

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker -

Prognostische Relevanz basaler Tumormarker im
invasiven Mammakarzinom

INAUGURAL- DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von

Christiane Dinah Rumpf

aus Ahlen/Westfalen

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

1. Berichterstatterin: Frau PD. Dr med. Pia Wülfing
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Horst Bürger

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
-Direktor: Herr Univ. Prof. Dr. med Werner Böcker-
Referentin: Frau PD Dr. med Pia Wülfing
Koreferent: Herr Prof. Dr. med Horst Bürger

Zusammenfassung

Prognostische Relevanz basaler Tumormarker im invasiven Mammakarzinom

Christiane Dinah Rumpf

In der Arbeit wurde versucht, mit Hilfe der Tissue-Micro-Array Methode basale Marker als mögliche Prognosefaktoren unter multivariater Betrachtung mit den weltweit anerkannten Prognosefaktoren wie z.B. dem Grading zu beurteilen. Der TMA wurde aus Gewebeproben von 217 Brustkrebspatientinnen der Erstdiagnose-Jahrgänge 1988-1992 der Universitäts-Frauenklinik Münster zusammengesetzt.

Bei der Untersuchung der Mammakarzinome fällt auf, dass sie vormerklich nach basal und nicht-basal getrennt werden und hierbei dem Gradingeffekt eine sehr große Bedeutung zuteil wird. So werden G3 Tumoren häufig mit basalen Karzinomen assoziiert und niedrig gradige Tumoren den nicht basalen Mammakarzinomen zugerechnet. Betrachtet man aber die Ergebnisse der multivariaten Analyse können signifikante Ergebnisse nur dann erreicht werden, wenn eine stadiengerechte Auswertung erfolgt und Grading adaptiert gearbeitet wird, um den nicht zu vernachlässigenden Einfluss des Gradings aufzuheben. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit auf, dass in der multivariaten Analyse keine unabhängige Signifikanz der basalen Marker gefunden werden konnte und in der Literatur diesbezüglich sehr widersprüchliche Angaben zu finden sind. Deshalb sollte überlegt werden, in wieweit es möglich ist, einheitliche, allgemein gültige prognostische Aussagen mit Hilfe dieser basalen Faktoren machen zu können.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2008

In Liebe meiner Familie gewidmet!

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
<u>1.1. Mammakarzinom Epidemiologie</u>	1
<u>1.2. Risikofaktoren</u>	1
1.2.1. Lebensalter	2
1.2.2. Familiäre/Genetische Disposition	2
1.2.3. Hormonelle Einflüsse	3
1.2.4. Soziokulturelle Faktoren	4
1.2.5. Benigne Brustveränderungen	5
1.2.6. Ionisierende Strahlung	5
<u>1.3. Prognostisch-prädiktive Marker der Mammakarzinomdiagnostik</u>	7
1.3.1. Histologische Klassifikation	7
1.3.2. Grading	8
1.3.3. pTNM-Klassifikation	10
1.3.4. Nottingham-Prognose-Index	12
<u>1.4. Therapie Optionen des Mammakarzinoms</u>	13
<u>1.5. Weitere molekularbiologische Parameter</u>	14
1.5.1. Hormonrezeptorstatus	14
1.5.2. Proliferationsindex, Ki-67/Mib-1	14
1.5.3. Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	15
1.5.4. Tumorsuppressor-Gene	16
<u>1.6. Zytoskelett</u>	17
1.6.1. Zytokeratine	18
<u>1.7. Tumorstammzellen und ihre Bedeutung bei der Kanzerogenese</u>	19
<u>2. Ziele der Arbeit</u>	<u>23</u>
<u>3. Material und Methoden</u>	<u>24</u>
<u>3.1. Tissue-Micro-Array</u>	24
3.1.1. Prinzip der Tissue-Micro-Array Konstruktion	25

<u>3.2. Immunhistochemie</u>	27
<u>3.3. Mikroskopische Auswertung</u>	29
<u>3.4. Patientenkollektiv</u>	32
<u>3.5. Statistische Auswertung</u>	32
<u>4. Ergebnisse</u>	<u>33</u>
<u>4.1. Allgemeine Ergebnisse der untersuchten Mammakarzinome</u>	33
<u>4.2. Auswertung der molekularbiologischen Parameter</u>	38
<u>4.3. Gruppenspezifische Vergleiche der Überlebenswahrscheinlichkeiten</u>	40
<u>5. Diskussion</u>	<u>48</u>
<u>6. Anhang: Ergebnisse</u>	<u>54</u>
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>57</u>
<u>8. Auflistung der verwendeten Tabellen</u>	<u>73</u>
<u>8. Auflistung der verwendeten Abbildungen</u>	<u>74</u>
<u>10. Auflistung der verwendeten Abkürzungen</u>	<u>75</u>
<u>11. Danksagung</u>	<u>76</u>
<u>12. Lebenslauf</u>	<u>77</u>

1. Einleitung

1.1. Mammakarzinom Epidemiologie

Das Mammakarzinom zählt mit einem Anteil von 26,8% zu den am häufigsten auftretenden, bösartigen Tumorerkrankungen der Frau. Allein in Deutschland erkranken jährlich 55.100 Frauen an Brustkrebs, 23.200 Frauen davon sind schon vor ihrem 60. Lebensjahr betroffen. Bei einem Anteil von 42.919.800 Frauen an der deutschen Bevölkerung betrifft es somit jede zwölfte Frau (alle Angaben für das Jahr 2002).

Auch die Mortalitätsliste der Tumorerkrankungen wird vom Mammakarzinom mit 17,8% angeführt. Allein 2002 kam es somit zu über 17.000 Brustkrebsbedingten Todesfällen in Deutschland. (39)(78)

Neu eingeführte flächendeckende Screeningmethoden seit Beginn des Jahres 2004 führten zwar zu einem Anstieg der Inzidenz, durch besseres Erkennen klinisch unauffälliger Brusttumoren, jedoch wird eine Reduktion der Mortalitätsrate um bis zu 500 Brustkrebssterbefälle pro Jahr in Deutschland angestrebt.(62)(68)(88) In den Niederlanden und in Großbritannien konnte bereits ein signifikanter Rückgang der Brustkrebsmortalität verzeichnet werden, welcher auf die Einführung des Screenings zurückgeführt wird. (40)(97) Die relative 5-Jahres Überlebensrate beträgt mittlerweile, stadienübergreifend betrachtet, 79%. Das mittlere Erkrankungsalter lag im Jahre 2002 bei 62 Lebensjahren. (39)

1.2. Risikofaktoren

Auch wenn die Ätiologie des Mammakarzinoms noch weithin unklar ist, so gibt es doch zahlreiche Indizien dafür, dass Risikofaktoren und Einflussgrößen aus unterschiedlichen Bereichen hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

(siehe auch Tabelle 1: Etablierte Risikofaktoren, nach Sauer et al. modifiziert (97))

1.2.1. Lebensalter

Der Altersgipfel des Mammakarzinoms liegt zwischen dem 45.-70. Lebensjahr, wobei es zu einem steilen Anstieg der Inzidenz ab dem 50. Lebensjahr bzw. mit dem Menopausenbeginn kommt. (42) Nach dem Ende der Menopause flacht der Anstieg zur altersspezifischen Inzidenz hin ab.

1.2.2. Familiäre/Genetische Disposition

Eine familiäre Belastung betreffen etwa 10-15% des Gesamterkrankungskollektives. Bei jungen Patientinnen beläuft sich der Anteil sogar auf 25-40%. (98)

Hereditäre Mammakarzinome treten zu 5-10% auf. Der Großteil der Mutationen liegt im Bereich der Tumorsuppressor-Genen BRCP 1(Chr.17q21) oder BRCP 2 (13q12-13). Tritt dies auf, liegt das Erkrankungsrisiko bei 50-85%, sechs bis acht Mal höher als sonst. Diese Mutation liegt allerdings nur bei weniger als 0,5% der weiblichen Bevölkerung vor. (in den USA 1:120 bis 1:1000). (97)

Meist kommt es bei Mutationsträgerinnen zu einer prämenopausalen Manifestation des Mammakarzinoms, welches zu 70% Hormonrezeptor negativ ist, ein hohes Grading aufweist sowie hohe Proliferationsmarkerraten und eine nodale Metastasierungstendenz zeigt. Da diese Mutationen vor allem bei prämenopausalen Frauen zu finden sind, wird vermutet, dass Zusammenhänge mit dem Stammzellvorkommen im Brustdrüsengewebe bestehen, welches für die Brustumorganisations- und Aufbauvorgänge während der Pubertät und Laktationsperioden verantwortlich ist. Dies lässt Rückschlüsse auf eventuelles Wachsen des Mammakarzinoms aus diesem Gewebe Stammzellpool zu. Turner et al. konnten durch die gleichzeitige Ausprägung verschiedener Parameter wie CK5/6, EGFR und HER-2 aufzeigen, dass eine Ähnlichkeit von BRCP-1 positiven Tumoren zu basalen Karzinomen besteht. (116) BRCP-1 ist in viele zelluläre Prozesse involviert, wie DNA-Reparatur-Funktionen, X-Chromosom-Inaktivierung, Transkriptionsregulation und Östrogen-Signalweg-Blockierungen, welche die Hormonrezeptor Negativität bei BRCP-1 positiven Tumoren vermuten lässt. Kommt es also zur BRCP-1 Mutationen, wird eine Genominstabilität vermutet.

