphorylierung des Rb-Proteins durch CyclinD1/Cdk4-Komplexbildung bewirkt die Trennung des Rb-Proteins von den Genregulatorproteinen und hebt somit die hemmende Wirkung auf den Ablauf des Zellzyklus auf.

Die Konzentration des Cyclin D1 schwankt über die gesamte Zellzyklusspanne. Die Überexpression von Cyclin D1 steht im Zusammenhang mit der Entwicklung verschiedener Tumoren [123].

3.1.2 Die Tissue Microarray Technik

Kononen entwickelte im Jahr 1998 die sogenannte TMA-Technik mit dem Ziel, ein im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie deutlich effizienteres und kostengünstigeres Screening eines großen Probenkollektivs zu erreichen [124]. Die Tissue-Microarray-Technik (TMA) ermöglicht die simultane und somit zeitsparende und kostengünstige Auswertung eines umfangreichen Probengutes verschiedener Gewebebanken unter standardisierten Bedingungen [125]. Zunächst werden Gewebeproben eines ausgewählten Kollektivs entsprechend der jeweiligen Fragestellung aus einer Datenbank ausgewählt. Um nicht jede Probe einzeln mittels aufwendiger Antikörpernachweisverfahren untersuchen zu müssen, entnimmt man jeweils nur ein kleines charakteristisches Areal der Gewebeprobe und bündelt dann mehrere Proben auf einem Objektträger. Hierzu verwendet man spezielle Geräte, die auf zwei Hohlnadelsystemen basieren. Die erste Hohlnadel stantzt aus dem zu untersuchenden Gewebeblock (Spenderblock) einen Zylinder mit 0,6 mm Durchmesser aus. Die zweite Hohlnadel stantzt einen Zylinder mit gleichen Maßen aus einem Paraffinblock (Empfängerblock), dessen Inhalt verworfen wird und in dessen nun freien

Hohlraum der mit der ersten Hohnadel entnommene Gewebezylinder eingesetzt wird [126]. Stanzen von nur 0,6 mm Durchmesser reichen häufig aus, um die morphologischen Eigenschaften einer Gewebeprobe hinreichend gut beurteilen zu können [127]. Verwendet man Nadeln mit einem Durchmesser von 0,6 mm ist es möglich, bis zu 1000 Stanzen auf einem Empfängerblock und somit auf einem Objektträger anzuordnen [126]. Zur besseren Übersicht wird bei einem Array aus mehreren hundert Gewebeproben eine Unterteilung in Sektoren vorgenommen. Die Identifikation der einzelnen Zylinder erfolgt dann über die Einordnung in ein XY-Koordinatensystem, welches jedem Zylinder spezifische Koordinaten zuteilt. Die TMA-Methode erlaubt eine effiziente Untersuchung eines Probenkollektivs auf Proteinebene mittels verschiedener Analyseverfahren unter standardisierten Bedingungen in nur einem Arbeitsablauf [128]. Das Erstellen serieller TMA-Schnitte ermöglicht die mehrfache histopathologische Verwertung einer großen Zahl fast identischer Gewebesequenzen [129]. Somit eignet sich dieses Hochdurchsatzverfahren auch ideal zur Verifizierung potenzieller Biomarker in der molekularbiologischen Forschung [130]. Die Technik kann zur tumorspezifischen Analyse molekularer Marker angewendet werden und trägt somit auch eine prädiktive Bedeutung, da mit ihr die Determinierung eines eventuellen biologischen Aggressivitätspotentials des Tumors aufgezeigt werden kann [131, 132].

3.1.3 Tumorprobenkollektiv

Die 1000 Paraffin-eingebetteten, mittels Tissue-Microarray untersuchten Tumorproben stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie in Paderborn/Höxter. Alle Patientinnen wurden in verschiedenen Kliniken der Landkreise Paderborn, Höxter und Soest behandelt. Das Alter der Patientinnen betrug im Durchschnitt 63,1 Jahre (22-99 Jahre). In 865 Fällen handelte es sich um ein primäres Mammakarzinom. 80% der Frauen waren postmenopausal. Eine genaue Übersicht über die histopathologischen Details sowie Angaben zur Tumorgröße, dem Nodalstatus und dem intrinsischen molekularen Subtyp enthält die Tabelle 4. Die Einteilung des Probenkollektivs nach der jeweiligen molekularen Subklassifikation konnte nur an 783 der 865 primären Mammakarzinome zweifelsfrei durchgeführt werden, da durch Material- und/oder Färbeverlust nicht alle Proben ausgewertet werden konnten.

Histologischer Typ		Tumorgrad	N-Kategorie	T-Kategorie	Molekularer Subtyp	
Ductal	n = 713	G 1 = 131	N 0 = 481	T1a = 5	luminal A	n = 558
Lobulär	n = 95					
Muzinös	n = 22	G 2 = 442	N 1 = 218	T1b = 49	luminal B	n = 136
Tubulär	n = 15					
Medullär	n = 6	G3 = 292	N 2 = 77	T1c = 349	HER2	n = 49
Tubulo-lobulär	n = 3					
Cribriform	n = 3		N 3 = 89	T2 = 362	basal	n = 57
Metaplastisch	n = 2					
Papillär	n = 1			T3 = 35	non-expressor	n = 65
Mikropapillär	n = 1					
Apokrin	n = 1			T4 = 65		
Adenoid-zystisch	n = 1					
Tubulär - gemischt	n = 1					
Siegelringzell	n = 1					

Tab.4: Histopathologische Typisierung der Gewebeproben

Bei den untersuchten Patientinnen mit erhobenen Langzeitverläufen (n=456) handelte es sich um Patientinnen, welche im Zeitraum zwischen 1997-2003 an der Sankt-Vinzenz-Frauenklinik in Paderborn entsprechend der gültigen Leitlinien diagnostiziert und therapiert wurden. Die klinischen Daten wurden zunächst aus den archivierten Akten generiert und die entsprechenden weiteren Daten zum Gesamt- aber auch zum rezidivfreien Überleben in Zusammenarbeit mit den weiterbehandelnden Hausärzten und Frauenärzten/innen erhoben. Dies beinhaltete auch den Menopausenstatus.

Das angegebene Alter der Mammakarzinompatientinnen bezieht sich auf das Alter der Patientin zum Zeitpunkt der primären Diagnose. Auch alle Überlebenszeiten (Gesamt und Rezidivfrei) beziehen sich in dieser Studie auf den Zeitpunkt der Erst-Diagnosestellung des Tumors. Die Überlebenszeit wurde von diesem Tag an

berechnet. Patientinnen, die zum Erhebungszeitpunkt nicht mehr eruiert werden konnten, gingen in die Studie mit den entsprechenden Daten des letzten Kontakts ein.

3.1.4 Erstellung der speziellen Tissue Microarrays

Vor der Erstellung der Tissue-Microarrays (TMAs) erfolgte eine erneute Begutachtung der 1000 Tumorproben aus dem Tumorblockregister des Instituts für Pathologie in Paderborn/Höxter, wobei alle relevanten Daten erfasst wurden (Tab. 4). Die dabei erhobenen Daten, speziell der Tumormalignitätsgrad, wurden als alleinige Grundlage der weiteren Auswertungen genommen. Nach der Anfertigung von neuen repräsentativen HE-Schnitten wurden auf diesen geeignete aussagekräftige Areale markiert. Diese Markierungen dienten nun als Schablone zur Identifizierung der zu entnehmenden Areale aus dem zugehörigen Paraffinblock. Mittels einer Gewebsstanze wurde jeweils ein Bereich von 0,6 mm Durchmesser aus den markierten Arealen der Spenderblöcke entnommen und in die vorbereiteten Empfängerblöcke im Abstand von jeweils 0,2 mm implantiert. Die 1000 Proben wurden auf insgesamt drei Empfängerblöcke aufgeteilt. Zur leichteren Orientierung auf dem Objektträger diente ein -oben beschriebenes- Raster, das jeweils 100 Proben sektorenweise aufteilt. Die einzelnen Sektoren wurden durch römische Ziffern in aufsteigender Reihenfolge nummeriert. Innerhalb eines Sektors wurde die vertikale Achse durch die Buchstaben A-J aufgeteilt, während die horizontale Achse mit den Ziffern 1 bis 10 beschriftet wurde. So konnten jeder einzelnen Probe individuelle Koordinaten zugeordnet werden. Zur Homogenisierung der einzelnen Stanzen mit dem Empfängerblock wurde dieser mit Paraffin bedeckt und erwärmt. Aus dem fertig zusammengestellten homogenisierten Block konnten jetzt die seriellen Schnitte zur immunhistochemischen Untersuchung angefertigt werden.

3.1.5 Allgemeines Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Immunhistochemische Methoden ermöglichen den hochspezifischen Nachweis zellulärer Antigene, gegen die Antikörper gebildet werden [133, 134]. Zur Bestimmung der zu untersuchenden Antigene bedient sich die Immunhistochemie der spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion. Das Antigen-Antikörper-Prinzip beruht auf der Affinität spezifischer Antikörper zu ganz bestimmten Oberflächenbereichen der Antigene, den sogenannten Epitopen. Der Antikörper bindet an das jeweilige Epitop. Die gebundenen

Antikörper werden dann entweder direkt oder indirekt an ein Farb-Detektionssystem gekoppelt, um letztlich das Antigen -meist ein Protein- histologisch sichtbar zu machen. Über die Auswertung der Signalstärke kann die Expression des jeweiligen Antigens in dem untersuchten Gewebe bei entsprechender Standardisierung auch quantitativ bestimmt werden [135].

Ein sehr häufig benutztes System zur immunhistochemischen Färbung ist die LSAB-Färbemethode (LSAB=Labelled-Strept-Avidin-Biotin), die im Übrigen auch als Grundlage der Färbung in der vorliegenden Arbeit diente. Hierbei basiert die Reaktion auf der hohen Affinität des Streptavidins zum Biotin. Nach Zugabe eines Detektionssystems (Chromogen Red, AEC, DAB etc.) erscheinen die Zielantigene in einer roten oder braunen Farbe und können nach mehr oder weniger starker Kerngegenfärbung mit Hämalaun lichtmikroskopisch analysiert werden [136].

Tabelle 5 zeigt eine Auflistung über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, die Hersteller, die Klone sowie die jeweilige Vorbehandlung und Verdünnung.

Antikörper	Quelle	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung
ER	Novocastra	6F11/2	1:800	EDTApuffer pH 8,0
PR	Dako	PgR636	1:200	EDTApuffer pH 8,0
HER2	Dako	HercepTest		Zitratpuffer pH 6,0
Ki-67	Dako	Mib-1	1:100	EDTApuffer pH 8,0
Ck 5/14	DCS	XM26HL002	1:50	Zitratpuffer pH 6,0
Ck 5/6	Dako	D15/16B4	1:50	EDTApuffer pH 8,0
Ck 17	Dako	E3	1:50	Zitratpuffer pH 6,0
EGFR	Dako	Pharm DX-Kit		Zitratpuffer pH 6,0
Bcl-2	Dako	124	1:100	Zitratpuffer pH 6,0
p21	Calbiochem	EA10	1:500	Zitratpuffer pH 6,0
p27	Dako	SX5368	1:100	EDTApuffer pH 8,0

Cyclin D1	Novocastra	NCL-L-CyclinD1-GM	1:20	EDTApuffer pH 8,0
p53	Dako	DO-7	1:100	EDTApuffer pH 8,0
p16	mtm	Kit		Zitratpuffer pH 6,0

Tab.5: Auflistung der Antikörper, Hersteller, Klone, Vorbehandlung und Verdünnung

3.1.6 Immunhistochemisches Färbeprotokoll der Schnittpräparate

A) Erstellung der immungefärbten Objektträger

Aus einem gekühlten TMA-Block wurden mit einem Rotationsmikrotom, der Firma Thermo Scientific Microm HM240E, Schnitte mit einer Dicke von 1-2 μm angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte in warmem Wasser „gespreitet“ und dann auf einen beschichteten Objektträger (Superfrost Plus, Firma Menzel) aufgezogen. Um die Haftung der Schnittpräparate auf dem Objektträger zu optimieren, wurden die fertigen Objektträger über mehrere Stunden im Trockenschrank (62°C) getrocknet.

B) Entparaffinisierung und Rehydrierung der Schnittpräparate

Nach Abkühlung der Schnittpräparate auf Raumtemperatur wurden die Schnitte in folgender Reihenfolge in Glasküvetten entparaffinisiert (Xylol) und rehydriert (Aqua dest.):

1. 15 Minuten in Xylol inkubieren
2. 10 Minuten in 99% Alkohol inkubieren
3. 10 Minuten in 96% Alkohol inkubieren
4. 10 Minuten in 70% Alkohol inkubieren
5. 10 Minuten Spülung in Aqua dest.

C) Antigendemaskierung mittels Hitzevorbehandlung

Durch die Formalinfixierung kann es zu einer Maskierung der zu untersuchenden Epitope kommen. Um eine eventuell aufgetretene Maskierung der auf den Schnittpräparaten vorhandenen Epitope zu entfernen, wurden die Objektträger im Sinne einer sogenannten „Demaskierung“ einer Hitzevorbehandlung unterzogen. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen:

1. Eintauchen der Objektträger in Glasküvette mit Zitrat- oder EDTA-Pufferlösung
2. Glasküvette für 40 Minuten in Wasserbad stellen (Temperatur: 98,5°C)
3. Abkühlen der Objektträger auf mindestens 40°C
4. Abstellen der Objektträger in einer Wasch-Pufferlösung

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Pufferlösungen:

Art des Puffers	Firma	Name	pH-Wert	Verdünnung mit destilliertem Wasser
Zitratpuffer	Dako	Dako retrieval solution, K 5207	6,0	1:10
EDTA-Puffer	Zytomed	ZUC 040	8,0	1:10
Wasch-Puffer, TRIS gepufferte NaCl-Lösung	Dako	Dako S 3006	7,6	1:10

Tab.6 Auflistung der verwendeten Pufferlösungen (Firma, Name, pH-Wert und Verdünnung)

D) Immunfärbung der Schnittpräparate nach der LSAB-Methode

Die Färbung der Schnitte erfolgte mit der indirekten, drei-stufigen Labelled-Strept-Avidin-Biotin-Methode (LSAB) (siehe 3.1.5)

Zur Standardisierung der Abläufe wurde ein Immunfärbeautomat der Firma Dako (DAKO Real Detection System Peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse Kit, K5003) eingesetzt. Die Schnittpräparate wurden vor dem Einsetzen in den Färbeautomaten nochmals vorbehandelt:

1. 5 Minuten blockieren mittels Peroxidase (Dako Real Peroxidase-Blocking Sol. S2023)
2. Spülung mit TRIS-Puffer und Tween der Firma Dako S3006

Der Färbeautomat wurde nach folgendem Protokoll programmiert:

1. Inkubieren der verdünnten Antikörper
2. Spülung mit TRIS-Puffer
3. 15 Minuten inkubieren mit biotinilyertem Sekundär-Antikörper
4. Spülung mit TRIS-Puffer
5. 15 Minuten inkubieren mit Streptavidin Peroxidase
6. Spülung mit TRIS-Puffer
7. 2 mal 5 Minuten inkubieren mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)
8. Spülung mit Aqua dest.
9. Entnahme der Schnittpräparate aus dem Färbeautomaten
10. Kerngegenfärbung mit Mayers Hämalaun
11. 7 Minuten Bläuvorgang unter fließendem Wasser
12. Eindeckung der Schnittpräparate (Eindeckmedium: Kaisers Glycerin Gelantine)

3.1.7 Übersicht über das angewendete Verfahren

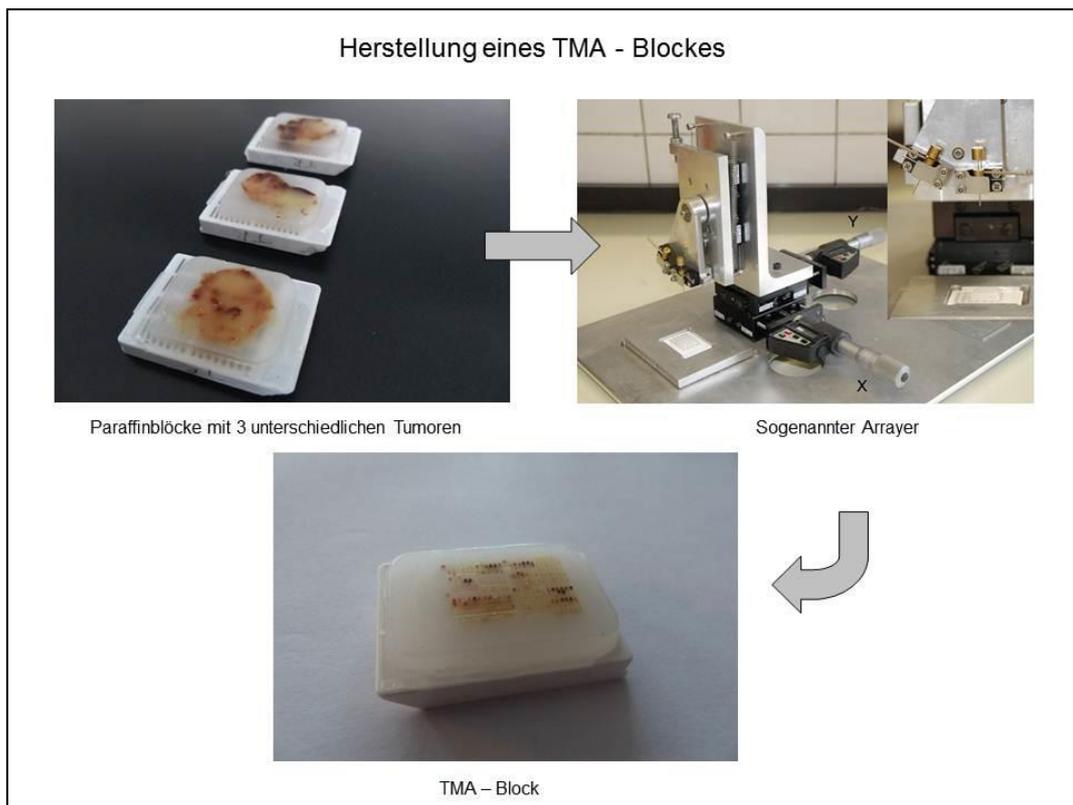


Abb. 1 : Verfahrensabläufe zur Herstellung des TMA-Blockes

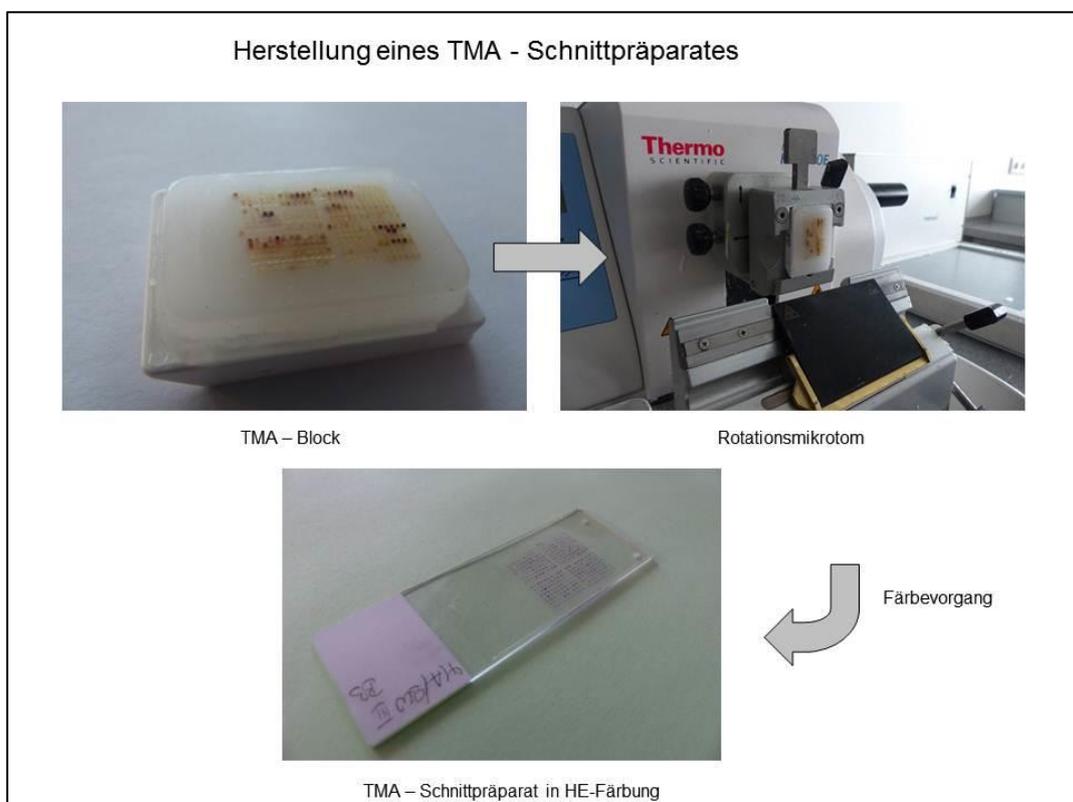


Abb. 2: Verfahrensabläufe zur Herstellung des TMA-Schnittpräparates

3.1.8 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate erfolgte durch Prof. Dr. H. Bürger, Facharzt für Pathologie am Institut für Pathologie in Paderborn/Höxter, nach folgendem Bewertungsschema:

Marker	0	1+	2+	3+
ER	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
PR	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
HER-2	s.Dako –Score Text unten			
Ki-67	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
Ck 5/14	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
Ck 5/6	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
Ck 17	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
EGFR	Keine Reaktion	Jede membranöse Reaktion		
Bcl-2	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
p21	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen

p27	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
Cyclin D1	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
p53	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen
p16	Keine Reaktion; <1%der Tumorzellen	1-10% der Tumorzellen	>10-50% der Tumorzellen	>50% der Tumorzellen

Tab.7: Bewertungsschema der Färbungen

Klassifikation der intrinsischen molekularen Subtypen [137]

- luminal A ER und/oder PR positiv, Her-2 negativ, Ki-67-niedrig
- luminal B ER und/oder PR positiv, Her-2 positiv und/oder Ki-67 hoch
- HER-2 ER und PR negativ, Her-2 positiv
- basal ER und PR und Her-2 negativ, Ck5 und/oder Ck14 und/oder Ck17 und/oder EGFR positiv
- „non-expressor“ ER und PR und Her-2 negativ, Ck5, Ck14, Ck17 und EGFR negativ

Der Grenzwert für Ki-67 wurde mit 14% der positiven Tumorzellen festgelegt [138]. Für ER und PR betrug der Schwellenwert zur Bestimmung der intrinsischen molekularen Subtypen 1% positiver Zellen. Eine Her-2-Positivität bestand entweder bei einem Dako-Score 3+, beziehungsweise einer mittels Her-2-CISH bestätigten Amplifikation des Her-2-Gens. Für Ck5, Ck14 und Ck17 wurde jegliche intrazytoplasmatische Positivität unabhängig von der Zellzahl gewertet. Das gleiche galt für EGFR, wobei hier nur die membranöse Expression gewertet wurde.

3.1.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Software-Programms SPSS. Hierbei wurden die Überlebenskurven mittels der Erstellung von Kaplan-Meier-Kurven bestimmt. Die Korrelation der Parameter untereinander erfolgte mittels Rank-Korrelation und χ^2 -Tests. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse $p < 0,05$ bewertet. Die Permutationstestung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr rer. nat. Eberhard Korsching, Institut für Bioinformatik, Universitätsklinikum Münster, unter Verwendung eines speziellen, von ihm und Herrn Prof. Bürger entwickelten biomathematischen Algorithmus [139].

4. Ergebnisse

4.1 Häufigkeitstabelle zur Verteilung der immunhistochemischen Färbeintensitäten

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Verteilung der immunhistochemischen Färbeintensitäten (0-3) im untersuchten Probenkollektiv, gelistet nach den einzelnen Faktoren. Die Färbeintensität wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

- 0 keine Färbung
- 1 schwache Intensität der Färbung
- 2 mäßige Intensität der Färbung
- 3 starke Intensität der Färbung

Die Abweichungen der Gesamtkollektivgröße ergeben sich, da nicht immer das gesamte Probenkollektiv auswertbar war. Sowohl der Anschnitt tumorfreier Bereiche als auch ein durch das Färbeverfahren bedingter Materialverlust führten zu leichten Abweichungen. Die Anzahl auswertbarer Proben rangiert zwischen 812-749 Proben.

Marker	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	777/803 (96%)	28/803 (3%)	5/803 (<1%)	1/803 (<1%)
Her-2	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%)
Mib-1	371/782 (47%)	275/782 (35%)	110/782 (15%)	24/782 (3%)
p21	279/749 (37%)	295/749 (39%)	120/749 (16%)	53/749 (8%)
p27	109/758 (14%)	154/758 (20%)	270/758 (36%)	223/758 (30%)

p53	600/780 (77%)	76/780 (10%)	58/780 (7%)	44/780 (6%)
Bcl-2	200/770 (26%)	232/770 (30%)	269/770 (35%)	67/770 (9%)
Cyclin D1	457/762 (60%)	228/762 (30%)	62/762 (8%)	13/762 (2%)
p16	677/781 (87%)	80/781 (10%)	19/781 (2%)	3/781 (<1%)

Tab.8: Übersicht über die Verteilung der immunhistochemischen Färbeintensitäten

4.2 Klinisch-morphologische Korrelation

Die Korrelation der in dieser Studie untersuchten Parameter zu den etablierten klinisch-pathologischen Parametern Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Tumorgrad ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

Marker	Tumorgröße	N	Grad
p21	p<0,005	n.s.	p<0,001
p27	p<0,01	p<0,01	p<0,001
p16	p<0,05	n.s.	p<0,001
Cyclin D1	n.s.	n.s.	n.s.
p53	p<0,001	n.s.	p<0,0001
Bcl-2	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001

Tab.9: Korrelation der Kandidatenmarker mit Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Tumorgrad

4.3 Tabelle zur Korrelation der untersuchten Parameter untereinander

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über alle Korrelationen zwischen den jeweiligen molekularen Parametern. Im oberen Teil wird das jeweilige statistische Signifikanzniveau anhand des p-Wertes dargestellt. Die farbliche Markierung zeigt eine positive (grün unterlegt bzw. schwarze Schrift), bzw. inverse Korrelation (rot unterlegt bzw. weiße Schrift). Die untere Tabellenhälfte zeigt den jeweiligen Korrelationskoeffizienten.

Marker	CK 5/6	Ck 17	Bcl-2	ER	CK 5/14	EGFR	p53	PR	Cyclin D1	MIB-1	p16	HER2	p27	p21
CK 5/6		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,75	0,02	<0,0001	0,73	0,03	0,001
Ck 17	0,66		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,03	0,81	0,05	<0,0001	0,53	0,01	0,05
Bcl-2	-0,19	-0,17		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,06	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,06
ER	-0,21	-0,18	0,53		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,07
CK 5/14	0,47	0,44	-0,24	-0,32		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,06	<0,0001	<0,0001	0,26	<0,0001	0,89
EGFR	0,22	0,24	-0,23	-0,26	0,32		<0,0001	<0,0001	0,1	0,7	<0,0001	0,85	<0,0001	0,33
p53	0,17	0,15	-0,2	-0,27	0,23	0,15		<0,0001	0,01	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,59
PR	-0,15	-0,11	0,42	0,44	-0,21	-0,2	-0,22		0	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,28
Cyclin D1	0,04	-0,06	0,26	0,3	-0,11	-0,12	-0,07	0,14		0,06	0,01	0,17	<0,0001	<0,0001
MIB-1	0,11	0,09	-0,07	-0,03	0,16	0,03	0,23	-0,1	0,12		<0,0001	0,01	0,25	<0,0001
p16	0,21	0,13	-0,25	-0,3	0,35	0,18	0,22	-0,24	-0,14	0,18		0,03	0,01	0,49
HER2	-0,03	-0,03	-0,13	-0,06	-0,07	-0,03	0,03	-0,12	-0,02	0,13	0,02		<0,0001	<0,0001
p27	-0,1	-0,1	0,36	0,37	-0,14	-0,19	-0,14	0,32	0,3	0,04	-0,14	0,02		0,13
p21	0,12	0,07	-0,07	0,06	-0,01	0,03	-0,02	-0,04	0,25	0,15	0,03	0,12	0,05	

Tab.10: Korrelation der jeweiligen Marker untereinander
positive Korrelation, **inverse Korrelation**

4.4 Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Die Ergebnisse bezüglich des Langzeitüberlebens sind auf den folgenden Seiten graphisch mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt.

4.4.1 Bcl2-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Die Expression von Bcl-2 war, unabhängig von der Expressionsstärke und der Anzahl der positiv gefärbten Zellen, mit einer statistisch signifikant besseren Prognose assoziiert. Dieses Ergebnis war in prä- und postmenopausalen Mammakarzinomen gleichsam zu beobachten. Der Überlebensvorteil war in den ersten zehn Jahren am stärksten ausgeprägt und betrug in diesem Zeitraum bis zu 20%. Wie auch bei p53 hob sich der Effekt bei einer längeren Nachbeobachtungszeit jedoch fast auf.

4.4.2 p16-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Die prognostische Relevanz der p16-Expression unterschied sich signifikant in prä- und postmenopausalen Mammakarzinomen. Im Gesamtkollektiv zeigte sich kein fassbarer Unterschied. Hingegen war in postmenopausalen Mammakarzinomen die Expression von p16 mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Ein gänzlich anderes Verhalten war in prämenopausalen Mammakarzinomen zu beobachten. Patientinnen mit einer Expression von p16 waren nach etwa 15 Jahren Nachbeobachtungszeit noch alle am Leben.

4.4.3 p21-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Eine unterschiedliche Bedeutung der Expression von p21 in Abhängigkeit vom Menopausenstatus konnte ebenfalls beobachtet werden. Im Gesamtkollektiv war die Expression von p21 mit einem statistisch signifikant schlechteren Langzeitüberleben assoziiert. Dieses Ergebnis konnte auch in der postmenopausalen Subgruppe beobachtet werden. Der jeweilige Überlebensvorteil lag bei etwa 10%. Bei prämenopausalen Mammakarzinomen hatte die p21-Expression keine Relevanz.

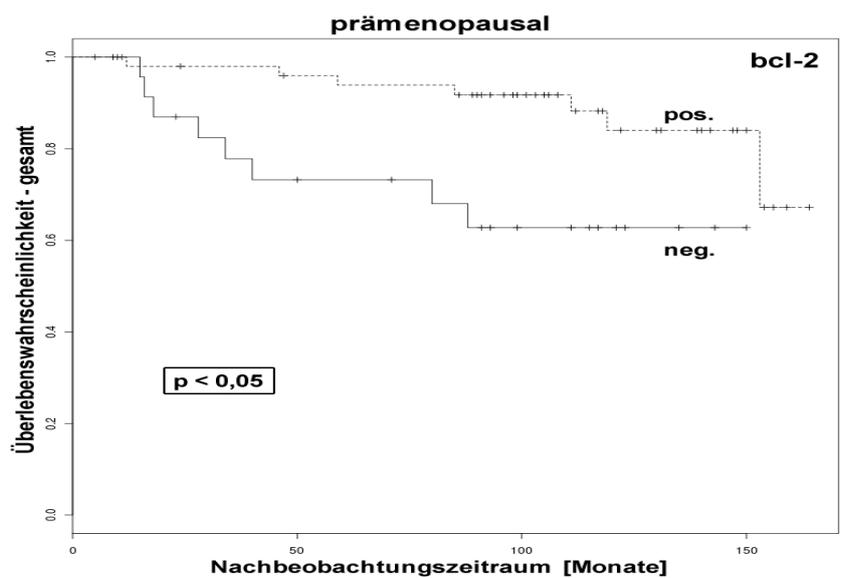
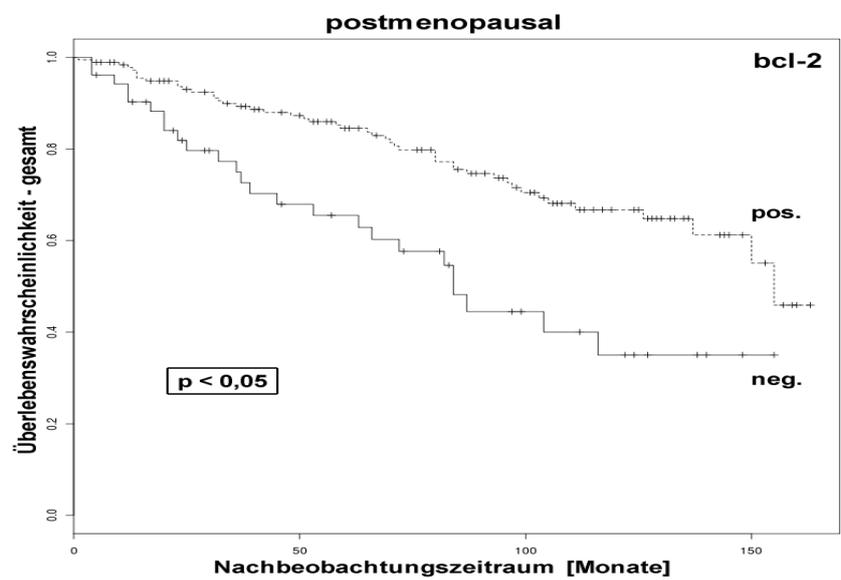
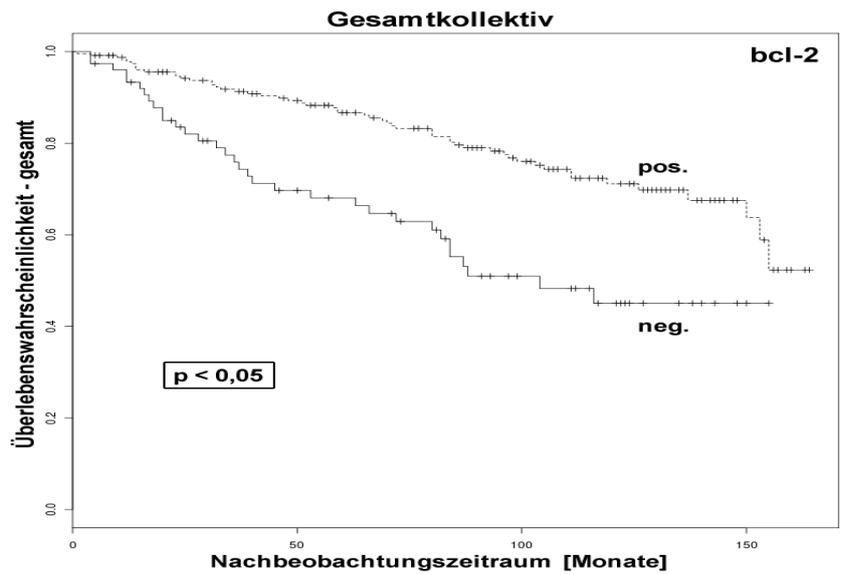