Vorsorglich sollte deshalb bei nachfolgend aufgeführten Mammakarzinom-Fällen in einer Familie ein BRCP-Genetest durchgeführt werden:

- zwei Erkrankungsfälle, Mamma- /oder/und Ovarialkarzinom, in der engen Familie, davon einmal vor dem 50. Lebensjahr
- ein Mammakarzinom vor dem 30. Lebensjahr
- ein doppelseitiges Mammakarzinom vor dem 40. Lebensjahr
- ein Ovarial- und Mammakarzinom vor dem 40. Lebensjahr
- ein Mammakarzinom bei einem männlichen Verwandten 1./2. Grades (98)

Auch andere seltenere somatische Mutationen können mit dem Auftreten eines familiären Mammakarzinoms assoziiert sein: TP53 (Li-Fraumeni-Syndrom, Chr.17p13.1); ATM-Gen (Ataxia teleangiectica, Chr.11q23); PTEN-Gen (Cowden-Syndrom mit multiplen Hamartomen, Chr.10q23). (82)(108)(114)

Neben der Risikoerhöhung für das Mammakarzinom kommt es bei den hereditären Genesen auch zur gleichzeitigen Risikoerhöhung für die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms. (46)

1.2.3. Hormonelle Einflüsse

Zu den hormonellen Einflüssen bei der Entstehung des Mammakarzinoms zählen vor allem Östrogenüberschüsse bedingt durch eine frühe Menarche, mit einem Beginn vor dem 12. Lebensjahr, und einem späten Beginn der Menopause, nach dem 55. Lebensjahr. (17) Aber auch Nulliparität oder ein hohes Alter bei der ersten Geburt lassen ein erhöhtes Mammakarzinom-Risiko vermuten. Eine Schwangerschaft vor dem dreißigsten Lebensjahr wird als protektiver Faktor gewertet. So wird angenommen, dass es durch die Ausdifferenzierung des Brustdrüsengewebes während der Laktationsperiode und der sich anschließenden Involution zu einem Verlust von ca. 95% des Drüsenzellkontingents kommt und somit schon vorliegende Mutationen hierdurch verloren gehen und nicht mehr als Mammakarzinom-Ursprung fungieren können. (101)

Bei der Einnahme von Hormonersatz-Therapeutika in der Menopause kommt es bei einer über fünfjährigen Einnahme zur Risikoerhöhung für das Mammakarzinom, da durch Östrogene das Wachstum und die Entwicklung Hormonrezeptor positiver Mammakarzinome gefördert werden kann. Die Einnahme oraler Kontrazeptiva lässt eine Risikosteigerung vermuten, jedoch konnte aufgrund von widersprüchlichen Studien keine konkrete Risikostratifizierung in diesem Bereich vorgenommen werden.

1.2.4. Soziokulturelle Faktoren

Bezüglich der Mortalität und der Inzidenz des Mammakarzinoms bestehen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Kontinenten. Vor allem an den altersstandardisierten Raten (ASR) ist ein großer Unterschied zwischen den so genannten „more developed countries“ und den „less developed countries“ zu erkennen. (97)

So liegt die ASR (für die Inzidenz) bei den „less developed countries“ bei 23,07%, während die „more developed countries“ eine ASR von 63,22% aufweisen. Bei der ASR (für Mortalität) liegt die der „less developed countries“ bei 9,12%, die der „more developed countries“ bei 18,61%. (Nach Schätzungen der WHO (GLOBOCAN) für das Jahr 2000)

Als Ursache dieser zum Teil erheblichen Differenzen werden unterschiedlich kulturell geprägte Lebens- und Ernährungsgewohnheiten angenommen. Einer fettreichen sog. „Western-Style-Diät“, gekennzeichnet durch regelmäßigen Alkoholkonsum und einem Mangel an Vitamin A sowie Selen, werden prädisponierende Faktoren zugeschrieben. So kommt es in Japan zu einer extrem niedrigen Mortalitätsrate von Mammakarzinom Patienten verglichen mit anderen hoch industrialisierten Ländern. Dies wird zurückgeführt auf andere Lebens- und Ernährungsgewohnheiten. (17)(53)

Eine verstärkte Konversion androgener Vorstufen in Östrogene durch die Fettgewebsaromatase im peripheren Fettgewebe (Androstendion in Estron) wird als mögliche Risikoinduktion bei postmenopausalen, adipösen Frauen gewertet.

1.2.5. Benigne Brustveränderungen

Bei etwa 50% aller Frauen kommt es zum Auftreten von benignen Brustveränderungen. Hierbei werden vor allem die Ducti lactiferi betroffen. Ätiologisch kommt hierbei ein relativer Östrogenüberschuss, welcher durch endokrine Dysfunktion bedingt ist, durch auftretende klimakterische Hormonumstellungen oder aufgrund eines Gestagenmangels in Frage. Auch ein prämenopausal länger bestehender Diabetes mellitus wird mit der diabetischen Mastopathie assoziiert. Der Altersgipfel benigner Brustveränderungen befindet sich zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr.

Es kommt zu Fibrosierungen und zystischen Dichteirregularitäten des Brustgewebes, die lediglich durch verschiebliche Verhärtungen (Schrotkugelbrust) oder prämenstruelle Mastodynie auffällig werden. Trotzdem sollte jegliche Brustveränderung diagnostisch abgeklärt werden. (46)(93)

1.2.6. Ionisierende Strahlung

Ein um das Dreifache erhöhtes Risiko wurde für Kinder und Jugendliche nach den Atombombenabwürfen des zweiten Weltkrieges in Japan registriert. Durch regelmäßige durchgeführte diagnostische Mammographien im Rahmen des neu eingeführten Screeningprogrammes (alle zwei Jahre, vier Aufnahmen) kommt es zu einer vernachlässigbaren Risikoerhöhung von 0,05%. (46)

Tabelle 1: Etablierte Risikofaktoren (modifiziert nach Sauer et al. (97))

Risikofaktor	Relatives Risiko
Alter (≤ 50 vs ≥ 50 Jahre)	6,5
Familiäre Belastung (Verwandtschaft ersten Grades)	1,4-13,6
Familiäre Belastung (Verwandtschaft zweiten Grades)	1,5-1,8
Alter bei Menarche (≤ 12 Jahre vs ≥ 14 Jahre)	1,2-1,5
Alter bei Menopause (≤ 55 Jahre vs ≥ 55 Jahre)	1,5-2,0
Alter bei erster Lebendgeburt (≥ 30 Jahre vs ≤ 20 Jahre)	1,3-2,2
Hormonersatztherapie (HET)	1,0-1,5
Gutartige Brusterkrankung: Biopsie (mit jedem histologischen Befund)	1,5-1,8
Gutartige Brusterkrankung: Atypische Hyperplasie	4,0-4,4

1.3. Prognostisch-prädiktive Marker der Mammakarzinomdiagnostik

Die interdisziplinäre Versorgung von Patienten mit Mammakarzinom orientiert sich an international anerkannten Publikationen und Protokollen. Hierzu zählen unter anderem die „Quality Assurance Guidelines for Quality Assurance in Breast Cancer Screening and Diagnosis“ und die „Klassifikation der United Kingdom and European Commission Breast Screening Pathology Working Groups“ (NHSBSP/EC) sowie die nationale S3 Leitlinie, welche im Rahmen der Qualitätssicherung auf dem Neunten Consensus Meeting in St. Gallen erstellt wurde (2005). (44)(62)(81)(97)