Abb. 3-5: Kaplan Meier Darstellung Überlebenswahrscheinlichkeiten Bcl-2

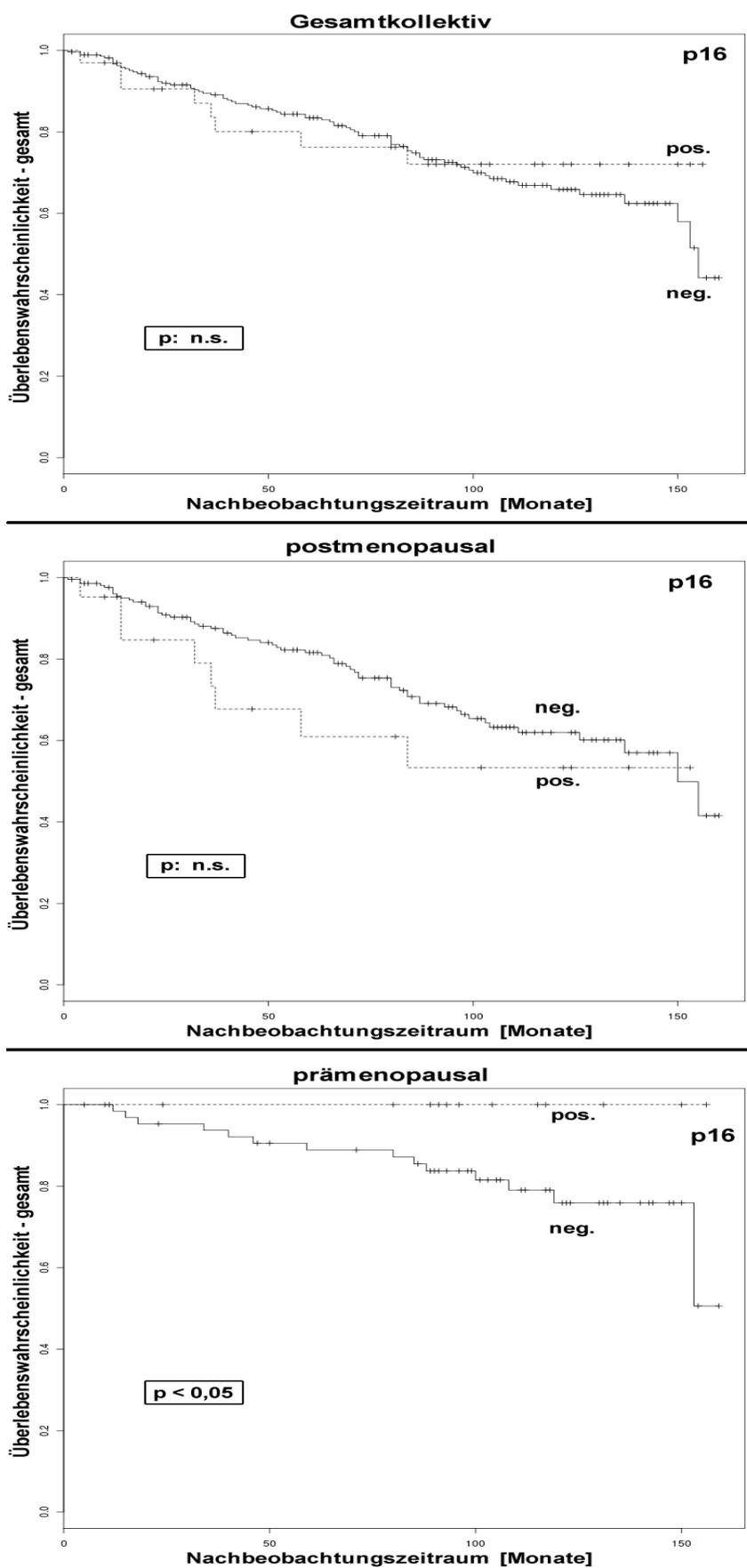


Abb. 6-8: Kaplan Meier Darstellung Überlebenswahrscheinlichkeiten p16

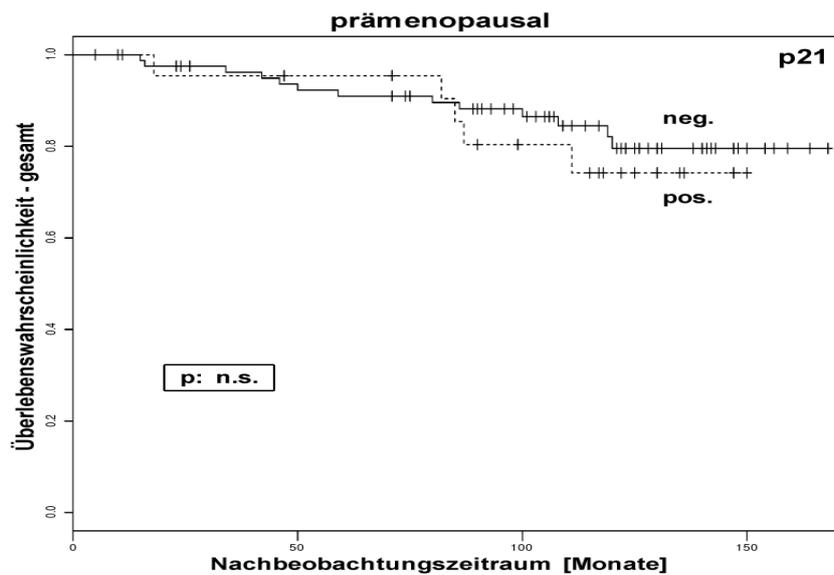
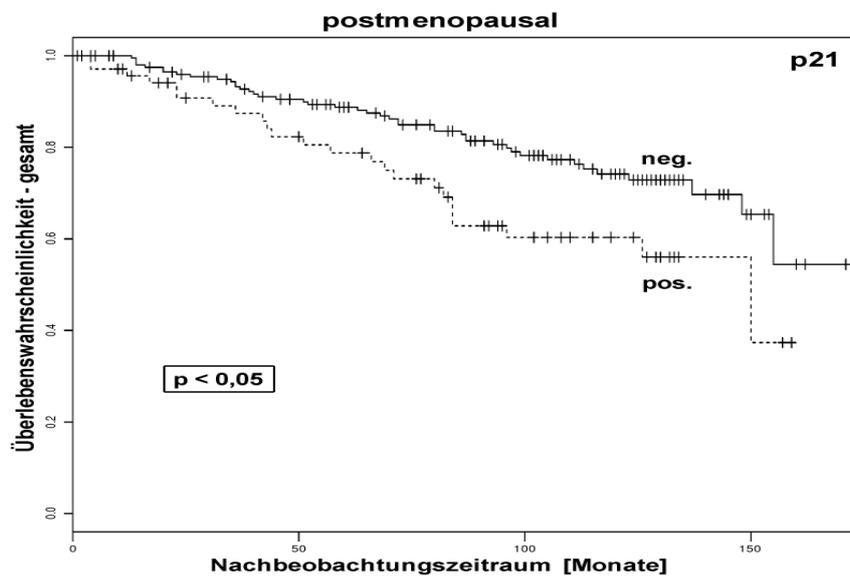
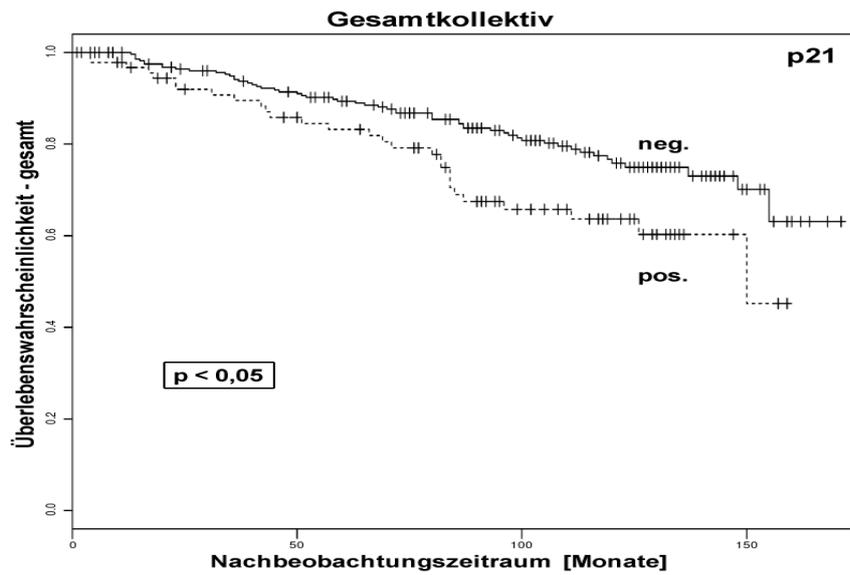


Abb. 9-11: Kaplan Meier Darstellung Überlebenswahrscheinlichkeiten p21

4.4.4 CyclinD1-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Die Expression von CyclinD1 als Zellzyklusfaktor zeigte keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben in der Gesamtgruppe als auch in den einzelnen, prä- und postmenopausalen Subgruppen. Speziell in den ersten acht Jahren wiesen die Überlebenskurven einen nahezu identischen Verlauf auf. Erst danach zeigte sich die Tendenz zu einer Diskriminierung im Gesamtkollektiv und in der postmenopausalen Subgruppe. Patientinnen mit einer Cyclin D1-Expression waren mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

4.4.5 p53-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Die starke Expression von p53 in den Tumorzellkernen (starke Expression in mehr als 50% der Tumorzellen) war im Gesamtkollektiv als auch in den prä- und postmenopausalen Subgruppen mit einer statistisch signifikant schlechteren Prognose assoziiert. Es ist allerdings festzustellen, dass sich der Überlebensvorteil nach zwölf Jahren Nachbeobachtungszeit nahezu aufhebt.

4.4.6 p27-Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Die Kaplan-Meier-Analyse bezüglich des Gesamtüberlebens ergab für p27 keinen signifikanten Unterschied für Patientinnen mit und ohne Expression von p27. Zwar zeigte sich für das Gesamtkollektiv eine tendenziell bessere Überlebenschance bei einer Expression von p27, in allen Subgruppen (prä- und postmenopausal) lag der Überlebensvorteil allerdings nur bei fünf bis zehn Prozent ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen.

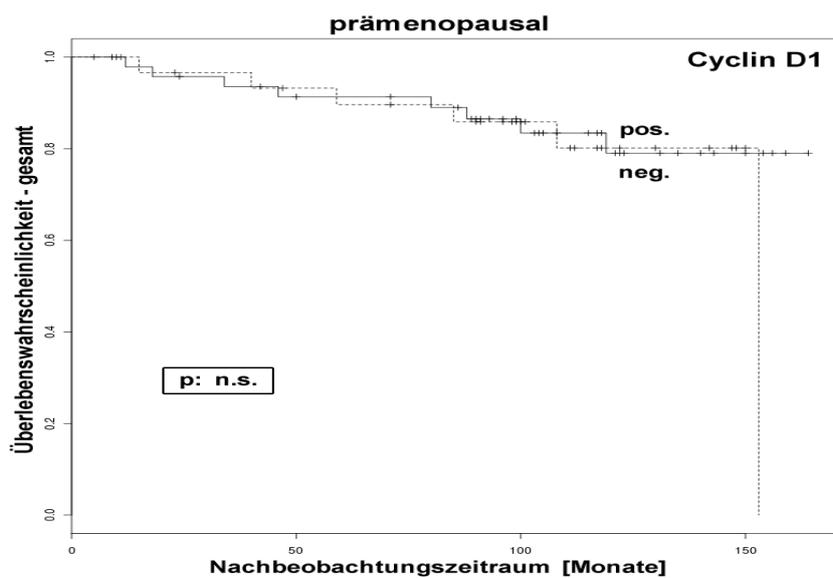
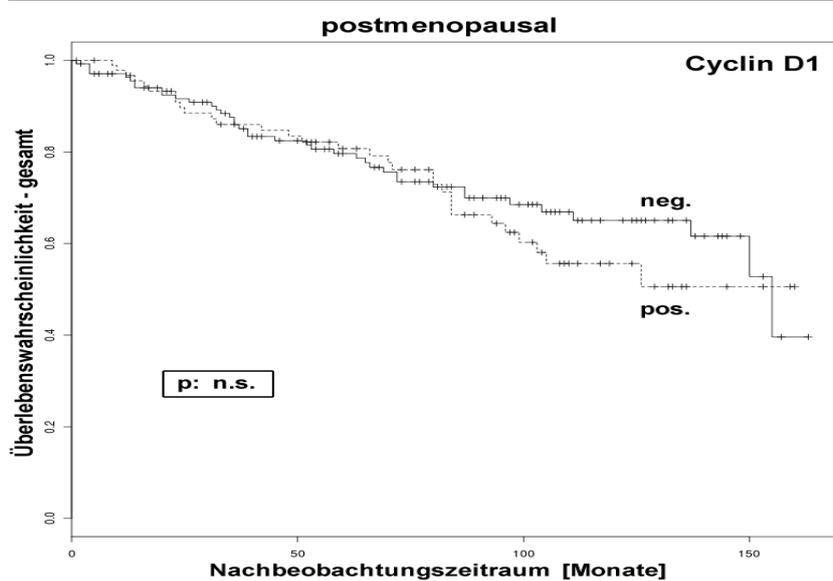
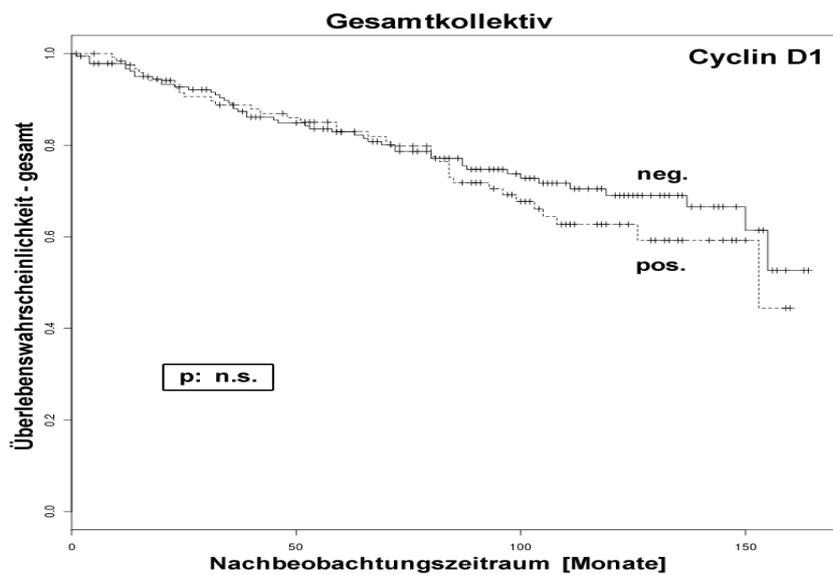


Abb. 12-14: Kaplan-Meier-Darstellung Überlebenswahrscheinlichkeiten p21

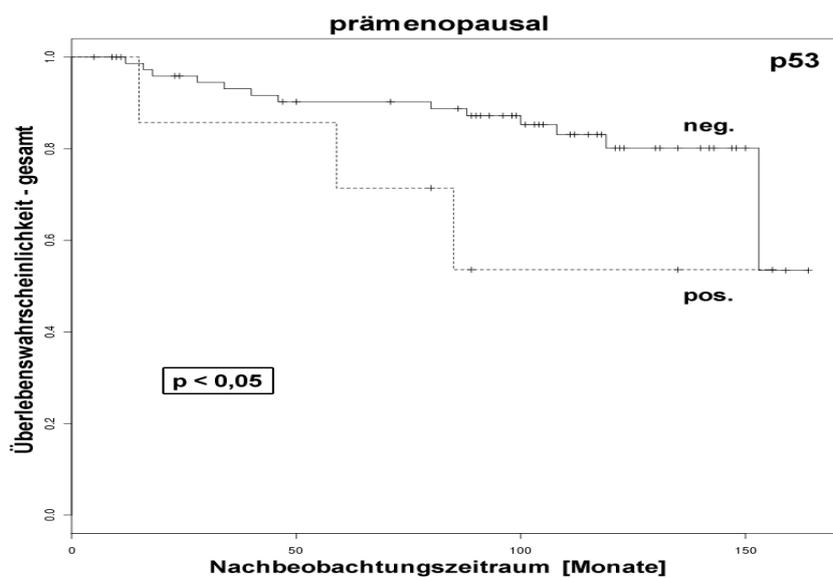
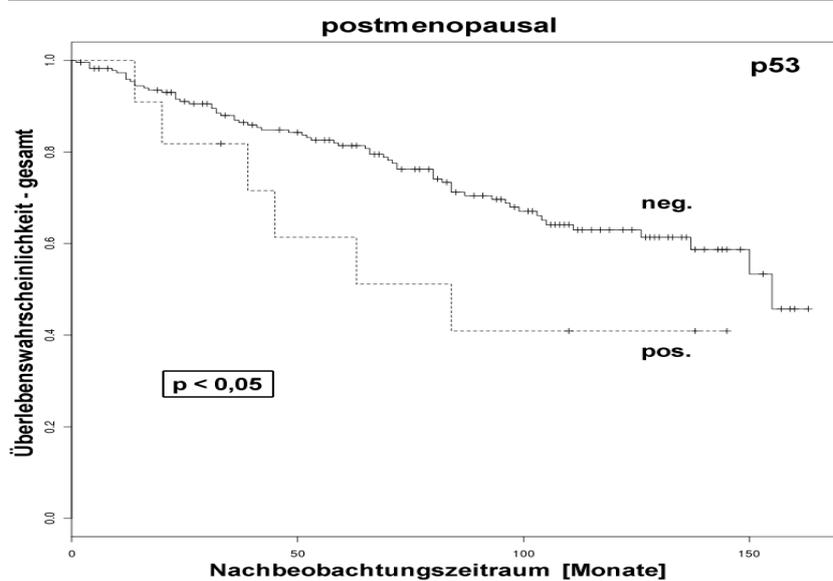
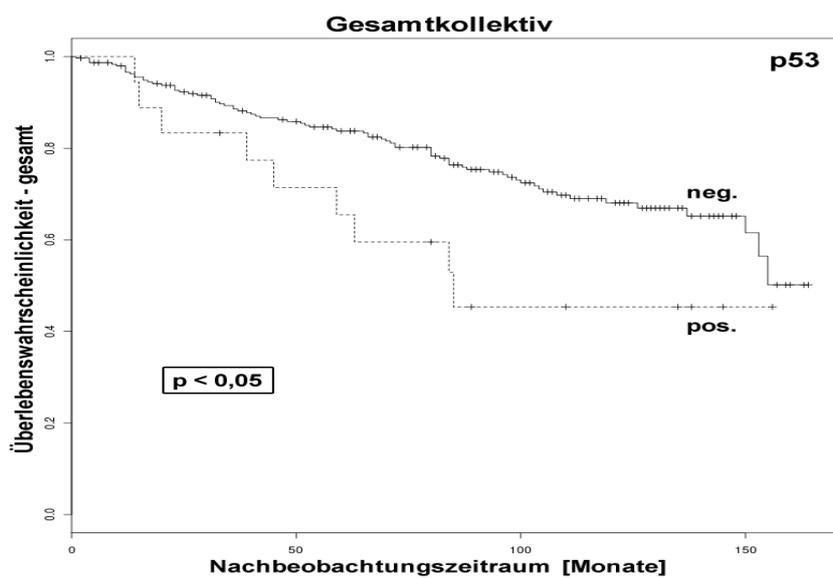


Abb. 15-17: Kaplan-Meier-Darstellung Überlebenswahrscheinlichkeiten p53

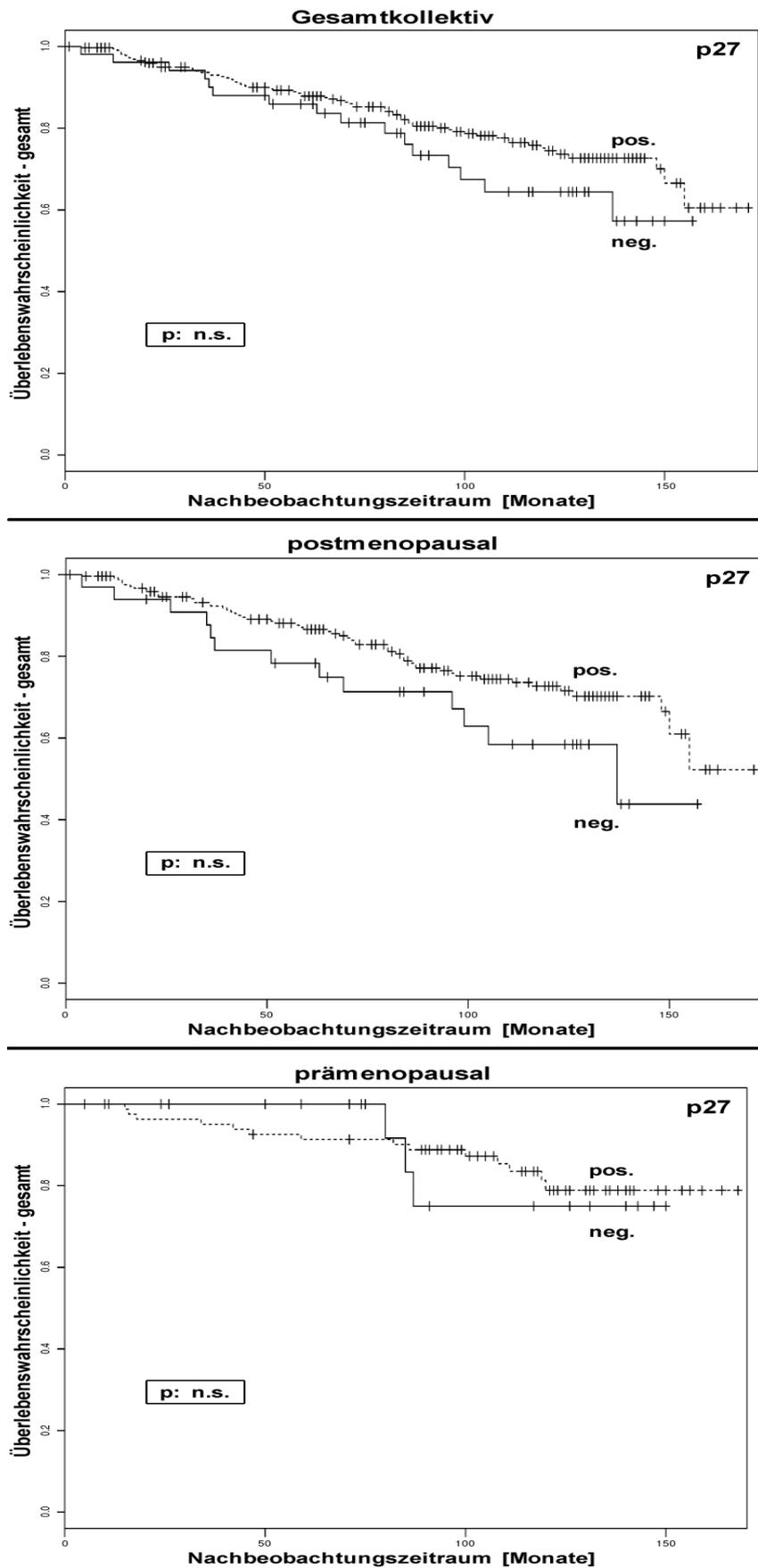


Abb. 18-20: Kaplan-Meier-Darstellung Überlebenswahrscheinlichkeiten p27

4.5 Permutationstestung

4.5.1 Korrelation der Kandidatenmarker zum Tumorgrad

Die Permutationstestung für invasiv duktales Karzinome wurde in drei Schritten durchgeführt und entsprechend in drei unterschiedlichen graphischen Darstellungen wiedergegeben. Der erste Schritt beinhaltete die Analyse aller invasiv duktales Karzinome in Abhängigkeit vom Tumorgrad (Abb. 21). Es zeigte sich, dass hierbei die Korrelation zwischen den jeweiligen Kandidatenmarkern und dem Tumorgrad unterschiedliche Ergebnisse erbrachte.

Invasiv duktales G1 und invasiv duktales G2-Karzinome wiesen einen nahezu identischen Verlauf der Kurve auf, unterschieden sich jedoch deutlich von invasiv duktales G3-Karzinomen. Die Kurven wiesen ein deutlich zu erkennendes inverses Verhalten auf.

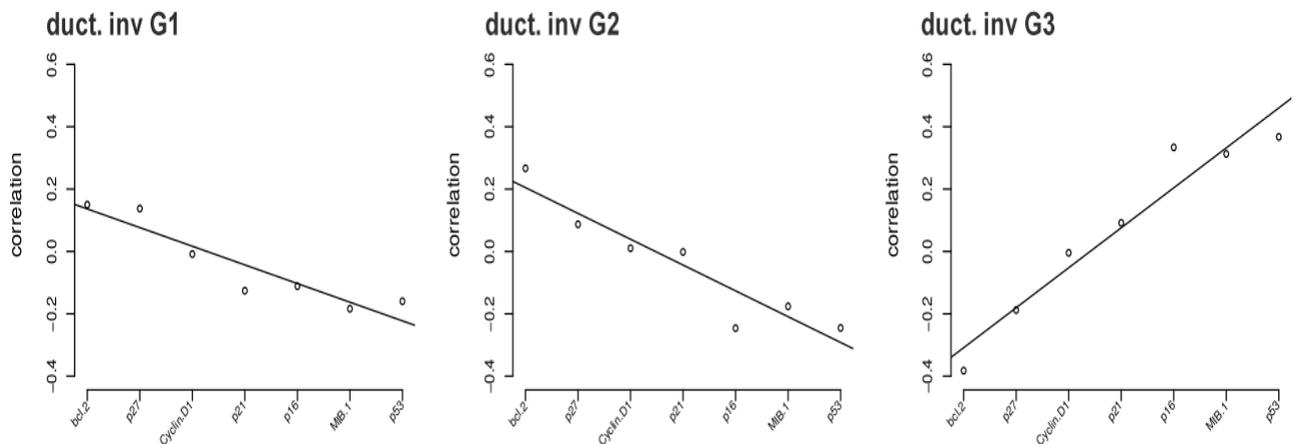


Abb. 21 : Permutationstestung für die Korrelation der Kandidatenmarker zum Tumorgrad im Kollektiv der invasiven duktales Karzinome

4.5.2 Korrelation der Kandidatenmarker zum Tumorgrad im Östrogenrezeptor-positiven Kollektiv

Da invasiv duktales G3 Karzinome einen wesentlich höheren Prozentsatz Östrogenrezeptor-negativer Mammakarzinome aufweisen, wurde in einem nächsten Schritt dieselbe Analyse wie oben durchgeführt, diesmal jedoch ausschließlich an Östrogenrezeptor-positiven Karzinomen (Abb. 22). Auch hier zeigte sich ein gleiches Ergebnis mit einem grundsätzlich gegensätzlichen, inversen Kurvenverlauf von Östrogenrezeptor-positiven, invasiv duktalem G1 und G2-Karzinomen im Vergleich zu Östrogenrezeptor-positiven, invasiv duktalem G3-Karzinomen.

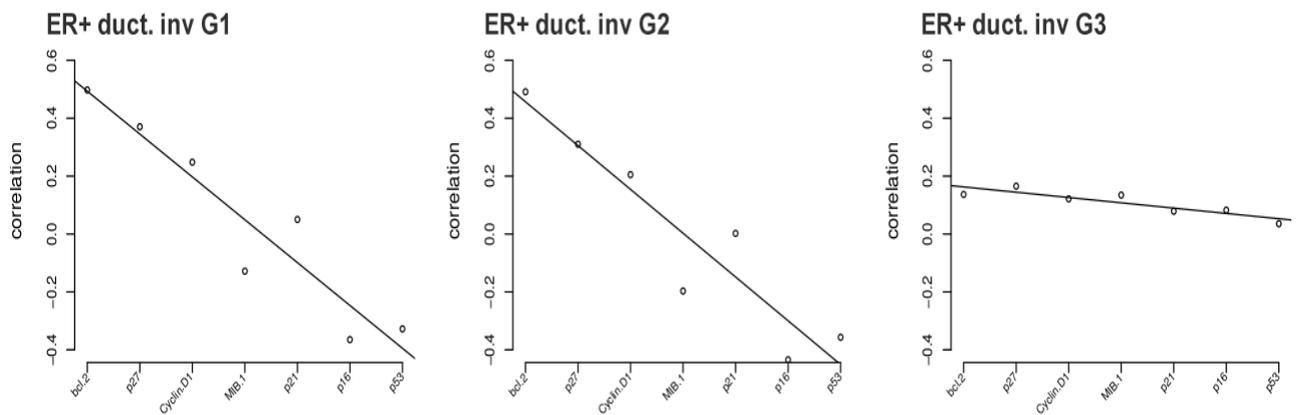


Abb. 22: Permutationstestung für die Korrelation der Kandidatenmarker zum Tumorgrad ausschließlich an ER-positiven Karzinomen

4.5.3 Korrelation der Kandidatenmarker zum intrinsischen Subtyp

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit neueren Einteilungsschemata des invasiven Mammakarzinoms zu erreichen, wurde die Analyse zusätzlich unter Verwendung des sogenannten intrinsischen molekularen Subtyps durchgeführt (Abb. 23). Hierbei zeigten sich letztendlich drei verschiedene Kurvenverläufe in Abhängigkeit vom intrinsischen molekularen Subtyp. Grundsätzlich inverse Kurven ergaben sich für den luminalen A-Subtyp, den Her2-Subtyp, den basalen und den non-expressor-Subtyp. Bezogen auf den Kurvenverlauf lag der luminal B-Subtyp dazwischen. Im Vergleich mit den oben aufgeführten Ergebnissen zeigte der Kurvenverlauf der luminal B-Karzinome eine sehr große Ähnlichkeit zum Kurvenverlauf der invasiv duktales G3-Karzinome.

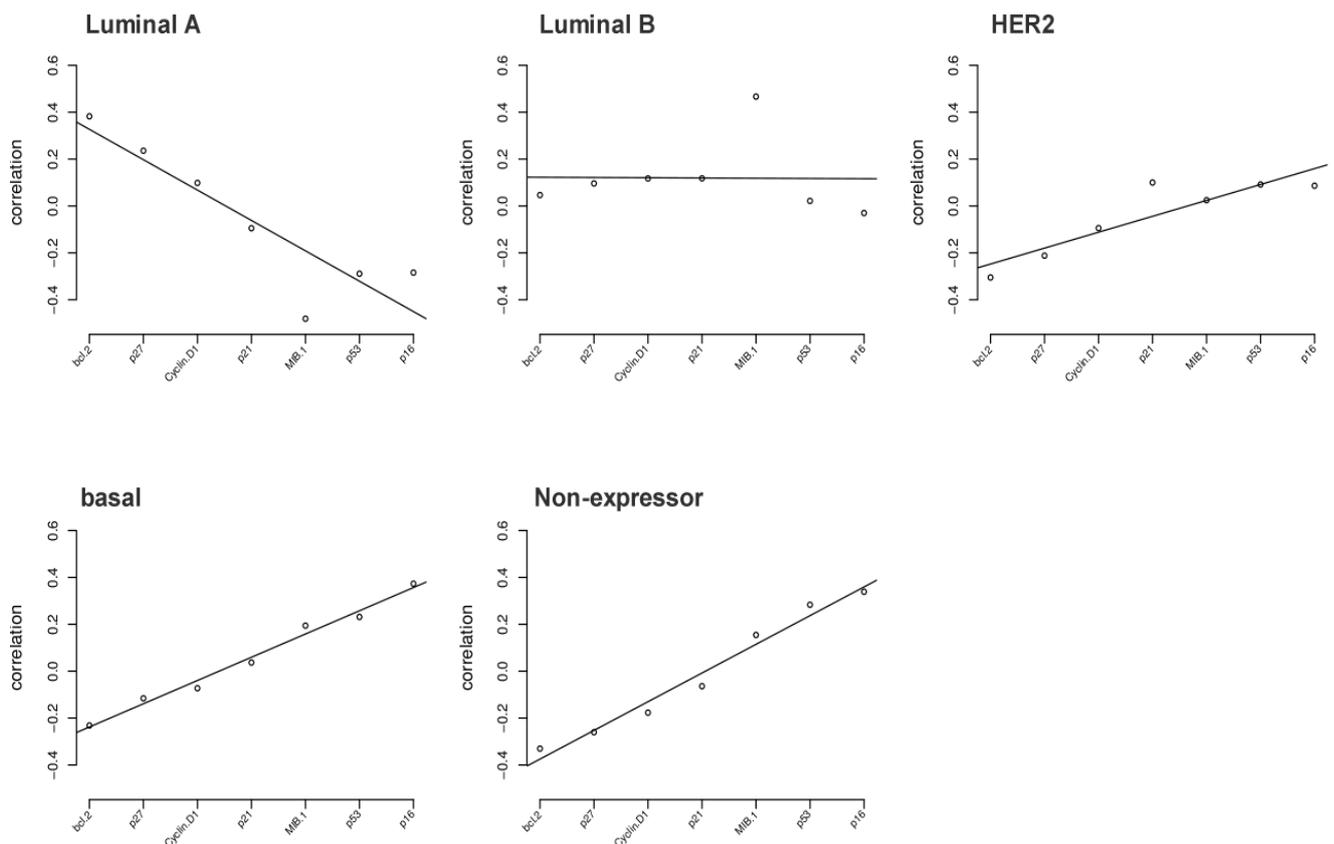


Abb. 23: Permutationstestung für die Korrelation der Kandidatenmarker zum intrinsischen Subtyp im Kollektiv der duktales invasiven Karzinom