Die exakte pathomorphologische Diagnostik erfolgt an einer durch den Chirurgen eindeutig topographisch markierten Gewebeprobe. Für die Identifikationsstellung der unterschiedlichen Therapieregime, wie Strahlen-, Chemo-, Hormon- oder einer alleinigen operative Therapie, sind die folgenden Prognosefaktoren von entscheidender Bedeutung

1.3.1. Histologische Klassifikation

Die Angabe des histologischen Mammakarzinomtypes erfolgt nach der WHO Klassifikation von 2003 nach vorgegebenen morphologischen Kriterien. (125) So unterscheidet man intraepithelial präinvasive Karzinome von den invasiven Karzinomen. Bei den intraepithelialen präinvasiven Karzinomen, DCIS (Duktales Carzinoma In Situ) und CLIS (Carzinoma In Situ Lobulare), findet man charakteristische neoplastische epitheliale Zellproliferationen, welche sich durch eine intakte Zellmembran auszeichnen. (17)(77) Das DCIS ist mit einem acht bis zehnfach erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Es entsteht überwiegend in den peripheren terminalen Gangsystemen. (31) Beim CLIS kommt es häufig zu einem multifokalen und multizentrischen Auftreten ausgehend von neoplastischen Transformationen der terminal-dukto-lobulären Einheit. Ein um das zehn bis elffach erhöhtes Brustkrebsrisiko liegt hier vor. Da diese Läsionen häufig im Brustkrebs assoziierten Gewebe zu finden sind, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass sie als Vorläuferläsionen möglicher invasiver Karzinome zu werten sind. (56) Zu den invasiven Karzinomen zählen mit einer auftretenden

Wahrscheinlichkeit von 10-15% lobuläre Karzinome, mit 70-80% duktales Karzinome sowie andere seltenere Tumortypen, wie z.B. das medulläre, das muzinöse oder das tubuläre Karzinom.

Eine durch Hanseemann am Ende des 19. Jahrhunderts erstmals festgestellte Korrelation der histologischen Differenzierung eines Brusttumors mit seinem Malignitätsgrad konnte auch bis heute noch aufrechterhalten werden. (48)

Zu den Karzinomen mit einem besserem Outcome, verglichen mit dem NST (no specific type), zählen das invasive duktales, das tubuläre, das muzinöse, das invasiv kribri-forme, das medulläre, das adenoidzystische sowie das papilläre und das adeno-squamöse Karzinom. (85)(88)(97)

1.3.2. Grading

Das Grading bezeichnet das am weitesten verbreitete und akzeptierte Klassifikations-system des Mammakarzinoms. (64) Es erfolgt gemäß dem Standard nach Elston und Ellis sowie dem Nottingham Grading System, modifiziert nach Bloom und Richardson. (15)(34). Obwohl das Grading nicht durch die Expression von molekularen Markern gekennzeichnet ist, finden sich doch Zusammenhänge zwischen Grading und molekularen Markern, zum Beispiel Östrogenrezeptorstatus, wie bei Zafrani et al, und Tong et al. beschrieben. So zeigt sich, dass Östrogenrezeptor negative Tumoren häufig ein hohes Grading aufweisen und Östrogenrezeptor Positivität den niedrig gradigen Tumoren zuzuordnen ist. (113)(130) Der große Nachteil der prognostischen Wertigkeit des Gradings liegt darin, dass trotz zunehmender Standardisierung des Diagnose-verfahrens und Modifizierung, die Beurteilung und Einschätzung des Gradings immer noch im großen Maße von der subjektiven Betrachtung des Untersuchers abhängt. Die Einteilung beruht auf einem Punktescore-System, bei dem drei histologische Kriterien betrachtet und mit zugehörigen Punktwerten versehen werden. (siehe Tabelle 2)

Tabelle 2: Gradingkriterien (modifiziert nach Elston und Ellis (34))

Punkte	1	2	3
1. Tubuläre Differenzierung	gut (meist reife Tubuli) $\geq 75\%$	mäßig (unreife Tubuli) 10-75%	gering oder fehlend $\leq 10\%$
2. Kernpolymorphie	gering (überwiegend isomorphe Kerne)	mäßig (mittelgradige Form- und Größenvariation)	stark (hochgradige Form- und Größenvariation)
3. Mitosenzahl	0-9 Mitosen	10-19 Mitosen	≥ 20 Mitosen

Bewertung: -Nach Elston/Ellis

3-5 Punkte = gering maligne, gut differenziertes Karzinom, G1

6-7 Punkte = mäßig maligne, mäßig differenziertes Karzinom, G2

8-9 Punkte = hoch maligne, wenig differenziertes Karzinom, G3

-nach UICC

3-4 Punkte = gering maligne, gut differenziertes Karzinom G1

5-6 Punkte = mäßig maligne, mäßig differenziertes Karzinom G2

7-8 Punkte = hoch maligne, wenig differenziertes Karzinom G3

9 Punkte = sehr hoch malignes Karzinom G4

1.3.3. pTNM-Klassifikation

Bei der pTNM-Klassifikation werden grundsätzlich zunächst Einzelbefunde für die Größe des Primärtumors (T), den etwaigen Lymphknotenmetastasen-Status (N) und das eventuelle Vorhandensein von Fernmetastasen dokumentiert. Für Tumoren, bei denen eine neoadjuvante Therapie in Frage kommt, ist entsprechend der sechsten Auflage des TNM- Systems eine ypTNM-Klassifikation vorzunehmen, in der die Ausbreitung des vitalen Tumores nach neoadjuvanter Therapie beschrieben wird. Zusätzlich wird in der organspezifischen Tumordokumentation eine unter Berücksichtigung des regressierten Tumorgewebes vorgenommene Beurteilung des wahrscheinlich präoperativen Tumorstatus, die so genannte (p)TNM-Klassifikation, dokumentiert.

Tabelle 3: pTMN-Klassifikation

(modifiziert nach dem American Joint Committee on Cancer (6))

pT-Primärtumor

pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Karzinoma in situ
pT1	Tumorgröße $\leq 2\text{cm}$
pT1 mic	Tumorgröße $\leq 0,1\text{cm}$
pT1a	Tumorgröße 0,1-0,5cm
pT1b	Tumorgröße 0,5-1,0cm
pT1c	Tumorgröße 1,0-2,0cm
pT2	Tumorgröße 2,0-5,0cm
pT3	Tumorgröße $\geq 5,0\text{cm}$
pT4	Jeder Tumor mit Ausdehnung auf die:
pT4a	Brustwand (Rippen, Intercostalmuskeln, vorderer Serratus-muskel, <u>nicht</u> M.Pectoralis)
pT4b	mit Ödem (einschließlich peau d`orange), Ulzerationen der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c	pT4a und pT4b zusammen
pT4d	Inflammatorisches Karzinom

pN-Lymphknotenmetastasen

pNx	keine LK-Beurteilung möglich	
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen	
pN1	Metastasen in beweglichen, ipsilateralen, axillären LK	
pN1mi	nur Mikrometastasen 0,2-2,0mm	
pN1a	Metastasen in 1-3 axillären LK	
pN1b	Metastasen in klinisch unauffälligen LK entlang der A. mammaria interna (SNL-Dissektion)	
pN1c	pN1a und pN1b zusammen	
pN2	pN2a	Metastasen in 4-9 axillären LK (einer davon mindestens ≥ 2,0mm)
	pN2b	Metastasen in klinisch auffälligen LK entlang der A. mammaria interna (ohne Befall von axillären LK)
pN3	pN3a	Metastasen in ≥10 axillären LK(einer davon mindestens ≥ 2,0mm) oder infraklavikuläre LK-Metastasen
	pN3b	Metastasen in klinisch auffälligen ipsilateralen LK entlang der A. mammaria interna und Befall der axillären LK, oder Metastasen in ≥3 axillären LK mit mikroskopischem Befall klinisch unauffälliger LK entlang der A.mammaria interna (SNL-Dissektion)
	pN3c	Metastasen in ipsilateral supraklavikulären LK

pM-Fernmetastasen

pMx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

1.3.4. Nottingham-Prognose-Index

Um prognostische Aussagen machen zu können, wird der Nottingham-Prognose-Index (NPI) verwendet. (17)(34)(88) Er beinhaltet die Tumorgröße, das Grading sowie den Lymphknotenstatus-Score (pN0 = 1Punkt, pN+ in Level I und II = 2Punkte, pN+ in Level II und III = 3Punkte). Der NPI wurde durch die Nottingham Tenovus Primary Breast Cancer Study (NTPBCS) ermittelt und evaluiert. Er zeigt eine valide Reproduzierbarkeit in anderen Studien. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch das SEER Programm des National Cancer Institute der Vereinigten Staaten, das in einer retrospektiven Studie an über 22.000 Frauen den Lymphknotenstatus mit dem histologischen Grading verglichen hat, um Prognosen machen zu können. (88)

$$\text{NPI} = \text{Größe (cm)} \times 0,2 + \text{Grading(1-3)} + \text{LK-Status-Score}$$