4.6 Mikroskopische Bilder der Immunfärbungen

Bcl-2

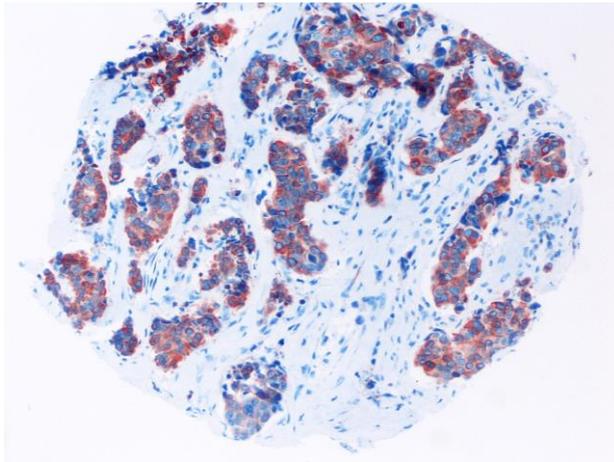


Abb.24: Bcl-2 positiv
100-fache Vergrößerung

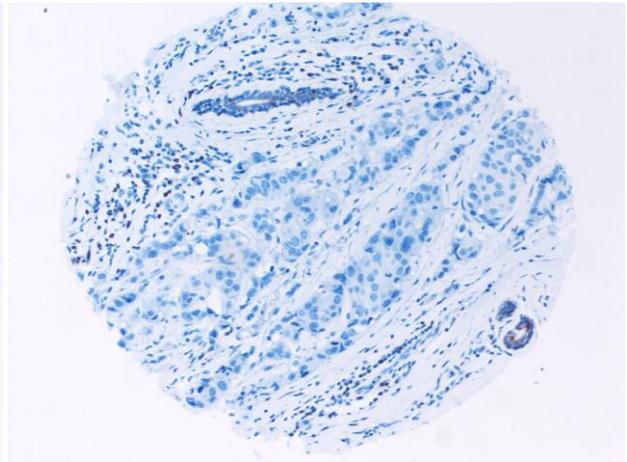


Abb.25: Bcl-2 negativ
100-fache Vergrößerung

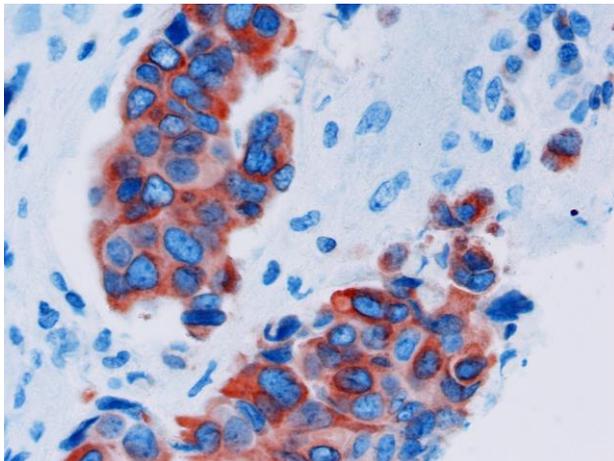


Abb.26: Bcl-2 positiv
400-fache Vergrößerung

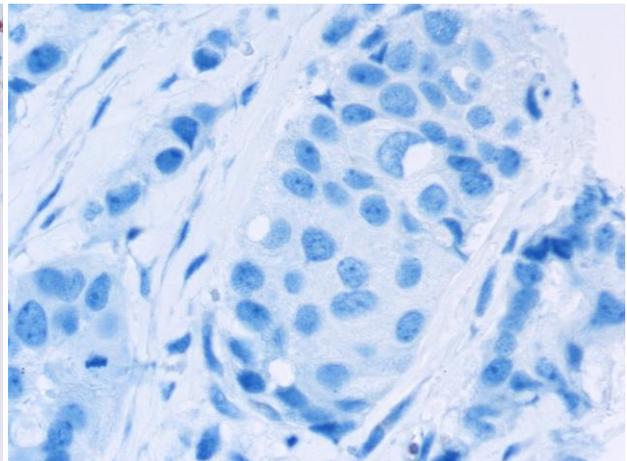


Abb.27: Bcl-2 negativ
400-fache Vergrößerung

Cyclin D1

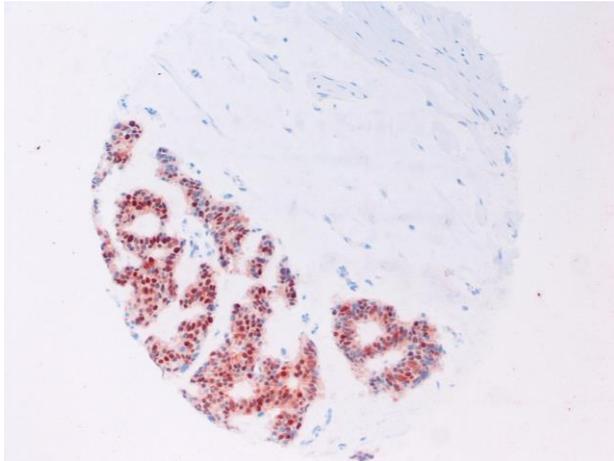


Abb.28: Cyclin D1 positiv
100-fache Vergrößerung

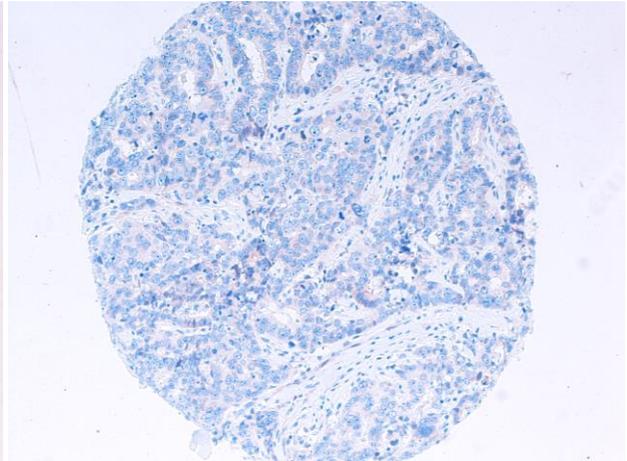


Abb.29: Cyclin D1 negativ
100-fache Vergrößerung

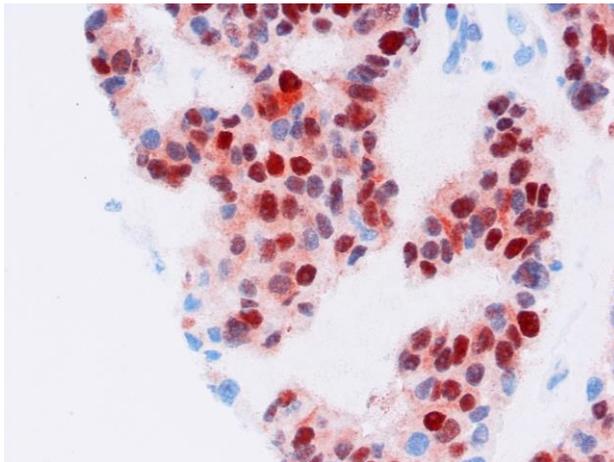


Abb.30: Cyclin D1 positiv
400-fache Vergrößerung

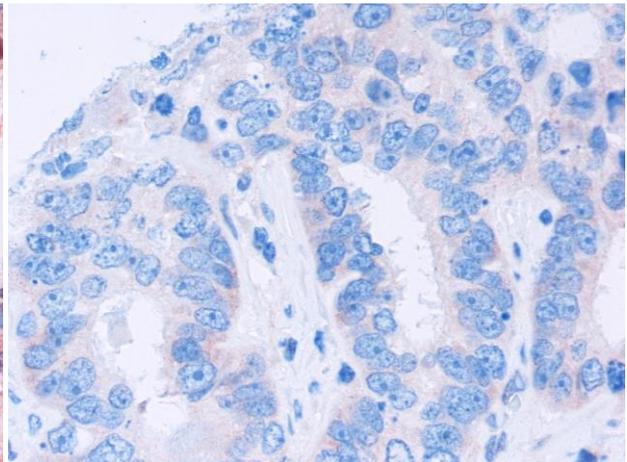


Abb.31: Cyclin D1 negativ
400-fache Vergrößerung

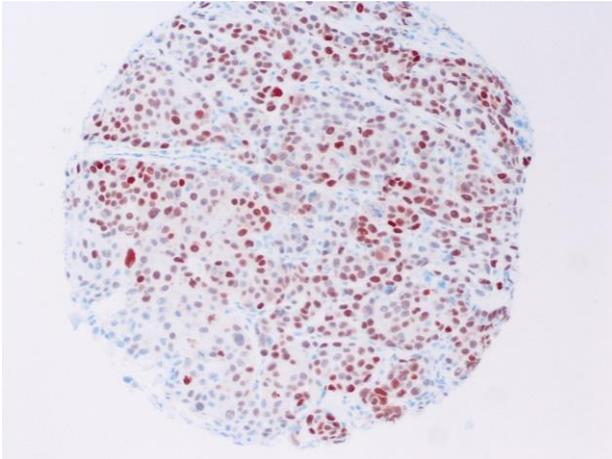
p53

Abb.32: p53 positiv
100-fache Vergrößerung

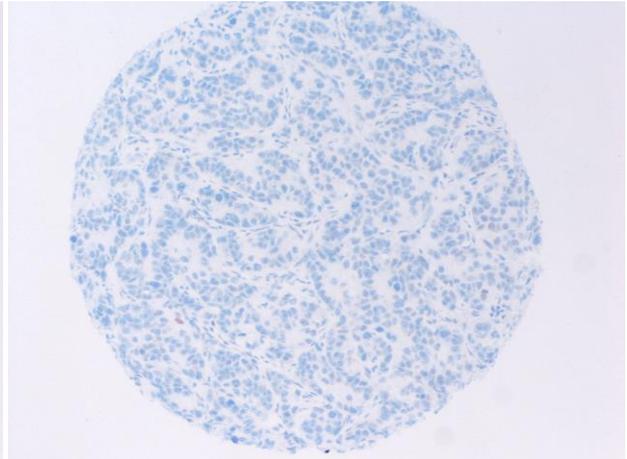


Abb. 33: p53 negativ
100-fache Vergrößerung

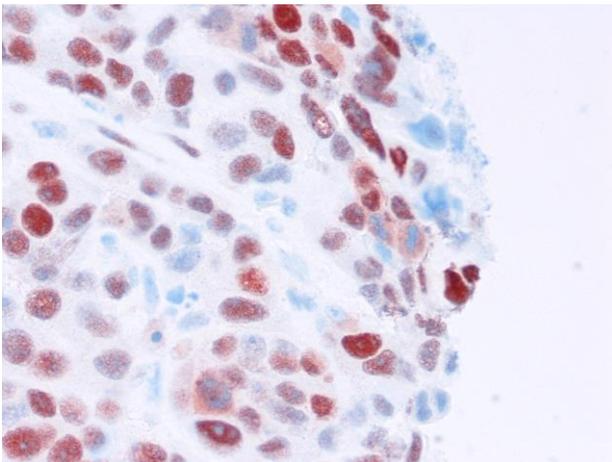


Abb.34: p53 positiv
400-fache Vergrößerung

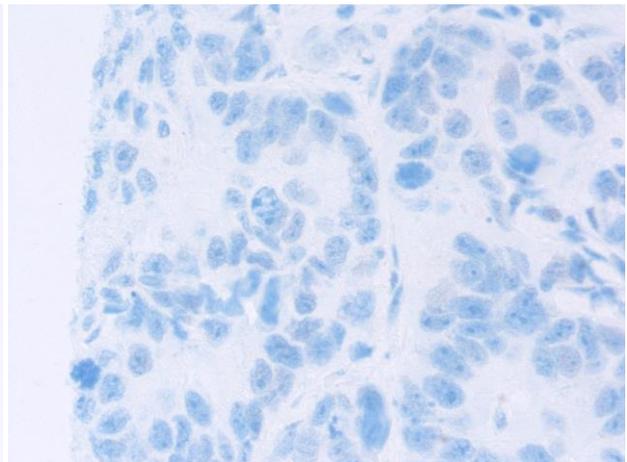


Abb.35: p53 negativ
400-fache Vergrößerung

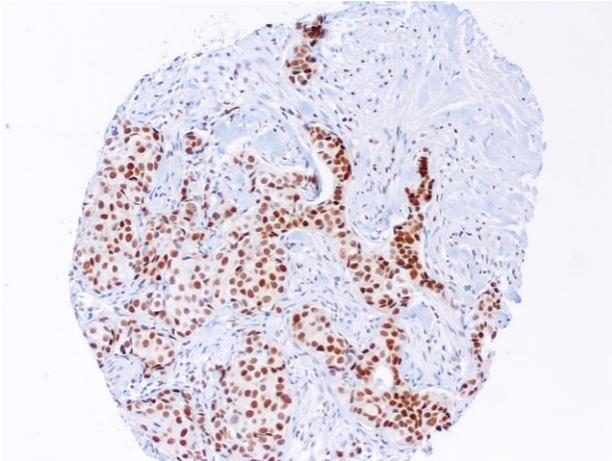
p27

Abb.36: p27 positiv
100-fache Vergrößerung

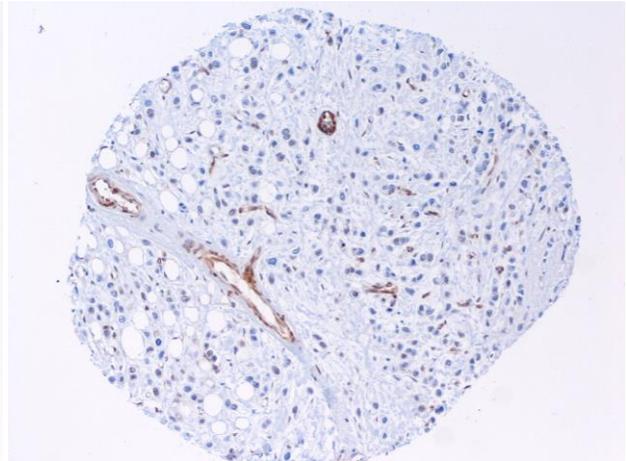


Abb.37: p27 negativ
100-fache Vergrößerung

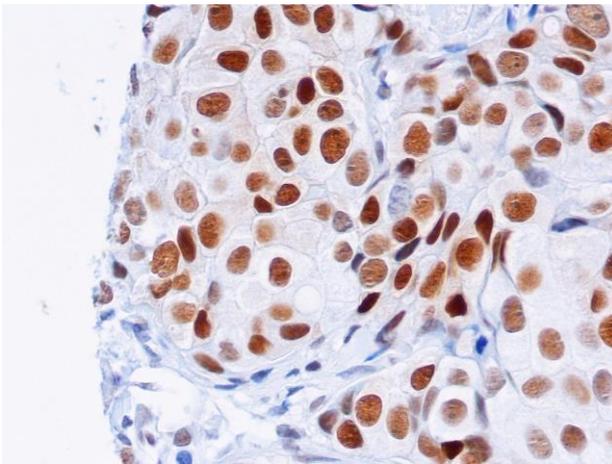


Abb.38: p27 positiv
400-fache Vergrößerung

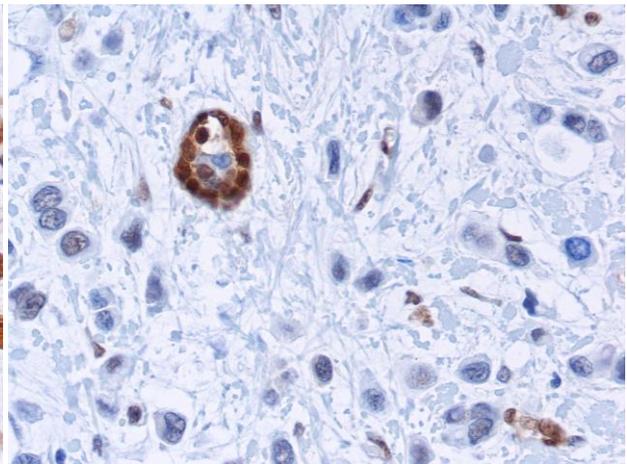


Abb.39: p27 negativ
400-fache Vergrößerung

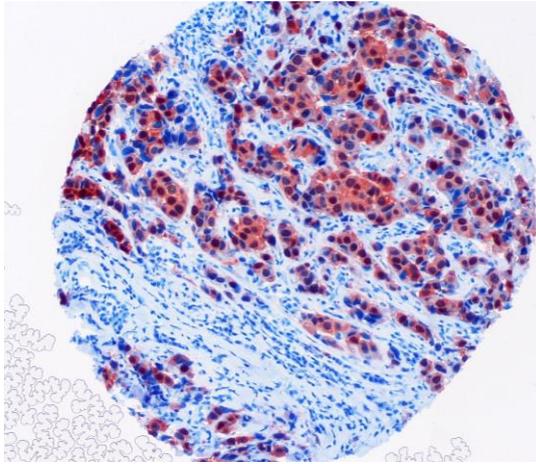
p16

Abb.40: p16 positiv
100-fache Vergrößerung

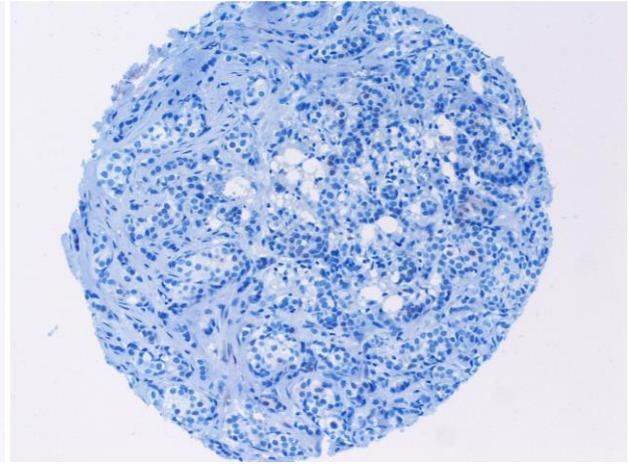


Abb.41: p16 negativ
100-fache Vergrößerung

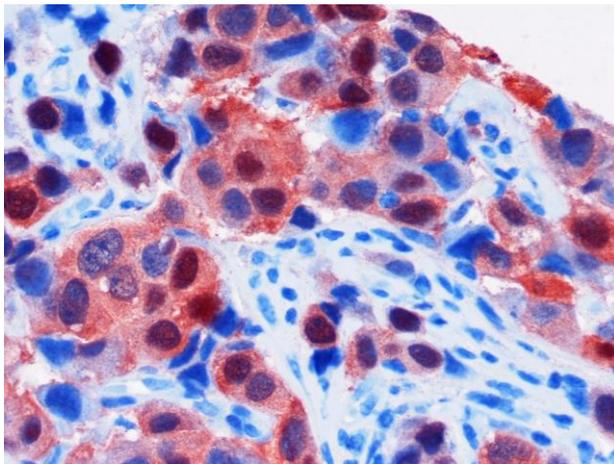


Abb.42: p16 positiv
400-fache Vergrößerung

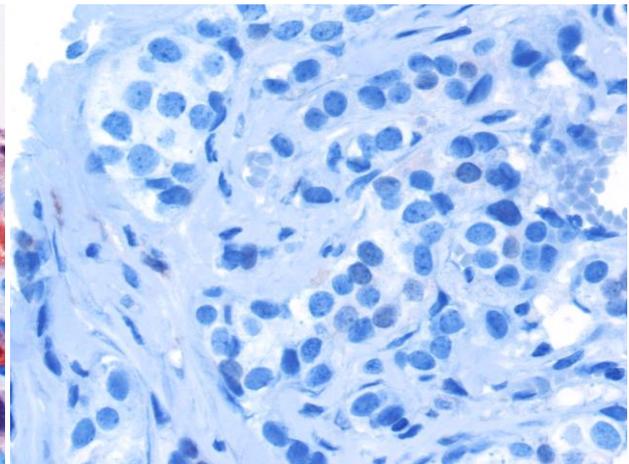


Abb.43: p16 negativ
400-fache Vergrößerung

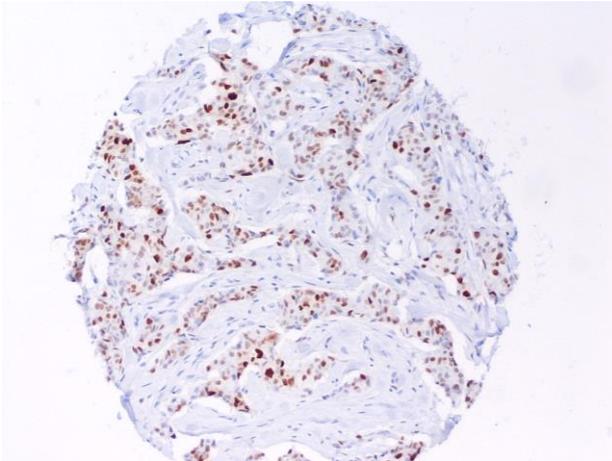
p21

Abb.44: p21 positiv
100-fache Vergrößerung

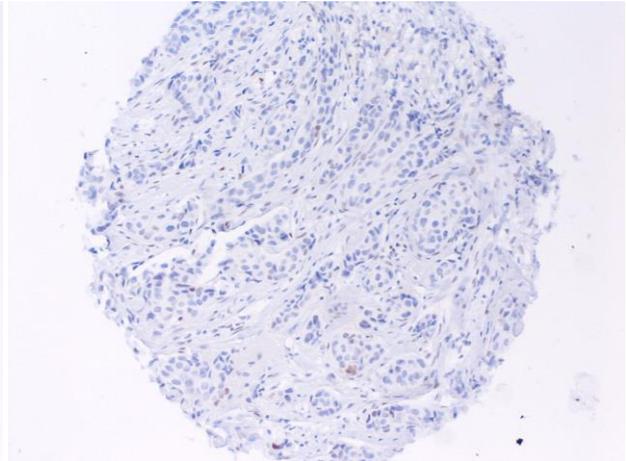


Abb.45: p21 negativ
100-fache Vergrößerung

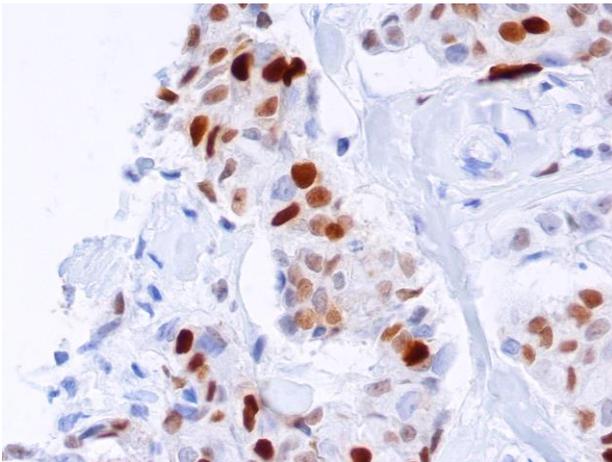


Abb.46: p21 positiv
400-fache Vergrößerung

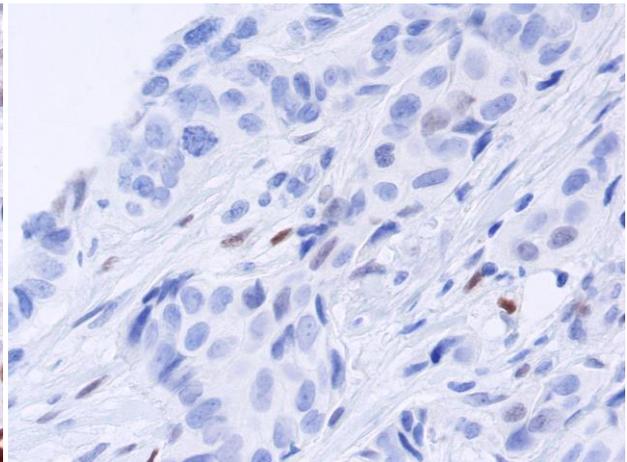


Abb.47: p21 negativ
400-fache Vergrößerung

5. Diskussion

Das invasive Mammakarzinom muss nach den vorliegenden Forschungsergebnissen als sehr heterogene Erkrankung betrachtet werden. Dies äußert sich unter anderem in den sehr unterschiedlichen klinischen Verläufen bei vergleichbaren klinischen Stadien, aber auch in dem „bunten“ Bild auf der morphologischen und molekularen Ebene (DNA, RNA, Protein). Inzwischen gilt es als anerkannt, dass sich die Entwicklung des invasiven Mammakarzinoms, aber auch seiner präinvasiven Vorläufer, entlang einer Vielzahl unterschiedlicher paralleler Entwicklungswege vollzieht. Trotz anderweitiger morphologischer Hinweise galt lange Zeit die vorherrschende Hypothese, dass sich ein DCIS in ein zunächst nicht detektiertes gut-differenziertes Mammakarzinom entwickelt und dass mit entsprechender Zeitdauer dieses sich in ein schlecht-differenziertes Mammakarzinom entdifferenziert. Damit verbunden war unter anderem eine deutliche Steigerung der Tumorzellproliferation sowie der Verlust beziehungsweise der Zugewinn einer Expression bestimmter Differenzierungs-/Tumormarker. Hier können unter anderem ER, HER2, p53 aber noch viele mehr genannt werden. Basierend auf den neueren Erkenntnissen, die eher für verschiedene, parallel ablaufende Entwicklungswege bei der Karzinogenese des Mammakarzinoms sprechen, muss man allerdings davon ausgehen, dass das Expressionsprofil als auch das damit assoziierte bzw. das dem zugrunde liegende genetische Alterationsmuster der Mammakarzinome sehr früh determiniert ist und sich im weiteren Verlauf kaum mehr verändert. Zytogenetische Studien an DCIS und invasiven Mammakarzinomen - speziell die Verteilung von chromosomalen 16q-Verlusten - gaben vor mehr als einem Jahrzehnt Hinweise darauf, dass das Konzept der schrittweisen Entdifferenzierung nicht zu halten war [140]. Unter der gesicherten Annahme, dass Tumorzellen erworbene genetische Alterationen beibehalten und nicht „reparieren“, müssen genetische Alterationen in G1-Karzinomen in gleicher, oder gar höherer Frequenz in G3-Karzinomen nachzuweisen sein. Interessanterweise war allerdings die Häufigkeit von 16q-Verlusten in G1-Karzinomen (DCIS und invasiv) um das Doppelte höher als in G3-Karzinomen. Weitere Studien zeigten, dass die chromosomalen 16q-Verluste zudem mit einer Vielzahl von morphometrischen Faktoren, wie der Absenz von Nekrosen aber auch einer erhöhten Proliferationsrate korrelierten [141]. Chromosomale 16q-Verluste waren zudem mit einer vergleichsweise geringen Frequenz von weiteren genetischen Alterationen assoziiert [142]. Zusätzliche Studien zeigten, dass speziell sog. basale Karzinome als

auch Her2-positive Karzinome eine sehr geringe Häufigkeit von 16q-Verlusten aufwiesen und somit als eigenständige Tumorgruppen anzusehen sind.

Die Entdeckung von 16q-Verlusten in Mammaläsionen und die damit verbundenen neuen Erkenntnisse führten zum Entwurf eines alternativen Tumorprogressionsmodells (siehe Graphik unten). Dieses Modell zeigt die Ausbildung von parallelen, getrennten Entwicklungswegen, für Mammaläsionen mit niedrigem Kernmalignitätsgrad und solchen mit hohem Kernmalignitätsgrad. Auch wenn die Anzahl von Studien, welche sich dem zytogenetischen Alterationsmuster von potentiellen, prämaligen Vorläuferläsionen widmen noch sehr überschaubar ist, sprechen die vorhandenen genetischen und morphologischen Untersuchungen für eine direkte Verbindung zwischen Zylinderzellläsionen, der flachen epithelialen Atypie, der atypischen duktalem Hyperplasie und dem gut differenzierten DCIS [143]. Weitere Studien konnten die Bildung einer eigenständigen Subgruppierung der muzinösen Karzinome im Spektrum der Mammaläsionen mit niedrigem Kernmalignitätsgrad herausarbeiten.

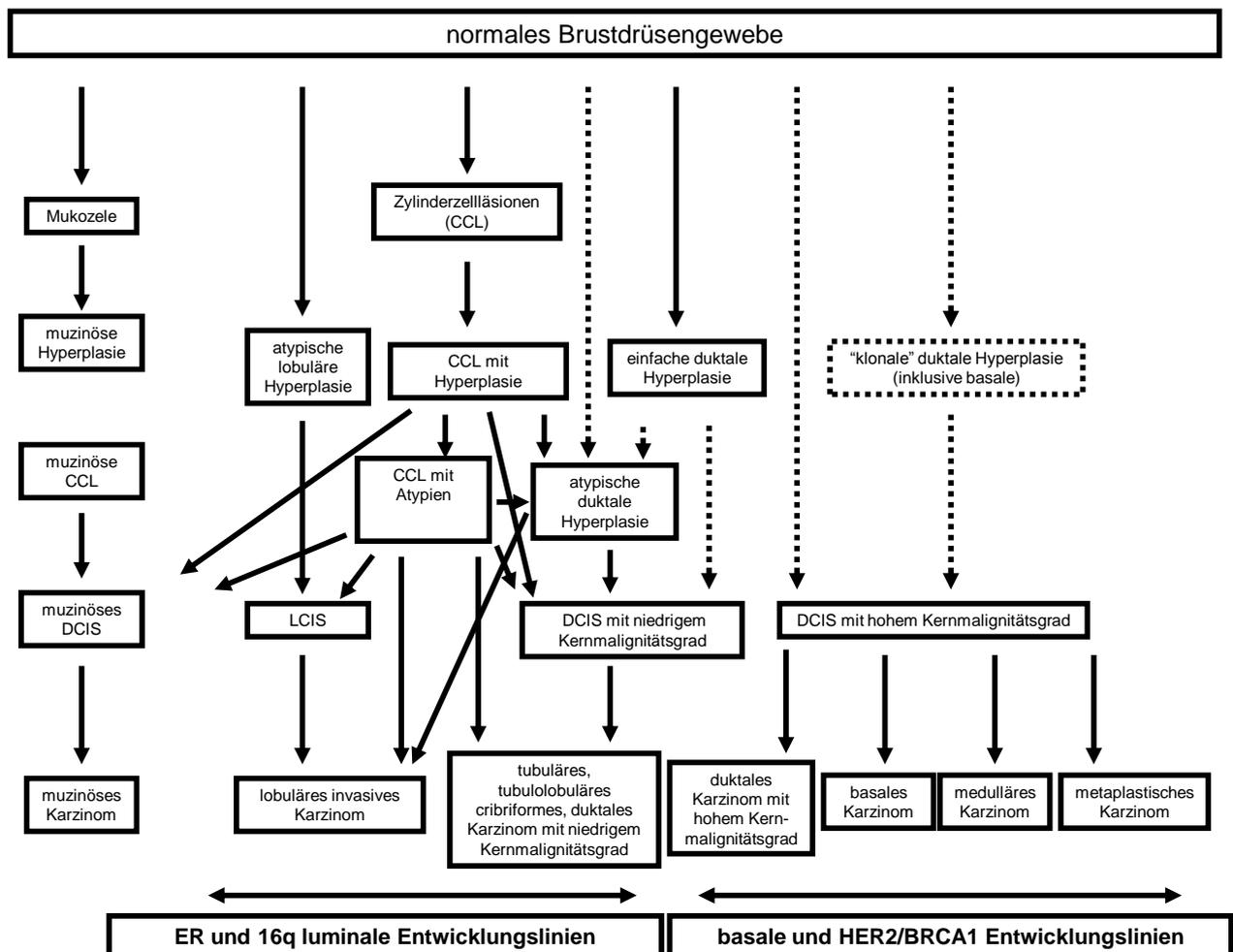


Abb.48: Tumorprogressionsmodell basierend auf neuen Erkenntnissen zur Brustkrebs-Karzinogenese [143]

So ist die Gruppe der muzinösen Karzinome auch als eigenständiger Entwicklungsweg im Tumorprogressionsmodell erfasst.

Diese Befunde wurden mit der Einführung von sog. „Hochdurchsatztechniken“ auf der RNA- und auch auf der DNA-Ebene teilweise verifiziert. Insbesondere die gleichzeitige Analyse der Expression von mehreren 1000 Genen auf der RNA-Ebene (Genexpressions-analyse) durch mehrere internationale Arbeitsgruppen bestätigten erneut die Existenz von zahlreichen, bereits bekannten Mammakarzinomsubtypen. So definierten die Gruppe von Perou et al. lumbale A, lumbale B, normal-breast-like, basale und Her2-positive Mammakarzinome [144]. Andere Forschergruppen konnten die normal-breast-like Karzinome nicht mehr reproduzieren. Eine schnelle Umsetzung der Ergebnisse in den klinischen Alltag scheiterte nicht zuletzt an der fehlenden Vergleichbarkeit der Befunde auf der RNA- und der Proteinebene. So konnten immer wieder Mammakarzinomfälle mit einer Östrogenrezeptorexpression auf der RNA-Ebene und fehlender Expression auf der eigentlich therapeutisch relevanten Proteinebene gefunden werden. Aus klinischer Sicht war diese Technik für prognostische und prädiktive Zwecke nicht geeignet.

Allerdings konnten auf der Proteinebene die entsprechenden Subgruppen relativ problemlos am Tumorgewebe an großen Serien von invasiven Mammakarzinomen reproduziert werden. Es fand sich jedoch neben der luminal A, der luminal B, der basalen und der Her2-Gruppe noch eine Gruppe von schlecht-differenzierten Mammakarzinomen ohne die Expression der relevanten Marker. Entsprechend wurden die Karzinome als sog. „non-expressor“-Gruppe klassifiziert und der bestehenden Klassifikation zugefügt [145]. Nichtsdestotrotz bleibt festzuhalten, dass die genaue Definition der Tumorgruppen problematisch ist. Insbesondere die Abgrenzung zwischen luminal A- und luminal B-Karzinomen macht sich in den meisten Fällen ausschließlich an der Tumorproliferation (Ki-67) fest. Ein konsensfähiger Grenzwert existiert allerdings nicht. Von einzelnen Arbeitsgruppen wurde ein Schwellenwert von 14% als prognostisch relevant beschrieben [138]. Vor dem Hintergrund fehlender, internationaler, allgemein anerkannter Richtlinien zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung als auch der Auswertung der Ki-67-Färbung kann dieser Schwellenwert nur als Einzelmeinung angesehen werden. Auch ist die genaue Definition von luminal B-Karzinomen umstritten. Die in dieser Arbeit verwendete Klassifikation versteht darunter Östrogenrezeptor-positive Karzinome mit hoher Tumorproliferation (Ki-67 >14% aller Tumorzellen) und/oder einer Her2-

Überexpression. Andere Arbeitsgruppen definieren luminal B-Karzinome ohne Einbeziehung von Her2 [144]. Nicht zuletzt ist auch die Definition des basalen Subtyps nicht eindeutig geregelt. Zahlreiche Arbeiten zur Definition des basalen Subtyps beruhten allein auf der Expression eines basalen Markers (Ck 5/14,17, EGFR) ohne Einbeziehung weiterer Marker. Alle diese Probleme können eine Erklärung für sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Prognose der luminalen B Karzinome sein. So zeigten die ersten Arbeiten eine signifikant schlechtere Prognose von luminal B Karzinomen im Vergleich zu luminal A Karzinomen [144]. In einer weitaus größeren Studie aus Nord-Carolina (USA) kehrte sich dieser Effekt allerdings um und die luminal B Karzinome hatten von allen Gruppen die beste Prognose [146].

Trotz aller dieser, vor allem klinisch relevanten Einschränkungen ist die Einteilung für wissenschaftliche Fragestellungen interessant und soll auch in dieser Arbeit verwendet werden. In vielen Übersichtsarbeiten wurde in den vergangenen Jahren immer wieder kritisch bemerkt, dass sich wahrscheinlich die unterschiedlichen Prognosen der einzelnen Subgruppen nur durch eine unterschiedliche Tumorphiliferationsrate bedingen bzw. assoziiert mit dem Tumorgrad, unterscheiden. Weitere Arbeiten postulierten zudem, dass eine pathogenetische Verwandtschaft zwischen dem luminal A- und dem luminal B-Subtyp besteht [147]. Beide Tumorgruppen sind per Definition Östrogenrezeptor-positiv und wiesen in zytogenetischen Studien eine hohe, vergleichbare Rate von 16q-Verlusten auf. Daraus wurde abgeleitet, dass invasive luminal B-Karzinome die Endstufe einer Entdifferenzierung aus invasiven luminal A-Karzinomen darstellen. Eine vor kurzem publizierte Studie konnte jedoch keine Beweise für diese Hypothese finden [148]. Auf der einen Seite fand sich keine Kombination von G1- und G3-Karzinomen in einer signifikanten Anzahl von Fällen. Auch war die Kombination von gut differenzierten DCIS und invasiven luminalen B-Karzinomen eine Seltenheit. Weitere, vermutete Vorläuferläsionen wie Zylinderzellläsionen (CCL) waren ebenfalls in luminal B- und anderen schlecht differenzierten invasiven Mammakarzinomen nachzuweisen. Invasive luminal B-Karzinome waren zudem in ihrer Häufigkeit größenunabhängig, was ebenfalls als Hinweis gegen die Entdifferenzierungshypothese betrachtet werden muss.

Vom molekularen Standpunkt ist die Tumorphiliferation, welche ihren Ausdruck in der Mitoserate oder dem immunhistochemischen Nachweis von Ki-67 findet, als das Endprodukt komplexer Störungen im Zellzyklusablauf anzusehen. Auf der einen Seite handelt es sich um die Aktivierung von Genen, deren Expression zu einer

unkontrollierten Zellproliferation führen kann. Dazu gehören die sog. Onkogene wie z.B. c-myc oder auch Mitglieder der Wachstumsfaktorrezeptoren der Her-Familie. Die bekanntesten sind dabei sicherlich EGFR und Her2 aber auch viele andere. Beim Mammakarzinom zählen zudem BRCA1 und BRCA2 dazu. Auf der anderen Seite führen Mutationen in Genen oder Regelkreisläufen mit einer hemmenden Wirkung auf die Zellproliferation zu einer gesteigerten Zellproliferation. Diese Gene werden generell vereinfachend als Tumorsuppressorgene bezeichnet. Prominente Vertreter sind hierbei speziell beim Mammakarzinom der Transforming Growth Factor- α (TGF- α), aber auch generell Hemmfaktoren des Zellzyklus.

Die theoretisch mögliche und *in vivo* auch zu beobachtende Kombination dieser Expression oder Verlust der Expression führt zu einer unüberschaubaren Vielfalt von Expressionsmustern der entsprechenden Onko- und Tumorsuppressorgene. Interessanterweise wurden jedoch in unterschiedlichen Subgruppen des Mammakarzinoms immer wieder divergente Expressionsmuster gefunden. Vor dem Hintergrund der oben bereits beschriebenen parallelen Entwicklungswege des invasiven Mammakarzinoms muss somit angenommen werden, dass diese Entwicklungswege auch auf unterschiedlichen Störungsmustern im Zellzyklusablauf beruhen.

Da das invasive Mammakarzinom auch heute noch die häufigste Krebserkrankung der Frau darstellt, steht die Erforschung dieser Tumorentität mit dem Ziel neue Erkenntnisse zur Aggressivität, zur Progression sowie zur Prognose des Mammakarzinoms in den klinischen Alltag zu etablieren nach wie vor im Fokus vieler Studien. Je genauer man den Tumor einordnen kann, desto individueller können auch Therapiekonzepte gestaltet werden. So stellt zum Beispiel die Bestimmung der Östrogenrezeptoraktivität einen klinisch hochrelevanten Faktor bezogen auf die Therapieplanung dar. Während Patientinnen mit rezeptorpositiven Mammakarzinomen einen Vorteil von einer adjuvanten endokrinen Therapie ziehen können, sprechen Patientinnen mit rezeptornegativen Karzinomen besser auf eine primäre Chemotherapie an. Speziell für den sehr heterogenen Krankheitsverlauf des Mammakarzinoms ist ein individueller Therapieentscheid zwingend notwendig, um eine Über- beziehungsweise Untertherapie zu vermeiden und damit auch den Patienten/innen die bestmögliche Versorgung zukommen zu lassen.

Obwohl einige Untersuchungen, wie zum Beispiel die Bestimmung der Invasionsfaktoren uPA/PAI, mittlerweile als etablierte Prognosefaktoren zur Standarddiagnostik gezählt werden können, müssen weitere neue Faktoren erforscht, bewertet und in ihrer klinischen Relevanz beurteilt werden, um die klinischen Empfehlungen zur Prognose und Behandlung des Mammakarzinoms zu präzisieren. Vor diesem Hintergrund haben wir sechs potentielle Prognosefaktoren hinsichtlich der genannten Fragestellungen untersucht. Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde die univariate prognostische Relevanz der immunhistochemischen Expression der am Zellzyklus beteiligten Proteine p21, p27, p16, p53, Bcl-2 und CyclinD1, unter Verwendung der „tissue microarray-Methode“ bestimmt.

Die in dieser Arbeit angewandte Tissue Microarray Technik (TMA-Technik) wurde erstmals von Battifora et al. als sogenannte „Sausage-Technik“ beschrieben [149]. Allerdings erwies sich diese Technik als sehr kostenintensiv, und es konnte nur eine begrenzte Anzahl von Gewebeproben gleichzeitig bearbeitet werden. Kononen et al. entwickelte 1998 die TMA-Technik insofern weiter, dass es heute möglich ist, bis zu 600 Gewebeproben auf nur einen Objektträger aufzubringen und diese dann in einem Arbeitsgang immunhistochemisch oder mittels molekularer Methoden zu untersuchen [124]. Es wird dadurch gewährleistet, dass die Schnittpräparate und die darin repräsentierten Tumorproben unter identischen Bedingungen (Temperatur, Inkubationszeit, Antikörperverdünnung, gleicher Schnittdicke usw.) bearbeitet werden können. Die Untersuchungen können somit in sehr kurzer Zeit an sehr großen Kollektiven durchgeführt werden.

Dieses ökonomische Untersuchungsverfahren hat naturgemäß auch Nachteile. So stellt sich theoretisch insbesondere die Frage, ob die Untersuchungsergebnisse von Tumoranteilen bei einem Durchmesser von zum Teil nur 0,6 mm im Vergleich zur Untersuchung des Gesamttumors überhaupt repräsentativ sind. Bei einem Tumor von z.B. 1,3 cm Durchmesser stellt ein Microarray von 0,6 mm unter 1 % (!) der Tumorgesamtfläche dar. Diesbezüglich stellten Packeisen et al. in einer Studie heraus, dass sich bei einer Vergrößerung des Stanzdurchmessers auf 2 mm für Forschungszwecke keine signifikanten Vorteile ergeben [150]. Die Gefahr einer mechanischen Alteration der TMA-Blöcke mit 2 mm Stanzen ist laut dieser Studie sogar erhöht. Auch Skacel et al. zeigten in ihrer Studie, dass ein Array-Durchmesser von 0,6 mm ausreichend ist, um die Expression der hier untersuchten Marker ausreichend

wiederzugeben [151]. Bei immunhistochemischen Markern, die eine heterogene oder herdförmige Expression zeigen, zum Beispiel Progesteron, ist die Übereinstimmung mit der Expression im Gesamttumorgewebe naturgemäß kleiner. Hierbei müssen die Untersuchungsergebnisse grundsätzlich kritischer interpretiert werden, als bei Untersuchungen von Markern mit diffusem Expressionsmuster. Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass diverse Studien in der Literatur einen hohen Grad der Übereinstimmung zwischen Gesamttumor und Array-Probe zeigen [151-153]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spiegeln diese Erfahrungen ebenfalls wieder. Die TMA-Technik ist somit die Methode der Wahl bei der ökonomischen Auswertung großer Tumorkollektive.

Im Rahmen dieser Arbeit fand sich eine prognostische Signifikanz für die Expression von p53, Bcl-2 und p21 sowie in verschiedenen Subgruppen in Abhängigkeit vom Menopausenstatus auch für p16.

Bei einer starken p53-Expression konnte im Gesamtkollektiv als auch in den prä- und postmenopausalen Subgruppen eine statistisch signifikante Verschlechterung der Prognose gezeigt werden. Die prognostische Relevanz der p53-Expression wurde vielfach beschrieben und die Reproduktion dieses Ergebnisses in dieser Arbeit unterstreicht zumindest die generelle Repräsentativität des untersuchten Tumorkollektivs.

Die Auswertung der p21 Überlebenskurven zeigte im Gesamtkollektiv eine statistisch signifikant schlechtere Langzeitüberlebensprognose bei p21-Expression. Dieses Ergebnis konnte auch in der postmenopausalen Subgruppe beobachtet werden. Der jeweilige Überlebensvorteil für Patienten ohne p21-Expression lag bei etwa 10%. Bei prämenopausalen Mammakarzinomen hatte die p21-Expression jedoch keine Relevanz.

Für p21 wurde in verschiedenen Studien ebenfalls eine prognostische Relevanz beschrieben. So stellte eine Studie heraus, dass die Überexpression von p21 mit einer gesteigerten Tumorgroße, einem positivem Nodalstatus sowie einer Verschlechterung der Prognose einhergeht [154] – allerdings existiert auch eine Vielzahl von Berichten, die eine solche Rolle in Abrede stellen [155]. So konnten Domagala et al. in einer

Studie an 222 Mammakarzinomen keine signifikante Korrelation zwischen der p21 Expression und einer Beeinflussung der Gesamtüberlebensrate reproduzieren [156]. Auch die immunhistochemische Untersuchung von 420 Brustkrebsfällen einer finnischen Studie konnte keinen Zusammenhang zwischen dem p21-Expressionslevel und einem Überlebensvorteil aufzeigen [157]. Subgruppenanalysen wiesen darauf hin, dass speziell der p53-Mutationsstatus und/oder eine antihormonelle Therapie die Relevanz von p21 als prognostischen Marker beeinflussen [154]. Eine mutationsbedingte p53 Überexpression führte in einer Untersuchung von Bukholm et al. zu einer signifikanten Senkung der p21-Expressionsrate [158]. Infolge dessen kommt der p21-Expression neben einem prognostischen Wert möglicherweise auch eine prädiktive Bedeutung bezüglich des Ansprechens auf eine adjuvante Chemotherapie zu.