$\leq 3,4$ Punkten \rightarrow Gute Prognose (GPG)

3,41-5,4 \rightarrow Mittlere Prognose (MPG)

$\geq 5,4$, \rightarrow Schlechte Prognose (PPG)

1.4. Therapie Optionen des Mammakarzinoms

Als Therapieoptionen des Mammakarzinoms stehen chemotherapeutische, operative, endokrine und radiotherapeutische Ansätze zur Disposition. Durch das Erkennen der prognostischen, prädiktiven Faktoren und durch deren Evaluation konnte die Behandlung des Mammakarzinoms individualisiert werden. So werden die radikalen operativen Therapien zurückhaltender eingesetzt und brusterhaltende Operationen zunehmend häufiger durchgeführt. (73)

Durch Verbesserung und neue Erkenntnisse in der molekularbiologischen Beurteilung konnte ein Wandel in der adjuvanten Therapie erfolgen, so dass nicht mehr nur eine alleinige adjuvante Chemotherapie erfolgt, sondern eine individuell angepasste adjuvante Chemo- und endokrine Therapie. Mögliche Ansatzpunkte der endokrinen Therapie sind die Hormonrezeptoren, wie der Östrogen- und der Progesteronrezeptor, der Erb-2/ Her-2/ NEU- Rezeptor für seinen Antikörper, Trastuzumab (Herceptin®) und der EGFR-TK-Inhibitor (noch keine Zulassung, bisher nur Studien). (28) So wurden bei dem neunten St. Gallen Experten Consensus 2005 drei Tumorkategorien festgelegt: Endokrin ansprechende, nicht endokrin ansprechende und ungewiss endokrin ansprechende Tumoren. Diese wurden zusammen mit dem Lymphknotenstatus und dem Menopausenstatus in low-, intermediate- und high- Risk- Kategorien eingeteilt, so dass eine Therapie je nach Risikogruppe erfolgen kann. (43) So wird eine endokrine Therapie bei endokrin ansprechenden Tumoren und eine zusätzliche Chemotherapie bei gleichzeitiger intermediate- oder high- Risk Einstufung durchgeführt. Beide Therapieoptionen, Chemotherapie wie auch endokrine Therapie, werden bei ungewiss endokrin ansprechenden Tumoren eingesetzt.

Durch neue Erkenntnisse über die unterschiedliche Zelltypdifferenzierungen und das Vorkommen möglicher Progenitor- oder Tumorstammzellen wird die Therapie hoffentlich bald gezielter auf diese "Ursprungszellen" ausgerichtet sein und dadurch zu einer Verbesserung der Prognose führen.

1.5. Weitere molekularbiologische Parameter

Unter Berücksichtigung der neuen Therapieoptionen und unter der Vermutung möglicher Tumorstammzellen-Vorkommen erhalten viele neuere molekular-biologische Marker wichtige prognostisch, prädiktive Eigenschaften. Hierzu zählen:

1.5.1. Hormonrezeptorstatus

Der Östrogen- und der Progesteronrezeptor zählen zu den Steroidrezeptoren und sind involviert in die Zellwachstumssteuerung. Sie bieten ideale Angriffspunkte für mögliche endokrine Therapieansätze. (19)(43) Ungefähr 30% aller Brustkrebs-Patientinnen profitieren von dieser Therapieoption. (88) 78% der Patienten mit Hormonrezeptor positiven Tumoren zeigen ein positives Ansprechen auf eine endokrine Therapie sowie $\leq 10\%$ der Hormonrezeptor negativen Mammakarzinom- Patientinnen. Ein positiver Hormonrezeptorstatus korreliert mit einer günstigeren Prognose auch unabhängig vom Lymphknotenstatus. (32)(54)(75) Die Expression von Östrogenrezeptoren in Tumoren korreliert negativ mit einer gesteigerten Mitosezahl und einem höheren Proliferationsindex. (54)(86) Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus erfolgt immunhistochemisch.

1.5.2. Proliferationsindex, Ki-67/Mib-1

Bereits 1982 konnten Stein et al. Ki-67 als Zellproliferation assoziiertes Antigen erkennen (106), welches 1983 durch Gerdes et al. unterstützt werden konnte. (38) Zur Einstufung des Malignitätsgrades eignet sich daher die immunhistochemische Markierung der zuverlässigen Proliferationsmarker Ki-67/Mib-1, welchen ein hoher prognostischer Wert zugesprochen wird. Ki-67 wird während der Proliferationsphase des Zellzykluses gebildet, nicht jedoch in ruhenden Zellen in der G0-Phase. Durch den monoklonalen Antikörper Mib-1 wird das nukleäre, nonhiston Protein Ki-67 markiert.

Dieses Verfahren wird vor allem an Formalin fixiertem und in Paraffin gebettetem Material angewandt. (35)(85) G1 Karzinome haben eine signifikant geringere Proliferationsrate mit $\leq 10\%$ angefärbten Zellkernen als G3 Karzinome mit $\geq 20\%$ angefärbten Nuclei.

Eine Mib-1 Expression korreliert mit dem Vorhandensein von p53, EGFR und Vimentin. (61) Diese Tumoren zeichnen sich durch eine hohe Chemoresistenz gegenüber Chemotherapeutika und einem hohen Invasionsgrad aus. (37)(54)

1.5.3. Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Eine andere große Gruppe molekularer Marker ist die Wachstumsfaktorrezeptorfamilie. Sie besteht aus vier Membranrezeptoren: EGFR, cerbB- 2, cerbB- 3 und cerbB- 4, die durch zahlreiche extrazelluläre Wachstumsfaktoren stimuliert werden. (85) Es handelt sich um 170 kDa schweres transmembranöses Protein mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne für EGF und einer intrazellulären katalytischen Domäne, die in der Regel Tyrosinkinaseaktivität aufweisen. (17)

EGFR zeigt eine inverse Korrelation mit der Östrogenrezeptor Positivität, so dass Patienten mit hoher EGFR-Aktivität ein schlechtes Ansprechen auf Tamoxifen zeigen und eine ungünstigere Prognose aufweisen. Auch cerbB-2 korreliert mit einem schlechten Ansprechen auf eine endokrine Therapie. (33)(88)

CerbB-2 ist in 30% der Fälle eines metastasierten Mammakarzinoms überexprimiert und gilt als ungünstiger Prognosefaktor. (34)(61)(86) Eine weitere wichtige Eigenschaft kommt der Her-2/NEU Überexpression hinsichtlich neuer antikörperbasierter Therapieansätze zu. So ist seit September 2000 der gegen cerbB-2/Her-2/NEU gerichtete humanisierte rekombinante monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) in Deutschland zugelassen (in den USA bereits seit September 1998). Hier zeigen sich klinische gute Ansprechraten und Verträglichkeiten, sowohl in der Monotherapie mit einer Ansprechraten von ca. 40%, als auch in Kombination mit Taxan-basierten Chemotherapeutika mit 60-80%iger Ansprechraten. (28)(109)

1.5.4. Tumorsuppressor-Gene

Für die Entstehung von Karzinomen nehmen auch die Tumorsuppressor-Gene eine entscheidende Rolle ein. Zu ihnen zählt p53, welcher auch als Wächter des Genoms bezeichnet wird. Er ist auf Chr.17p13 lokalisiert und kodiert für nukleäre Transkriptionsfaktoren, durch die der Zellzyklus kontrolliert wird. Kommt es zu einer p53 Mutation, wie in zahlreichen Mammakarzinomen, resultiert daraus ein Funktionsverlust des p53-Proteins. Es kommt zur intranukleären Ablagerung des Proteins, welches dadurch immunhistochemisch nachweisbar wird. (17)(82) Der Verlust tumorsuppressiver Aktivität ist in ca. 30% aller Mammakarzinome nachweisbar und korreliert mit einer schlechten Prognose, frühzeitiger Invasion und Metastasierung. (33)(61)(86).