Hingegen konnte die vorliegende Arbeit keinen Hinweis auf die prognostische Relevanz von p27 geben. Im Gesamtkollektiv konnte zwar eine tendenziell bessere Überlebenschance bei einer Expression von p27 aufgezeigt werden, in den Subgruppen (prä- und postmenopausal) lag der Überlebensvorteil allerdings nur bei 5-10%, und erreichte somit keine statistische Signifikanz.

Dies steht im scheinbaren Widerspruch zu einer Vielzahl von Studien, die dem p27-Expressionslevel eine statistische Signifikanz hinsichtlich der prognostischen Relevanz zusprechen. Niedrige Expressionsgrade oder der völlige Verlust der p27-Expression werden hierbei mit einer statistisch signifikant reduzierten Überlebensrate in Verbindung gebracht. Diese wird scheinbar induziert durch eine gesteigerte Tumorprogression, verbunden mit einer schlechteren Prognose [159]. Die reduzierte/fehlende p27-Expression weist hiernach eine starke Korrelation mit einem hohen histopathologischen Tumorgrad und einer fehlenden Tumordifferenzierung auf [160]. Es ist jedoch zu betonen, dass auch hierzu Einzelstudien mit einer Vielzahl von divergierenden Ergebnissen existieren. In einer 5-Jahres-Follow-up Studie fanden Volpi et. al an einer Serie von 286 Brustkrebsfällen zwar einen leichten Effekt einer fehlenden p27-Expression auf die Gesamtüberlebensrate, dieser Effekt war jedoch -ähnlich unseren Ergebnissen- nicht signifikant [161]. Meta-Analysen deuten jedoch insgesamt auf einen prognostischen Wert (Gesamt- und Krankheitsfreiesüberleben) hin [162].

Für die Expression von Bcl-2 zeigte sich in unseren Ergebnissen im Gesamtkollektiv, als auch in der Subgruppenanalyse der prä- und postmenopausalen Karzinome, eine sehr frühe Trennung von Patientinnen mit guter und schlechter Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens. Die Expression von Bcl-2 war hierbei, unabhängig von der Expressionsstärke und der Anzahl der positiv gefärbten Zellen, mit einer statistisch signifikant besseren Prognose assoziiert. Diese führte in einzelnen Phasen der Nachbeobachtung bis zu einer 20% verbesserten Prognose. Zwar scheint sich die Relevanz nach 10 und mehr Jahren Nachbeobachtungszeit langsam zu verlieren, war aber in prä- und postmenopausalen Mammakarzinomen gleichermaßen nachzuweisen.

Diese Ergebnisse bestätigen die Erfahrungen aus der jüngsten Literatur. Meta-Analysen von Callagy et al. aus dem Jahr 2008 mit einer Gesamtfallzahl von 5892 Brustkrebsproben und einem gemittelten Nachbeobachtungszeitraum von 92,1 Monaten kamen zu dem eindeutigen Ergebnis, Bcl-2 als unabhängigen prognostischen Faktor anzuerkennen. Sie zeigten, dass die prognostische Rolle des Bcl-2 unabhängig vom Lymphknotenstatus, der Tumorgöße und dem Tumorgrad war [163]. Auch Hwang et al. konnten dieses Ergebnis in ihrer Studie an 7230 primären Mammakarzinomen reproduzieren [164]. Allerdings gibt es auch Studien die zumindest die unabhängige prognostische Relevanz der Bcl-2 Expression in Frage stellen [165].

Die pathogenetische, prognostische und prädiktive Bedeutung von Bcl-2 rückte in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Wissenschaft. So stellt die Expression von Bcl-2 als „anti-apoptotisches“ Signal, eine erste Alteration in frühen Vorläuferläsionen des invasiven Mammakarzinoms wie den Zylinderzellläsionen und gut-differenzierten DCIS dar [166]. Weitere damit verbundene genetische Veränderungen sind erst in Ansätzen bekannt. Dennoch wird die Expression von Bcl-2 in diesen Läsionen als Hinweis für ein neoplastisches Geschehen gewertet.

Dem Bcl-2 Protein kommt, als Mitglied der Bcl-Familie, eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose zu. Als wichtigster Vertreter dieser Familie ist das Bcl-2-Protein als Inhibitor der Apoptose bekannt. Seine anti-apoptotische Wirkung ist hinreichend belegt.

Das „tumorfördernde“ Potential von Bcl-2 wurde in Tiermodellen belegt und wird zusätzlich unterstützt durch eine Reihe von Studien an Karzinomen verschiedener Organe in denen Bcl-2 als Onkogen fungiert [167, 168]. Die verstärkte Bcl-2-Expression

führt hiernach zu einer reduzierten Ansprechbarkeit der Zellen auf Apoptose-Reize, was über die nun ungehemmte Zellproliferation zur Tumorförderung beiträgt.

Im Gegensatz zu dieser bekannten Funktion fungiert das Bcl-2-Protein jedoch vermutlich paradoxerweise in vielen Tumoren, unter anderem auch an Mammakarzinomen, als eine Art Tumorsuppressor. Dieser Tumorsuppressor-Effekt bewirkt anscheinend eine Korrelation zwischen der Bcl-2-Expression und positiven klinisch-pathologischen Prognosefaktoren wie zum Beispiel einem niedrigen Tumorgrad und einem positiven Östrogenrezeptor-Status [169].

Die biologischen Mechanismen der prognostischen Relevanz von Bcl-2 bleiben bislang ungeklärt. Ob die prognostische Rolle von Bcl-2 Folge seiner Rolle als Onkogen ist oder vielleicht seiner paradoxen Tumorsuppressor-Wirkung zuzuschreiben ist, konnte bislang nicht entschlüsselt werden.

Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, dass die Bcl-Familie über 30 verschiedene Proteine beinhaltet, von denen jedes einzelne entweder pro-apoptotische oder anti-apoptotische Funktionen erfüllt, erscheint es wahrscheinlicher, dass dem Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen eine gesteigerte Relevanz bezüglich der Tumorprogression zukommt als der Überexpression eines einzelnen Familienmitglieds.

Alles in allem ist festzuhalten, dass obwohl Störungen im Zellzyklus (genauer im Apoptose-Prozess) nachgewiesenermaßen einen wichtigen Faktor in der Tumorentwicklung darstellen, weitere Arbeiten nötig sind um nachzuvollziehen, in welcher genauen Wirkungskaskade die bekannten oder auch weitere, noch unbekannte Apoptosegene in diesem komplexen Prozess verwickelt sind.

Weitere Studien zeigten zudem, dass der Expression von Bcl-2 eine wesentliche prädiktive Bedeutung in der Behandlung des invasiven Mammakarzinoms zukommt. Für eine spezielle Subgruppe des invasiven Mammakarzinoms ist die Entscheidung für eine adjuvante Chemotherapie schwierig, da viele der Patientinnen von einer adjuvanten Chemotherapie nicht profitieren, sondern vielmehr die Nebenwirkungen ohne prognostischen Nutzen erfahren. Dies betrifft insbesondere postmenopausale Patientinnen mit kleinen, Östrogenrezeptor-positiven, G2-Mammakarzinomen. Eine Vielzahl von neuen, auf RNA-Expressionsprofilen beruhenden Ansätzen wurde im letzten Jahrzehnt entwickelt, um dieses Dilemma zu umgehen. Das Verfahren mit der größten Verbreitung ist der sogenannte OncotypeDx^R-Test [170]. Dieses Verfahren

bestimmt die Expression von insgesamt 21 Genen aus verschiedenen zellulären Pathways auf der RNA-Ebene. Darunter fällt auch eine Gruppe von Genen, die dem Östrogenrezeptor-Pathway zugeordnet wird, inklusive Bcl-2. Diese Gruppe von Genen erhält eine vergleichsweise hohe Gewichtung in der Erstellung des spezifischen Scores. Ob die Aussagekraft dieser Verfahrensweise bezüglich der Therapieabschätzung mittels etablierter pathomorphologischer Parameter überlegen ist, muss die Zukunft in Form von prospektiven Studien erst noch zeigen. Dies geschieht auch vor dem Hintergrund der Tatsache, dass eine Arbeitsgruppe aus Nottingham eine ähnliche Therapieabschätzung mittels des Tumorgades und der Einbeziehung der Bcl-2-Expression erreichen konnte [171].

In einem weiteren Ansatz dieser Arbeit wurden die Expressionsprofile einem biomathematischen Samplingverfahren unterworfen.

Letztendlich beruht die Darstellung der im Ergebnisteil dargelegten Kurven auf einer vergleichsweise simplen Visualisierung aller Korrelationskoeffizienten in bestimmten Subgruppen. Die gezeigten Ergebnisse stützen die Hypothese von multiplen Entwicklungswegen des invasiven Mammakarzinoms.

Hierbei wurden in einem ersten Ansatz invasiv duktale Karzinome mit unterschiedlichen Malignitätsgraden (G1-G3) untersucht. Interessanterweise zeigten sich sehr ähnliche Kurvenverläufe für invasiv duktale G1- und G2-Karzinome. Hingegen wiesen invasiv duktale G3-Karzinome ein komplett anderes Verhalten des Kurvenverlaufes auf. Hätte man dies noch möglicherweise auf den Einfluss des Östrogenrezeptors (fehlende Expression in basalen und vielen Her2-positiven Karzinomen) schieben können, zeigte der zweite Analyseschritt ein gleichartiges Ergebnis. Die Betrachtung der Ergebnisse dieser Analyse ergab wiederum, dass ER-positive, invasiv duktale G1- und G2-Karzinome ein gleichsinniges Expressionsmuster aufwiesen. Dies stand im scharfen Kontrast zu ER-positiven, invasiv duktalem G3-Karzinomen. ER-positive invasiv duktale G-Karzinome zeigten wiederum ein gegensätzliches Muster.

In einer weiteren Analyse wurden die Korrelationskoeffizienten mit den intrinsischen Subtypen korreliert. Hierbei ergaben sich drei unterschiedliche Muster. Auf der einen Seite standen die luminal A-Karzinome, daneben die Gruppe der Her2, der basalen sowie der non-expressor-Karzinome und dazwischen mit einem eigenen Muster die luminalen B-Karzinome.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die erhöhte Tumorzellproliferation (verglichen zum Normalgewebe) in den verschiedenen Subgruppen auf jeweils unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen ist. Auch erscheint eine schrittweise Dedifferenzierung, das heißt ein Progress von gut zu schlecht differenzierten Karzinomen, eher unwahrscheinlich. Wäre dies der Fall, wäre nicht so ein gegensätzlicher Verlauf der Kurven zu erwarten. Vielmehr wäre ein „langsames Kippen“ der Kurven von G1 nach G3 über G2 zu erwarten gewesen.

Auf eine biologische Ebene übertragen würde dies bedeuten, dass die bekannte Steigerung der Tumorzellproliferation, die mit einem Progress von G1 nach G3 verbunden wäre, mit einer schrittweisen Veränderung der Expression, der an der Zellproliferation beteiligten Gene einhergehen würde. Dies scheint aber wie oben dargelegt nicht der Fall zu sein und invasiv duktales G3-, Östrogenrezeptor-positive und -negative Karzinome erscheinen somit eher als eigenständige Subgruppe im großen Spektrum der invasiven Mammakarzinome, als eine Endstufe der Entdifferenzierung von gut-differenzierten, Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen.

Die genauere Betrachtung der Kurven zeigte zudem, dass von den hier gewählten Markern vor allem Bcl-2 und p27, die das Gesamtbild bestimmenden Parameter waren und eine positive Korrelation mit einem niedrigen Tumorgrad, dem luminalen A-Subtyp sowie der Östrogenrezeptorexpression verbunden war. Das andere Ende des Spektrums wurde in allen Subgruppenanalysen von p53 bestimmt.

Die Ergebnisse der Permutationsanalysen zeigen, dass der Tumorzellproliferation sowie der Apoptose eine wesentliche Rolle in der Charakterisierung der verschiedenen Subtypen des invasiven Mammakarzinoms zukommen.

Es bedarf einer Vielzahl von weiteren Studien, um zu zeigen, inwieweit weitere, alterierte Regelkreisläufe wie beispielsweise die Immunabwehr, die Angiogenese, und die Telomeraseaktivierung die doch sehr unterschiedlichen Verhaltensmuster auf der morphologischen, der immunhistochemischen und klinischen Ebene der verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms beeinflussen beziehungsweise prägen.

6.Schriftenverzeichnis

1. Hiddemann W and Bartram CR, *Die Onkologie Teil.1 Allgemeiner Teil: Epidemiologie, Pathogenese, Grundprinzipien der Therapie*. Vol. 2 aktualisierte Auflage. 2010, Heidelberg: Springer Verlag. 729 p.
2. Regierer AC and Possinger K, *Mammakarzinom Manual Diagnostik und Therapie, Morphologische Grundlagen, Histologie*. 2005, Köln: Deutscher Ärzteverlag GmbH. 141 p., p.19-29.
3. Bäumer R and Maiwald A, *Thiemes onkologische Pflege 2008*, Systematik der Tumoren, Stuttgart: Thieme Verlag 428 p., p.91-93.
4. Silverstein MJ, *Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: Controversial Issues*. *Oncologist*, 1998. 3(2): p. 94-103.
5. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, *World Cancer Report, Lyon*. 2008.
6. Ferlay J, Shin H, Bray F, et al., *Globocan 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. 2010.
7. World Health Organization, *WHO Classification of Tumors of the Breast*. Vol. 4. 2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 500 p.
8. Tumorregister, *Tumor Manual Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, 2011: München, 13.Auflage, 340 p.
9. Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister (Hrsg), *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*, in *Krebsregister 2010*: Berlin, 7.Auflage.
10. Kraywinkel K, *Epidemiologie des Brustkrebs*. Epidemiologisches Krebsregister NRW, 2007.
11. National Cancer Institute, *Cancer Advances In Focus: Breast Cancer*, 2008, National Cancer Institute.
12. Kreienberg R, *Interdisziplinäre S-3 Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* 2009, München: Zuckschwerdt-Verlag.
13. Rolao A, Monteiro-Grillo I, Camilo ME, et al., *[What is the nutrition and lifestyle profile in oncology patient? Cross-sectional study]*. *Acta Med Port*, 2011. 24 Suppl 2: p. 113-22.
14. Kreienberg R, Möbus V, Jonat W, et al., *Mammakarzinom Interdisziplinär*. Vol. 4.Auflage. 2010, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 398 p.
15. Dunn BK, Wickerham DL and Ford LG, *Prevention of hormone-related cancers: breast cancer*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2005. 23(2): p. 357-67.

16. Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, et al., *Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women*. J Natl Cancer Inst, 2006. 98(19): p. 1406-15.
17. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, et al., *Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women*. J Natl Cancer Inst, 2004. 96(24): p. 1856-65.
18. Santen R, Cavalieri E, Rogan E, et al., *Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1155: p. 132-40.
19. Santen RJ, *Assessing individual risk for breast cancer: role of oestrogens and androgens*. Breast Cancer Res, 2008. 10 Suppl 4: p. S10.
20. Gorski JJ, Kennedy RD, Hosey AM, et al., *The complex relationship between BRCA1 and ERalpha in hereditary breast cancer*. Clin Cancer Res, 2009. 15(5): p. 1514-8.
21. Yager JD and Davidson NE, *Estrogen carcinogenesis in breast cancer*. The New England journal of medicine, 2006. 354(3): p. 270-82.
22. Yue W, Santen RJ, Wang JP, et al., *Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. 86(3-5): p. 477-86.
23. Remmele W, Kreipe HH and Klöppel G, *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. Vol. 3.Auflage. 2012, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 819 p.
24. *Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies*. Lancet Oncol, 2012. 13(11): p. 1141-51.
25. Patterson RE, Rock CL, Kerr J, et al., *Metabolism and Breast Cancer Risk: Frontiers in Research and Practice*. J Acad Nutr Diet, 2012.
26. Stoll BA, *Adiposity as a risk determinant for postmenopausal breast cancer*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. 24(5): p. 527-33.
27. Bulun SE, Chen D, Moy I, et al., *Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction*. Trends Endocrinol Metab, 2012. 23(2): p. 83-9.
28. Wu AH, Vigen C, Razavi P, et al., *Alcohol and Breast Cancer Risk among Asian American Women in Los Angeles County*. Breast Cancer Res, 2012. 14(6): p. R151.
29. Brooks PJ and Zakhari S, *Moderate Alcohol Consumption and Breast Cancer in Women: From Epidemiology to Mechanisms and Interventions*. Alcohol Clin Exp Res, 2012.

30. Braga C, Negri E, La Vecchia C, et al., *Cigarette smoking and the risk of breast cancer*. Eur J Cancer Prev, 1996. 5(3): p. 159-64.
31. Reynolds P, *Smoking and Breast Cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia. Cancer Prevention Institute of California 2013 Mar; 18(1):15-2
32. Beckmann MW, Kahmann L, Strehl J, et al., *Vorstufen des Mammakarzinoms*. Der Gynäkologe, 2010. 43(9): p. 757-771.
33. Martel M, Barron-Rodriguez P, Tolgay Ocal I, et al., *Flat DIN 1 (flat epithelial atypia) on core needle biopsy: 63 cases identified retrospectively among 1,751 core biopsies performed over an 8-year period (1992-1999)*. Virchows Arch, 2007. 451(5): p. 883-91.
34. Bocker W, Hungermann D, Weigel S, et al., *[Atypical ductal hyperplasia and atypical epithelial proliferation of ductal type]*. Pathologe, 2009. 30(1): p. 42-8.
35. Zhou WB, Xue DQ, Liu XA, et al., *The influence of family history and histological stratification on breast cancer risk in women with benign breast disease: a meta-analysis*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2011. 137(7): p. 1053-60.
36. Marshall LM, Hunter DJ, Connolly JL, et al., *Risk of breast cancer associated with atypical hyperplasia of lobular and ductal types*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 1997. 6(5): p. 297-301.
37. Bibeau F, Borrelly C, Chateau MC, et al., *[Recent data on lobular neoplasia of the breast: the pathologist's opinion]*. Bull Cancer, 2005. 92(5): p. 453-8.
38. Cowin P, Rowlands TM and Hatsell SJ, *Cadherins and catenins in breast cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2005. 17(5): p. 499-508.
39. Nahrig J, *[Practical problems in breast screening. Columnar cell lesions including flat epithelial atypia and lobular neoplasia]*. Pathologe, 2008. 29 Suppl 2: p. 172-7.
40. Sigal-Zafrani B, Vincent-Salomon A, Penault-Llorca F, et al., *[Lobular neoplasia]*. Ann Pathol, 2003. 23(6): p. 547-53.
41. Meloni GB, Becchere MP, Soro D, et al., *[Lobular carcinoma in situ: the mammographic aspects and the therapeutic problems]*. Radiol Med, 1996. 91(4): p. 360-3.
42. Tavassoli F and Devilee P, *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. WHO (2003) World Health Organization Classification of Tumours 2003, Lyon. 9–112.
43. Brattbauer GL and Tavassoli FA, *Lobular intraepithelial neoplasia: previously unexplored aspects assessed in 775 cases and their clinical implications*. Virchows Arch, 2002. 440(2): p. 134-8.