Weiterhin, wird p63, ein homologer Tumorsuppressor zu p53, assoziiert mit steigender Invasionsbereitschaft und Metastasierungstendenz von Karzinomen. Er transaktiviert p53- verwandte Gene und induziert die Apoptose von Zellen. P63 als Marker für epitheliale Gewebe kommt spezifisch in der Basalzellschicht dieser Gewebe vor, in der Brustdrüse z.B. überwiegend in den myoepithelialen Zellen. Kommt es zum Verlust der p63 Aktivität, so kommt es zur Hochregulation epithelialer Marker, z.B. mesenchymaler Marker wie CK5/6 und CK14. In mehreren Arbeiten wurde diese Umwandlung in mesenchymale Morphologiekriterien beobachtet. (8) Auch wird p63 der Progenitor-Population zugerechnet und steht somit für Selbsterneuerungskapazität. (66)(92)

Weitere Marker wie bcl-2-Gen (Anti-Apoptose-Gen, Zeichen für Chemoresistenz), Proteolyse-Faktoren (Cathepsine/ uPA/ PAI-1), Neoangiogenese-Faktoren (Endoglin/ VEGF), Wachstumsfaktoren (EGF-R), Tumorprogressionsmarker (p27/ Metastasin) sowie Zelladhäsionsmoleküle (E-Cadherin) sind noch nicht abschließend validiert. (1)(85)(86)(91) DNA-Analysen zur Differenzierung einer vorliegenden DNA-Ploidie (abnorm vermehrter DNA-Gehalt, zytophotometrisch ermittelbar)/ S-Phase- Fraktionen werden fakultativ zur Diagnostik durchgeführt. (17)

1.6. Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein dynamisch organisiertes System der eukaryoten Zelle, dem wichtige zellbiologische Aufgaben, wie Zellteilung, Formhaltung, Zellmobilität und Zellpolarität obliegen.

Es setzt sich aus drei verschiedenen Strukturen zusammen: Aktinfilamenten (Ø10nm), Mikrotubuli (Ø25 nm) sowie den Intermediärfilamenten (Ø5nm).

Durch die Intermediärfilamente wird den Zellen mechanische Stabilität verliehen, außerdem sind sie Bestandteil der Kernlamina. Ihre monomorphen Untereinheiten sind Zelltyp spezifisch, so dass über eine Differenzierung der Untereinheiten auf das jeweilige Filament und auf die Zelltypen Rückschlüsse gezogen werden können.

Zytokeratine zählen zu den epithelzell-spezifischen Keratinfilamenten,

Vimentin zu den Vimentinfilamenten, deren Vorkommen spezifisch für mesenchymalen Zellen, Fettgewebe und Endothelzellen ist. (68)

Tabelle 4: Intermediärfilamente (Auswahl) (modifiziert nach Löffler und Petrides (68))

Filament	Monomer	Vorkommen
Vimentinfilament	Vimentin	Mesenchymale Zellen, Endothelzelle, Fettgewebe
Desminfilament	Desmin	Muskelzellen
Neurofilament	Neurofilament, Protein NF(l,m,h), saures fibrilläres Gliaprotein	Axone zentraler und peripherer Neurone
Keratinfilament	Saure Zytokeratine, Neutrale/basische Zytokeratine	Epitheliale Zellen
Kernlamina	Lamine	Zellkerne

1.6.1. Zytokeratine

Bei diesen Epithelzell-spezifischen Filamenten lassen sich über 50 verschiedene Proteine unterscheiden, die in sechs Hauptgruppen einzuteilen sind. (49)

1.Gruppe	saure Keratine
2.Gruppe	neutral und basische Keratine
3.Gruppe	Vimentin, Desmin, Peripherin, Gliafilament Acidic Protein (GFAP)
4.Gruppe	Neurofilamente
5.Gruppe	Kernlamine
6.Gruppe	Nestin

Keratine setzen sich jeweils aus einem heterogenen Polymerpaar zusammen, welches aus einem Protein der ersten Gruppe und einem aus der zweiten Gruppe besteht und Zelltyp sowie Differenzierungsgrad abhängig ist.

So lassen sich zwei verschiedene Untergruppen bilden.

→ Plattenepitheltypische-Zytokeratine (1.Gruppe CK1-6, 2.Gruppe CK9-17) und

→ Zylinderepitheltypische-Zytokeratine (1.Gruppe CK7/8, 2.Gruppe CK18-20).

In den luminalen Mammaanteilen werden zylinderepitheltypische Keratine wie CK7, CK8, CK18 und CK19 exprimiert. In den basalen und myoepithelialen Anteilen der Mamma sind plattenepitheltypische Zytokeratine wie CK5, CK14, CK15 und CK17 zu finden. (63)(92)(103)

Anhand des Zytokeratinmusters lassen sich somit Rückschlüsse auf mögliche Ursprungsgewebe eines Tumores ziehen. Auch Prognosen lassen sich anhand der Zytokeratin-Expression ableiten.

So ist CK5/6 assoziiert mit einem schlechten Outcome und einem geringeren rezidivfreien Intervall. (75)

1.7. Tumorstammzellen und ihre Bedeutung bei der Kanzerogenese

Durch zahlreiche Studien unterstützt hat sich das Verständnis der Tumorentstehung grundlegend geändert. So gilt ein Tumor nicht mehr als Anhäufung entarteter Zellen, sondern vielmehr als "Tumor-Organ", das aus entarteten spezialisierten Tumorstammzellen und den daraus hervorgegangenen Tumorzellen besteht.

Diese These wurde durch die AML Studie an Mäusen 1997 von John Dick und seinen Kollegen an der Universität Toronto unterstützt. (30)

Noch ist allerdings nicht bewiesen, welche der Tumorzellen so genannte Tumor-Initiating-Cells (TIC) sind und die Fähigkeit zur unkontrollierten Teilung besitzen. (29) So wurden bereits bei vielen Mauspräparations- und Implantations-Versuchen Zellen nachgewiesen, die Stammzellcharakteristika aufweisen. Ob es sich dabei aber um durch Mutation veränderte "normale" Stammzellen oder Tumor-Progenitorzellen handelt, die ein erweitertes Selbsterneuerungspotential aufweisen, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden.

Zu den Stammzellcharakteristika zählen:

1. Möglichkeit der Selbsterneuerung (symmetrische und asymmetrische Zellteilung)
2. Differenzierungsmöglichkeit (Ausbilden von luminalen (CK18) und myoepithelialen Zelltyp(CK14))
3. Telomerase-Aktivität,
4. Aktivierung antiapoptotischer Pathways (z.B. bcl-2 Apoptoseinhibitor),
5. Erhöhte Membrantransporter Aktivität (z.B. ABCG2, Breast Cancer Resistance Protein und damit assoziierte Medikamentenresistenz)

Bedingt können auch die Möglichkeit zur Migration und die Fähigkeit zur Metastasierung mit den Stammzellcharakteristika verbunden werden. (4)(17)(29)(67) (122)(125)

Diese Eigenschaften wurden bei Zellen nachgewiesen, die bestimmte Marker exprimieren. 2003 bestimmten Al Hajj et al. einen Zelloberflächenmarker-Phänotyp: CD44 positiv, CD24negativ/ low und Lineage negativ. (1) Bei diesen Zellen kam es zu einer 50-fach erhöhten Tumorbildungsrate als bei Zellen, die diesen Phänotyp nicht exprimierten. In 1-10% der Zellen der Tumormasse ist dieser Phänotyp zu finden.

Zahlreiche molekulare Marker konnten ermittelt werden, die mit einem Vorkommen von Tumorstammzellen assoziiert werden.

Vimentin und BRCP-1 wurden von Alvi et al. 2002 als Marker für Side-Population angeführt, welche eine Stammzell-Art darstellt. (4)

EGFR, CK5/6, Hormonrezeptor negativ und Sca-1 positive Zellen wurden von Welm et al. 2002 als Marker einer möglichen Progenitorzell-Population gewertet. (122)

Lineage negative, CD29high und CD24 positive Zellen konnten Shackleton et al. 2006 als mögliche Stammzellen evaluieren, des Weiteren wurde hier eine CD49f (α 6-Integrin) Anreicherung und eine erhöhte Aktivität des Wnt-Pathways (Steuerung zur Selbsterneuerung über β 1-catenin) festgestellt. (100) Die Lage der möglichen Tumorstammzellen konnte durch Boecker et al. 2002 den terminalen Endstücken der Drüsen zugeordnet werden. (16)(67)(101)

Auch die unterschiedliche Zytokeratin-Expression lässt Rückschlüsse auf so genannte Tumor-Stammzellen zu, wie etwa bei Charafe-Jauffret et al. 2005, Shackleton et al. 2006 oder bei Korsching et al. 2005 beschrieben werden konnte. (23)(61)(100)

In der EMT-Hypothese (Epithelial-Mesenchymal-Transition), von Thompson et al. und Sommers et al. sowie von weiteren Gruppen beschrieben, werden drei Gruppen differenziert, die sich in Phänotyp, Oberflächen-exprimierten Markern sowie in ihrer Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung unterscheiden. (102)(111) Die erste Gruppe bezeichnet die luminal differenzierte, Östrogenrezeptor positive Zelllinie, die sich durch schwache Invasionsmöglichkeit kennzeichnen lässt. Die zweite Zelllinie zeigt einen schwach luminal-epithelialen Phänotyp mit reduzierter Expression epithelialer Marker der ersten Gruppe. Die letzte Gruppe ist gekennzeichnet durch mesenchymal assoziierte Marker wie Vimentin und durch eine hohe invasive Fähigkeit. Es wird vermutet, dass die schwach luminal-epitheliale Zelllinie einen Durchgangsschritt zur mesenchymal differenzierten Zelllinie durch Ausschalten von Genen für epitheliale Marker bildet, was als EMT-Hypothese zusammengefasst werden kann. (64)

Da das Brustdrüsengewebe starken Auf- und Abbauvorgängen unterworfen ist, durch Pubertät, Laktation und Involution, wird es als stark dynamisches Organ gewertet, so dass vor allem hier die Anwesenheit von Stammzellen, mit den oben beschriebenen

Stammzellcharakteristika zu vermuten ist. (121) Die Erkenntnisse dieser Arbeiten sind für mögliche zukünftige Therapieansätze von größter Bedeutung. Allerdings kann eine gezielte Therapie erst dann erfolgen, wenn genaue valide mögliche Tumor- Stammzell-Charakteristika bekannt sind.

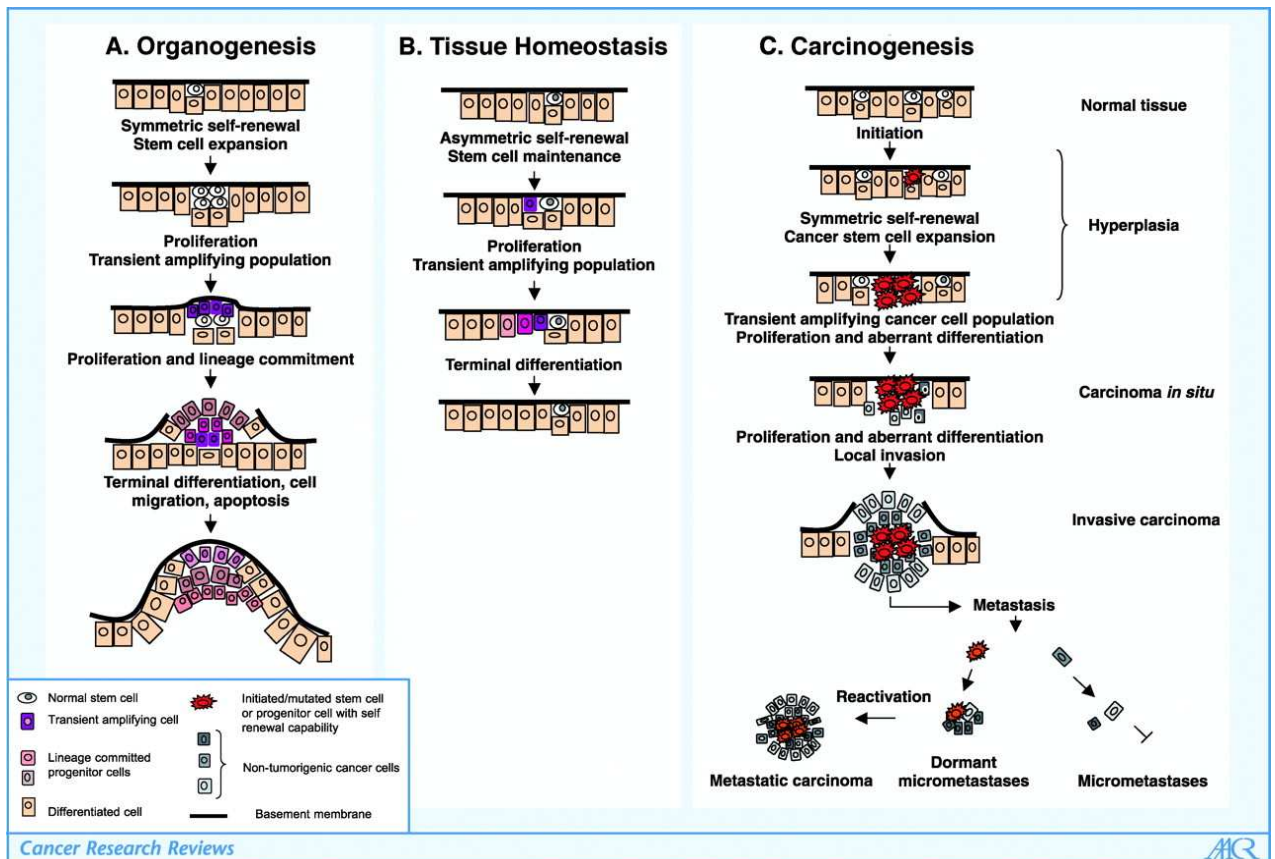


Abbildung 1: Übernommen aus Wicha et al. (126):

Normale Stamm-Zell Entwicklung → Organogenese (A), Tissue Homeostase (B) und mögliche Carcinogenese (C), initiiert durch Stammzellen/Tumorstammzellen, symmetrische Selbsterneuerung