44. Cocquyt V and Van Belle S, *Lobular carcinoma in situ and invasive lobular cancer of the breast*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005. 17(1): p. 55-60.
45. Fisher ER, Land SR, Fisher B, et al., *Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: twelve-year observations concerning lobular carcinoma in situ*. Cancer, 2004. 100(2): p. 238-44.
46. Tumorzentrum München W, *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Manual Mammakarzinome, 2007:W.Zuckerschwedt-Verlag 340 p.
47. Patchefsky AS, Schwartz GF, Finkelstein SD, et al., *Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast*. Cancer, 1989. 63(4): p. 731-41.
48. Bobrow LG, Happerfield LC, Gregory WM, et al., *The classification of ductal carcinoma in situ and its association with biological markers*. Semin Diagn Pathol, 1994. 11(3): p. 199-207.
49. Lenington WJ, Jensen RA, Dalton LW, et al., *Ductal carcinoma in situ of the breast. Heterogeneity of individual lesions*. Cancer, 1994. 73(1): p. 118-24.
50. Ottesen GL, *Carcinoma in situ of the female breast. A clinico-pathological, immunohistological, and DNA ploidy study*. APMIS Suppl, 2003(108): p. 1-67.
51. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al., *WHO Classification of Tumors of the Breast*. Ductal Carcinoma in situ, ed. S.J. Schnitt, et al. Vol. 4. 2012, Lyon: International Agency for Research on Cancer. 240S.
52. Kerlikowske K, *Epidemiology of ductal carcinoma in situ*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2010. 2010(41): p. 139-41.
53. Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K, et al., *Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast*. JAMA, 1996. 275(12): p. 913-8.
54. Ernster VL, Ballard-Barbash R, Barlow WE, et al., *Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography*. J Natl Cancer Inst, 2002. 94(20): p. 1546-54.
55. Tavassoli F and Devilee P, World Health Organisation, *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast* 2003.
56. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, et al., *Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants*. Cancer, 1993. 71(8): p. 2507-14.
57. Gemeinsamer Bundesausschuss des Bundesministeriums für Gesundheit , *Krebsfrüherkennungsrichtlinie*. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses, 2011.
58. Petru E, Fink D, Jonat W, et al., *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Vol. 2.Auflage. 2009: Springer Medizin Verlag, 330 p.

59. Albert U S, Altland H, Duda V, et al., *2008 update of the guideline: early detection of breast cancer in Germany*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2009. 135(3): p. 339-54.
60. Pfarl G and Helbich T H, [*Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS)--German version*]. Rofo, 2002. 174(7): p. 921-6.
61. Soo M S, Baker J A, Rosen E L, et al., *Sonographically guided biopsy of suspicious microcalcifications of the breast: a pilot study*. AJR Am J Roentgenol, 2002. 178(4): p. 1007-15.
62. Costantini M, Belli P, Ierardi C, et al., *Solid breast mass characterisation: use of the sonographic BI-RADS classification*. Radiol Med, 2007. 112(6): p. 877-94.
63. Kaiser W A, [*MR mammography*]. Radiologe, 1993. 33(5): p. 292-9.
64. Ercolani P, Valeri G and Amici F, *Dynamic MRI of the breast*. Eur J Radiol, 1998. 27 Suppl 2: p. S265-71.
65. Mann R M, Hoogeveen Y L, Blickman J G, et al., *MRI compared to conventional diagnostic work-up in the detection and evaluation of invasive lobular carcinoma of the breast: a review of existing literature*. Breast Cancer Res Treat, 2008. 107(1): p. 1-14.
66. Mann R M, *The effectiveness of MR imaging in the assessment of invasive lobular carcinoma of the breast*. Magn Reson Imaging Clin N Am, 2010. 18(2): p. 259-76, ix.
67. Fischer U, von Heyden D, Vosshenrich R, et al., [*Signal characteristics of malignant and benign lesions in dynamic 2D-MRT of the breast*]. Rofo, 1993. 158(4): p. 287-92.
68. Bauerfeind I, Scheich D, Artmann A, et al., *Manual Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Bildegebende und interventionelle Diagnostik, ed. D. Scheich, et al. Vol. 13.Auflage. 2011, München: W. Zuckerschweidt Verlag 334 S.
69. Singletary S E, *Surgical margins in patients with early-stage breast cancer treated with breast conservation therapy*. Am J Surg, 2002. 184(5): p. 383-93.
70. Clarke M, Collins R, Darby S, et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. 366(9503): p. 2087-106.
71. Kreienberg R, Jonat W, Möbus V, et al., *Mammakarzinom Interdisziplinär. Operative Therapie-Brusterhaltende Therapie und Mastektomie*, ed. T. Kühn. Vol. 4.Auflage. 2010, Heidelberg/Berlin: Springer Verlag.
72. Jatoi I and Proschan M A, *Randomized trials of breast-conserving therapy versus mastectomy for primary breast cancer: a pooled analysis of updated results*. Am J Clin Oncol, 2005. 28(3): p. 289-94.

73. Goldhirsch A, Ingle J N, Gelber R D, et al., *Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009*. *Ann Oncol*, 2009. 20(8): p. 1319-29.
74. Kreienberg R, Jonat W, Möbus V, et al., *Mammakarzinom Interdisziplinär. Adjuvante Chemotherapie*, ed. V. Möbus. Vol. 4.Auflage. 2010, Heidelberg: Springer Verlag. 393.
75. Bauerfeind I, Mayr D, Dettmar P, et al., *Manual Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Pathologie der Mammakarzinome und der intraepithelialen Proliferationen der Mamma, ed. D. Mayr, et al. Vol. 13.Auflage. 2011, München: W. Zuckerschweidt Verlag 334 S.
76. 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.
77. 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*, 2002. 41(3A): p. 154-61.
78. 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*. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*, 2002. 41(3A): p. 151-2, discussion 152-3.
79. 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.
80. Pinder S E, Ellis I O and Elston C W, *Prognostic factors in primary breast carcinoma*. *J Clin Pathol*, 1995. 48(11): p. 981-3.
81. UICC, *TNM Klassifikation of malignant tumors*. Wiley-Blackwell, Inc., New York, 2009.
82. Brand F X, Ravel N, Gauchez A S, et al., *Prospect for anti-her2 receptor therapy in breast cancer*. *Anticancer research*, 2006. 26(1B): p. 715-22.
83. Cuadros M, Cano C, Lopez F J, et al., *Expression Profiling of Breast Tumors Based on Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Status Defines Migration-Related Genes*. *Pathobiology*, 2012. 80(1): p. 32-40.
84. Shah S and Chen B, *Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution*. *Patholog Res Int*, 2011. 2011: p. 903202.
85. Wang S C and Hung M C, *HER2 overexpression and cancer targeting*. *Semin Oncol*, 2001. 28(5 Suppl 16): p. 115-24.

86. Dekker T J, Borg S T, Hooijer G K, et al., *Determining sensitivity and specificity of HER2 testing in breast cancer using a tissue micro-array approach*. Breast Cancer Res, 2012. 14(3): p. R93.
87. Seal M D, Speers C H, O'Reilly S, et al., *Outcomes of women with early-stage breast cancer receiving adjuvant trastuzumab*. Curr Oncol, 2012. 19(4): p. 197-201.
88. Gown A M, *Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer*. Mod Pathol, 2008. 21 Suppl 2: p. S8-S15.
89. Ellis M J, Tao Y, Luo J, et al., *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics*. J Natl Cancer Inst, 2008. 100(19): p. 1380-8.
90. Giulianelli S, Vaque J P, Wargon V, et al., *[The role of estrogen receptor alpha in breast cancer cell proliferation mediated by progestins]*. Medicina (B Aires), 2012. 72(4): p. 315-20.
91. Bauerfeind I, Heinemann V, Ataseven B, et al., *Manual Mammakarzinome Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms, ed. V. Heinemann, et al. Vol. 13.Auflage. 2011, München: W. Zuckerschweidt Verlag 334 S.
92. 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.
93. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al., *Mitotic indexes as prognostic predictors in female breast cancer*. Journal of cancer research and clinical oncology, 1992. 118(1): p. 75-81.
94. Traganos F, *Flow cytometry: principles and applications. II*. Cancer Invest, 1984. 2(3): p. 239-58.
95. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 1983. 31(1): p. 13-20.
96. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan M M, et al., *Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2008. 26(34): p. 5569-75.
97. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molekularbiologie der Zelle. Überblick über den Zellzyklus*. Vol. 4.Auflage. 2003: Wiley-VCH. 1801 S.
98. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molekularbiologie der Zelle. Programmierter Zelltod (Apoptose)*. Vol. 4.Auflage. 2003: Wiley-VCH. 1802 S.

99. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molekularbiologie der Zelle*. Intrazelluläre Kontrolle der Vorgänge des Zellzyklus. Vol. 4.Auflage. 2003: Wiley-VCH. 1802 S.
100. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molekularbiologie der Zelle*. Bestandteile des Zellzyklus-Kontrollsystems. Vol. 4.Auflage. 2003: Wiley-VCH. 1801 S.
101. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molekularbiologie der Zelle*. Extrazelluläre Kontrolle von Zellteilung, Zellwachstum und Apoptose. Vol. 4.Auflage. 2003: Wiley-VCH. 1801 S.
102. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., *Molekularbiologie der Zelle*. Die molekulare Grundlage des Verhaltens von Krebszellen. Vol. 4.Auflage. 2003: Wiley-VCH.
103. Gartel A L and Radhakrishnan S K, *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. *Cancer Res*, 2005. 65(10): p. 3980-5.
104. el-Deiry W S, Tokino T, Velculescu V E, et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. *Cell*, 1993. 75(4): p. 817-25.
105. Kastan M B, Canman C E and Leonard C J, *P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 1995. 14(1): p. 3-15.
106. McBride O W, Merry D and Givol D, *The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986. 83(1): p. 130-4.
107. Spandidos D A, Karaioissifidi H, Malliri A, et al., *Expression of ras Rb1 and p53 proteins in human breast cancer*. *Anticancer research*, 1992. 12(1): p. 81-9.
108. Guillouf C, Grana X, Selvakumaran M, et al., *Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest*. *Blood*, 1995. 85(10): p. 2691-8.
109. Tsujimoto Y, Finger L R, Yunis J, et al., *Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation*. *Science*, 1984. 226(4678): p. 1097-9.
110. Wang H G, Rapp U R and Reed J C, *Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria*. *Cell*, 1996. 87(4): p. 629-38.
111. Shortt J and Johnstone R W, *Oncogenes in cell survival and cell death*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. 4(12).
112. Toyoshima H and Hunter T, *p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21*. *Cell*, 1994. 78(1): p. 67-74.
113. Bressac-de Paillerets B, *[Discovery of a new gene frequently inactivated in human cancers: protein p16, a cell cycle regulator]*. *Bull Cancer*, 1994. 81(10): p. 853-6.

114. Tahara H, Smith A P, Gaz R D, et al., *Loss of chromosome arm 9p DNA and analysis of the p16 and p15 cyclin-dependent kinase inhibitor genes in human parathyroid adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. 81(10): p. 3663-7.
115. Rocco J W and Sidransky D, *p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression*. Exp Cell Res, 2001. 264(1): p. 42-55.
116. Serrano M, Hannon G J and Beach D, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. 366(6456): p. 704-7.
117. Galderisi U, Jori F P and Giordano A, *Cell cycle regulation and neural differentiation*. Oncogene, 2003. 22(33): p. 5208-19.
118. Siegert J L, Rushton J J, Sellers W R, et al., *Cyclin D1 suppresses retinoblastoma protein-mediated inhibition of TAFII250 kinase activity*. Oncogene, 2000. 19(50): p. 5703-11.
119. Dowdy S F, Hinds P W, Louie K, et al., *Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins*. Cell, 1993. 73(3): p. 499-511.
120. Sefton B M, *Overview of protein phosphorylation*. Curr Protoc Cell Biol, 2001. Chapter 14: p. Unit 14 1.
121. Takano Y, Takenaka H, Kato Y, et al., *Cyclin D1 overexpression in invasive breast cancers: correlation with cyclin-dependent kinase 4 and oestrogen receptor overexpression, and lack of correlation with mitotic activity*. Journal of cancer research and clinical oncology, 1999. 125(8-9): p. 505-12.
122. Zhu X, Ohtsubo M, Bohmer R M, et al., *Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein*. J Cell Biol, 1996. 133(2): p. 391-403.
123. Junk D J, Cipriano R, Stampfer M, et al., *Constitutive CCND1/CDK2 Activity Substitutes for p53 Loss, or MYC or Oncogenic RAS Expression in the Transformation of Human Mammary Epithelial Cells*. PloS one, 2013. 8(2): p. e53776.
124. 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.
125. Remotti H, *Tissue microarrays: construction and use*. Methods Mol Biol, 2013. 980: p. 13-28.
126. Fedor H L and De Marzo A M, *Practical methods for tissue microarray construction*. Methods Mol Med, 2005. 103: p. 89-101.
127. Hoos A and Cordon-Cardo C, *Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations*. Lab Invest, 2001. 81(10): p. 1331-8.
128. Gately K, Kerr K and O'Byrne K, *Design, construction, and analysis of cell line arrays and tissue microarrays for gene expression analysis*. Methods Mol Biol, 2011. 784: p. 139-53.

129. van Zwieten A, *Tissue microarray technology and findings for diagnostic immunohistochemistry*. Pathology, 2013. 45(1): p. 71-9.
130. Kuefer R, Hofer M D, Gschwend J E, et al., [*Tissue microarrays. High-throughput procedures to verify potential biomarkers*]. Urologe A, 2004. 43(6): p. 659-67.
131. 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.
132. Cardano M, Diaferia G R, Falavigna M, et al., *Cell and tissue microarray technologies for protein and nucleic Acid expression profiling*. J Histochem Cytochem, 2013. 61(2): p. 116-24.
133. Kohler G and Milstein C, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. 256(5517): p. 495-7.
134. Sternberger L A, *The unlabeled antibody (PAP) method, introduction*. J Histochem Cytochem, 1979. 27(12): p. 1657.
135. Engvall E and Perlmann P, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. 8(9): p. 871-4.
136. Boenisch T, *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. Vol. 3. Auflage. 2006, Hamburg: DAKO Cytomation Corp. Deutschland.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. Korsching E, Jeffrey S S, Meinerz W, et al., *Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations*. J Clin Pathol, 2008. 61(5): p. 553-60.
141. Buerger H, Otterbach F, Simon R, et al., *Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways*. J Pathol, 1999. 187(4): p. 396-402.
142. Buerger H, Otterbach F, Simon R, et al., *Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes*. J Pathol, 1999. 189(4): p. 521-6.
143. Burger H, de Boer M, van Diest P J, et al., *Chromosome 16q loss--a genetic key to the understanding of breast carcinogenesis*. Histol Histopathol, 2013. 28(3): p. 311-20.

144. Perou C M, Sorlie T, Eisen M B, et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. 406(6797): p. 747-52.
145. Rakha E A, Elsheikh S E, Aleskandarany M A, et al., *Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes*. Clin Cancer Res, 2009. 15(7): p. 2302-10.
146. Carey L A, Perou C M, Livasy C A, et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA, 2006. 295(21): p. 2492-502.
147. 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.
148. Schymik B, Buerger H, Krämer A, et al., *Is there 'progression through grade' in ductal invasive breast cancer?* Breast Cancer Res Treat, 2012. 135(3): p. 693-703.
149. Battifora H, *The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing*. Lab Invest, 1986. 55(2): p. 244-8.
150. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, et al., *Demystified...tissue microarray technology*. Mol Pathol, 2003. 56(4): p. 198-204.
151. Battifora H, *Re: Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens. Appl Immunohistochem Molecul Morphol 2002;10:1-6*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002. 10(2): p. 195.
152. 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.
153. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. Am J Pathol, 2001. 159(6): p. 2249-56.
154. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, et al., *Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up*. Clin Cancer Res, 1996. 2(9): p. 1591-9.
155. Abukhdeir A M and Park B H, *P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance*. Expert Rev Mol Med, 2008. 10: p. e19.
156. Domagala W, Welcker M, Chosia M, et al., *p21/WAF1/Cip1 expression in invasive ductal breast carcinoma: relationship to p53, proliferation rate, and survival at 5 years*. Virchows Arch, 2001. 439(2): p. 132-40.
157. Pellikainen M J, Pekola T T, Ropponen K M, et al., *p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis*. J Clin Pathol, 2003. 56(3): p. 214-20.

158. Bukholm IK, Nesland JM, Karesen R, et al., *Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas*. J Pathol, 1997. 181(2): p. 140-5.
159. Tan P, Cady B, Wanner M, et al., *The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas*. Cancer Res, 1997. 57(7): p. 1259-63.
160. Alkarain A, Jordan R and Slingerland J, *p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. 9(1): p. 67-80.
161. Volpi A, De Paola F, Nanni O, et al., *Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study*. Breast Cancer Res Treat, 2000. 63(3): p. 181-92.
162. Guan X, Wang Y, Xie R, et al., *p27(Kip1) as a prognostic factor in breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. J Cell Mol Med, 2010. 14(4): p. 944-53.
163. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, et al., *Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer*. BMC cancer, 2008. 8: p. 153.
164. Hwang KT, Woo JW, Shin HC, et al., *Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2012. 131(7): p. E1109-19.
165. Ryu DW and Lee CH, *Outcome of triple-negative breast cancer in patients with or without markers regulating cell cycle and cell death*. J Korean Surg Soc, 2012. 83(4): p. 187-95.
166. Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, et al., *A Ki67/BCL2 index based on immunohistochemistry is highly prognostic in ER-positive breast cancer*. J Pathol, 2012. 226(1): p. 97-107.
167. McDonnell TJ and Korsmeyer SJ, *Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18)*. Nature, 1991. 349(6306): p. 254-6.
168. Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, et al., *Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2*. Cancer Res, 1994. 54(14): p. 3714-7.
169. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, et al., *Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index*. Clin Cancer Res, 2006. 12(8): p. 2468-75.
170. Harbeck N and Wuerstlein R, *[Breast cancer : Individualized therapy concepts]*. Internist (Berl), 2013. 54(2): p. 194-200.
171. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Ball G, et al., *Proposal for a modified grading system based on mitotic index and Bcl2 provides objective determination of clinical outcome for patients with breast cancer*. J Pathol, 2010. 222(4): p. 388-99.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anika Krämer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Zellzyklusproteinen in verschiedenen Subgruppen des invasiven Mammakarzinoms“ 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.“

Berlin, 27.03.2013

Anika Krämer

Lebenslauf

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

Teilpublikation

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Anika Krämer 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.

Originalartikel

Schymik B, Buerger H, **Krämer A**, Voss U, 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.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen recht herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. habil. Stefan Koch vom Institut für Pathologie in Bad Saarow für die freundliche Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation.

Des Weiteren möchte ich mich zudem recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Horst Bürger vom Institut für Pathologie in Paderborn/Höxter für die intensive und unkomplizierte Betreuung bei der Erarbeitung dieses Themas und seine Hilfsbereitschaft bei der Korrektur bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Eberhard Korsching vom Institut für Bioinformatik der Westfälischen Wilhelms Universität Münster für die biomathematische Permutationsanalyse der immunhistochemischen Daten.

Herrn Dr. Wolfgang Voß, und Herrn Martin Lehnert gebührt Dank für das Lesen des Manuskripts und ihre kritischen Anmerkungen und Anregungen.

Ich danke meinem Vater Dr. Lars-Immo Krämer für die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.

Frau Liane Voß, danke ich für Ihre unermüdliche und liebevolle Aufmunterung und Umsorgung in vielen Phasen meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, ohne deren fortwährende Unterstützung das Studium der Zahnmedizin und die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.