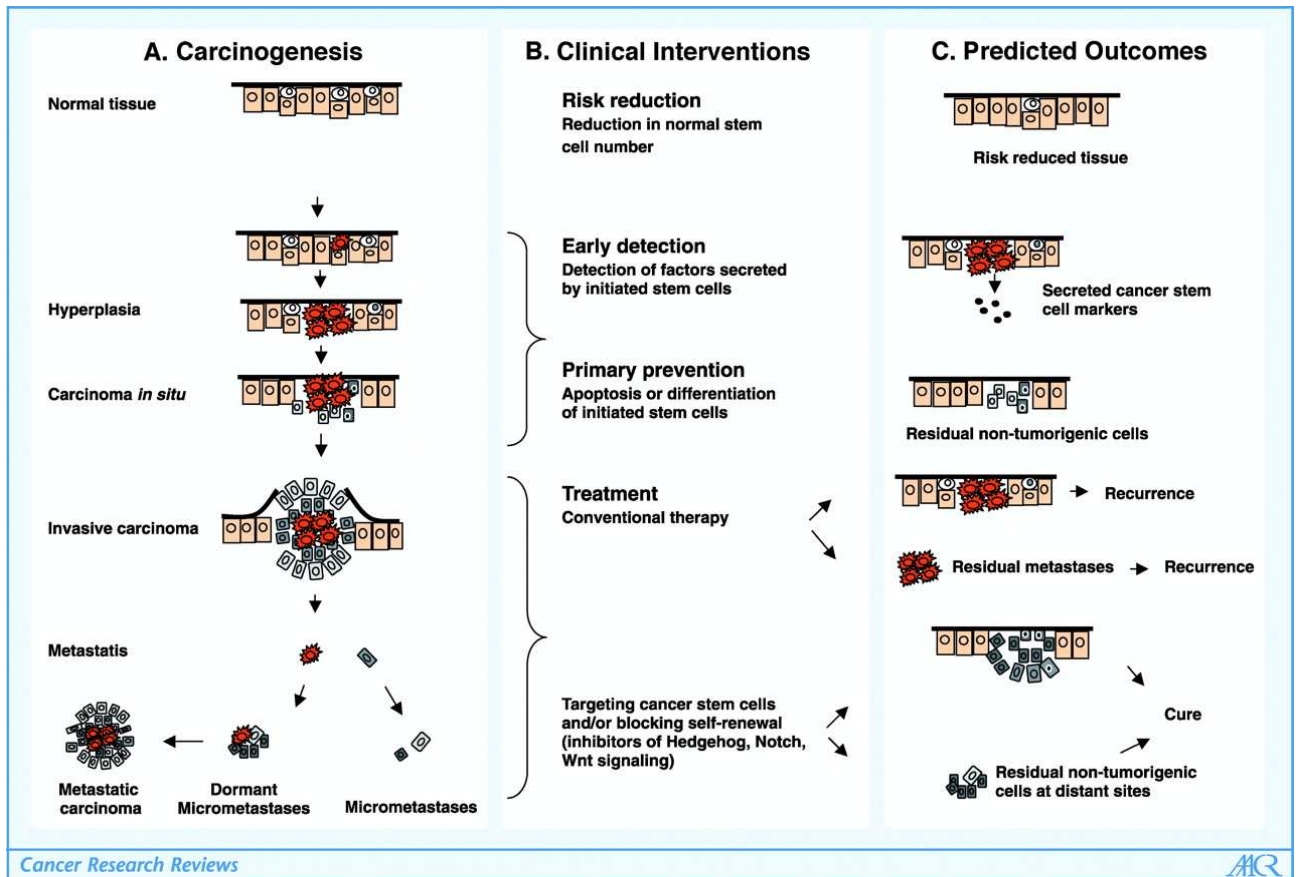


Abbildung 2: Übernommen aus Wicha et al. (126):

Mögliche zukünftige Therapieansätze und klinische Interventionsmöglichkeiten bei tumorstammzellbedingten Karzinomen

2. Ziele der Arbeit

Da schon zahlreiche Arbeiten zum Thema Tumorstammzellen-Vorkommen veröffentlicht wurden und auch in Zukunft dieses Forschungsfeld im besonderen Fokus für mögliche neue Therapieansätze steht, soll nun versucht werden, anhand des hier vorliegenden Patientenkollektives die prognostische Relevanz potenzieller Stammzellparameter, auch als basale Prognosefaktoren beim Mammakarzinom bezeichnet, aufzuzeigen. Es soll überprüft werden, inwieweit prognostische, prädiktive Aussagen bezüglich des Vorkommens dieser Faktoren gemacht werden können. Aufgrund der langen Follow-up-Zeit von 12-16 Jahren wird versucht, mögliche signifikante Korrelationen zwischen den untersuchten Parametern darzustellen. Die immunhistochemische Analytik der unterschiedlichen Gewebeproben und deren mikroskopische Auswertung erfolgte zeitnah. Das zu untersuchende Gewebe wurde zur besseren Analytik auf einen Tissue-Micro-Array gestanzt. Somit konnten direkte Vergleiche der Färbungen vorgenommen werden.

Bei der Auswertung der Daten wurden folgende Fragestellungen berücksichtigt:

- Wie häufig lassen sich die basalen Marker, jüngst als Stammzellmarker bekannt geworden, durch die immunhistochemische Analytik bei dem Patientenkollektiv ermitteln?
- Besteht eine Korrelation zwischen klinisch pathologischen Faktoren wie dem Tumor-Grading, dem Lymphknotenstatus und dem Vorkommen des basalen Marker, auch oftmals als Stammzellmarker benannt?
- Inwieweit korreliert die Expression der verschiedenen basalen Marker mit dem klinischen Verlauf und der Überlebenszeit der Patienten?
- Lassen sich die Ergebnisse auch in der multivariaten Analyse als signifikant bestätigen?

3. Material und Methoden

3.1. Tissue-Micro-Array

Die Tissue-Micro-Array (TMA) Methode wurde 1998 von Kononen et al. in dem Labor von Ollie Kallioniemi eingeführt. (33) Es ist eine Möglichkeit, verschiedene histologische Präparate gleichzeitig zu untersuchen. Hierfür werden aus den ursprünglichen Gewebelöcher jeweils Gewebestücken entnommen und in einen einzigen Paraffinblock überführt. Der Tissue-Micro-Array kann bis zu 1000 zylindrische Gewebeprobe von verschiedenen Tumoren enthalten. Es werden Paraffinstücken aus dem TMA entnommen mit einem Durchmesser von 0,6mm und einer Höhe von 3-4 mm. In diese herausgestanzten Löcher können nun die Proben aus den zu untersuchenden Gewebelöcher eingegeben werden. (60)(96) Zwischen den einzelnen Ständen werden Abstände von 1,0mm eingehalten. Die Ständen und die Herstellung des TMA wird mit einem speziell dafür angefertigten Tissue-Array-Präzisions-Instrument durchgeführt (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA). Um repräsentative Aussagen über die zu untersuchenden Merkmale machen zu können, werden pro Gewebelöcher drei Gewebestücken aus zuvor durch HE-Schnitte gesicherten Tumorebenen entnommen. Hierbei ist darauf zu achten, dass sowohl das Tumorzentrum als auch Randzonen des Tumors mit eingeschlossen sind. Hierdurch wird eine Genauigkeit der immunhistochemischen Diagnostik von über 95% erreicht im Vergleich zu konventionell hergestellten Gewebeschnitten, die auf die zu untersuchten Merkmale angefärbt wurden. (22) Durchgeführte Tests haben bewiesen, dass das Paraffin das Gewebe vor Oxidation schützt und somit die Antigenität der Gewebeprobe bis zu 60 Jahren konserviert.(22)(65)

Von dem neu entstandenen TMA werden nun 3µm dicke Schnitte gefertigt und nach der spezifischen Fragestellung eingefärbt.

3.1.1. Prinzip der Tissue-Micro-Array Konstruktion

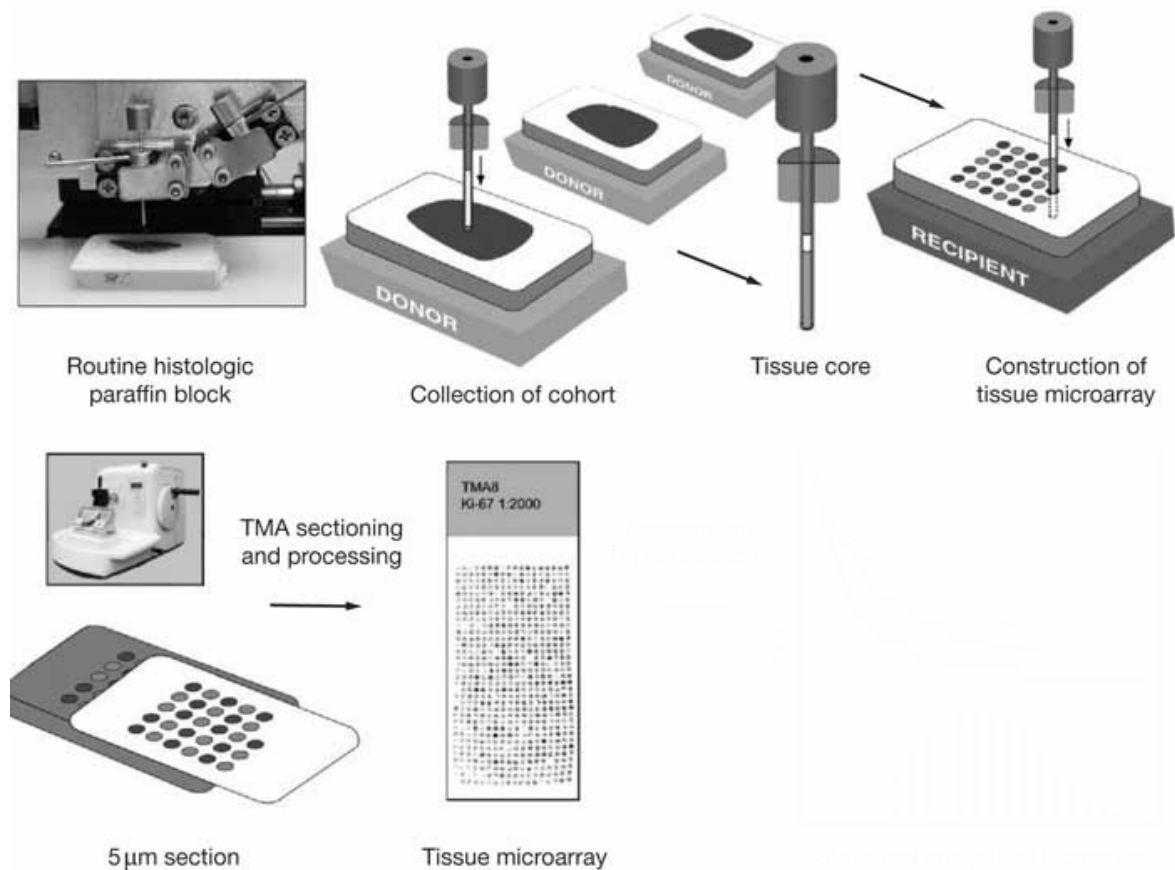


Abbildung 3: Ablaufschritte der TMA Erstellung (modifiziert nach Giltnane /Rimm (41))

- 1: Entnahme der zuvor durch HE-Schnitte gesicherten Tumorareale aus dem Donorblock mit Hilfe des Tissue-Array-Präzisions-Instrumentes
- 2: Einstanzen der tumorhaltigen Gewebeproben in den zu erstellenden Tissue-Micro-Array-Block
- 3: Anfertigung von 3µm dicken Schnitten
- 4: Aufbringen der Schnitte auf Objektträger und spezifische Einfärbung.

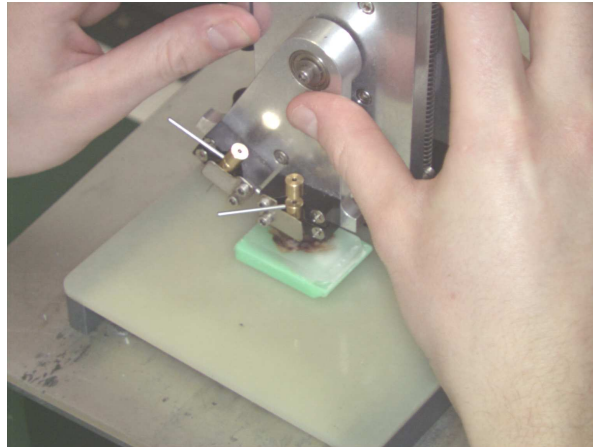


Abbildung 4: Tissue-Micro-Array-Präzisions-Instrument

(Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA)

Einspannen des Paraffin-Donorblockes zur Entnahme des tumorhaltigen Gewebematerials

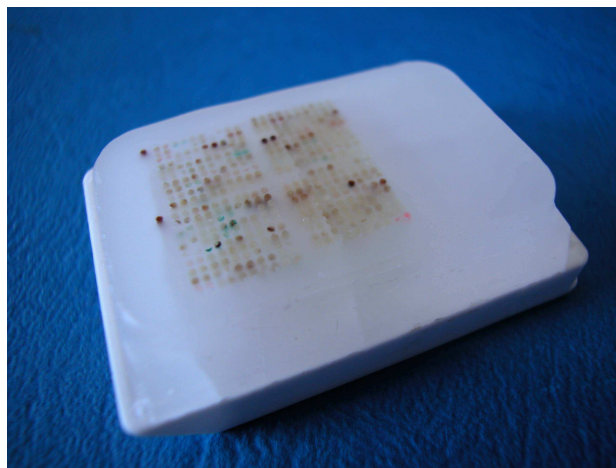


Abbildung 5: Fertiggestellter TMA-Block



Abbildung 6: Paraffinschnitt des angefertigten TMA-Blocks

Jeder TMA-Block ist in vier bis fünf Unterblöcke eingeteilt, die zur besseren Orientierung jeweils zu Beginn eines neuen Unterblockes mit Kontrollgewebe-Stanzen (hier Leberparenchym) gekennzeichnet sind.

3.2. Immunhistochemie

Die angefertigten 3µm dicken Paraffinschnitte des TMA-Blockes wurden zur immunhistochemischen Analytik herangezogen. Dafür erfolgte zu allererst die Entparaffinierung über 20 Minuten mit Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung wird der Schnitt 30 Minuten in Citratpuffer (pH 6,0) im Steamer (Dampfgarer der Firma Braun®) vorbehandelt.

Bei einigen primären Antikörpern (EGFR, BRCP-1) wird anstelle der hitzeinduzierten Epitopdemaskierung eine Vorbehandlung mit Enzymen durchgeführt.

Hierzu wird DAKO REAL™ Proteinase K (Code Nr.S2019) verdünnt in DAKO REAL™ Proteinase K Diluent (Code S2032) über 10 Minuten inkubiert.

Es schließt sich eine ca. 20-30-minütigen Abkühlperiode an.

Die immunhistochemische Einfärbung erfolgt mittels DAKO®-Autostrainer nach dem DAKO REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (LSAB-Methode, indirektes Streptavidin-Biotin-Verfahren). Dieses Verfahren basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. An den Primärantikörper, welcher spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist, bindet sich der Sekundärantikörper, welcher mit Biotin konjugiert ist. Als drittes bindet hieran ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, wobei sich die freien Stellen des Avidinmoleküls an das Biotin des Sekundärantikörpers binden. Über das Enzym Peroxidase, welches nun durch ein geeignetes Chromogen angefärbt wird, wird somit indirekt das gesuchte Antigen sichtbar gemacht.

Um die endogene alkalische Phosphatase zu blocken und eventuelle fälschliche Anfärbungen zu verhindern, wird DAKO REAL™ Levamisol dem DAKO REAL™ AP Substrate Buffer zugegeben.

Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämatoxylin nach Mayer über einen Zeitraum von zwei Minuten. Daran schließt sich eine zweiminütige Wässerung an, um eine deutliche nukleäre Blaufärbung hervorzurufen.

Als Positivkontrolle werden bekannte Proben mitgeführt.

Tabelle 5: Reagenzienliste und optimale Inkubationszeiten (modifiziert nach DAKO REAL™ Detection System (27))

Reagenz	Code-Nr.	Kurzbezeichnung	Matrix-Schritt	Inkubationszeit
DAKO REAL™ ProteinaseK Solution	S2019, S2032	ProK	Vorbehandlung unter AK	10 min
Primärer AK	Individuell-> siehe Tabelle 6		AK	10-25 min
DAKO REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase /RED, Link Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)	K5005	K5005LIN	Sekundäres Reagenz	15 min
DAKO REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase /RED Streptavidin alkaline Phosphatase (AP)	K5005	K5005AP	Tertiäres Reagenz	15 min
DAKO REAL™ Detection System, Chromogen (RED)	K5005	K5005LPR	Substrat-Charge	20 min

Tabelle 6: Primäre Antikörper (modifiziert nach DAKO REAL™ Detection System (27))

Antikörper	Firma	Beschreibung	Verdünnung
Ck5/6	Zytomed	Clon D5/16B4	1:50
ER	DAKO	Clon 1D5	1:100
PR	DAKO	Clon PgR 636	1:2000
EGFR	DAKO	E30	1:200
Mib-1	DAKO	Ki-67	1:100
CK14	Dianova	Clon LL002	1:50
p63	DAKO	Clon 4A4	1:100
BRCP-1	Chemicon	Clon 5D3	1:100
Vimentin	DAKO	Clon V9	1:5000

3.3. Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Färbeergebnisse folgte spezifisch für die verschiedenen Marker. Bei den Hormonrezeptoren und p63 wurde eine nukleäre Anfärbung durchgeführt. Bei CK5/6, CK14, BRCP-1 sowie Vimentin wird ein zytoplasmatisches Vorkommen ermittelt. EGFR wurde bezüglich der Membranexpressivität ausgewertet. Es folgte eine positiv/negativ- Analyse der unterschiedlichen Marker. Bei den Östrogen- und Progesteronrezeptoren musste eine 10%- Schwelle für beschriebene Positivität erreicht werden.

Für Mib-1 erfolgte die Auswertung nach folgendem Standard:

1= bis 10% der Zellen zeigten eine nukleäre Anfärbung,

2=11-25%,

3= >25%. (61)

Die EGFR Analytik erfolgte nach Werten von 0 bis 3

0= keine Membranexpression,

1= geringe,

2=mäßige,

3=starke.

2 und 3 wurden als positives EGFR Vorkommen zusammengefasst und 0 sowie 1 als fehlende EGFR Expression.

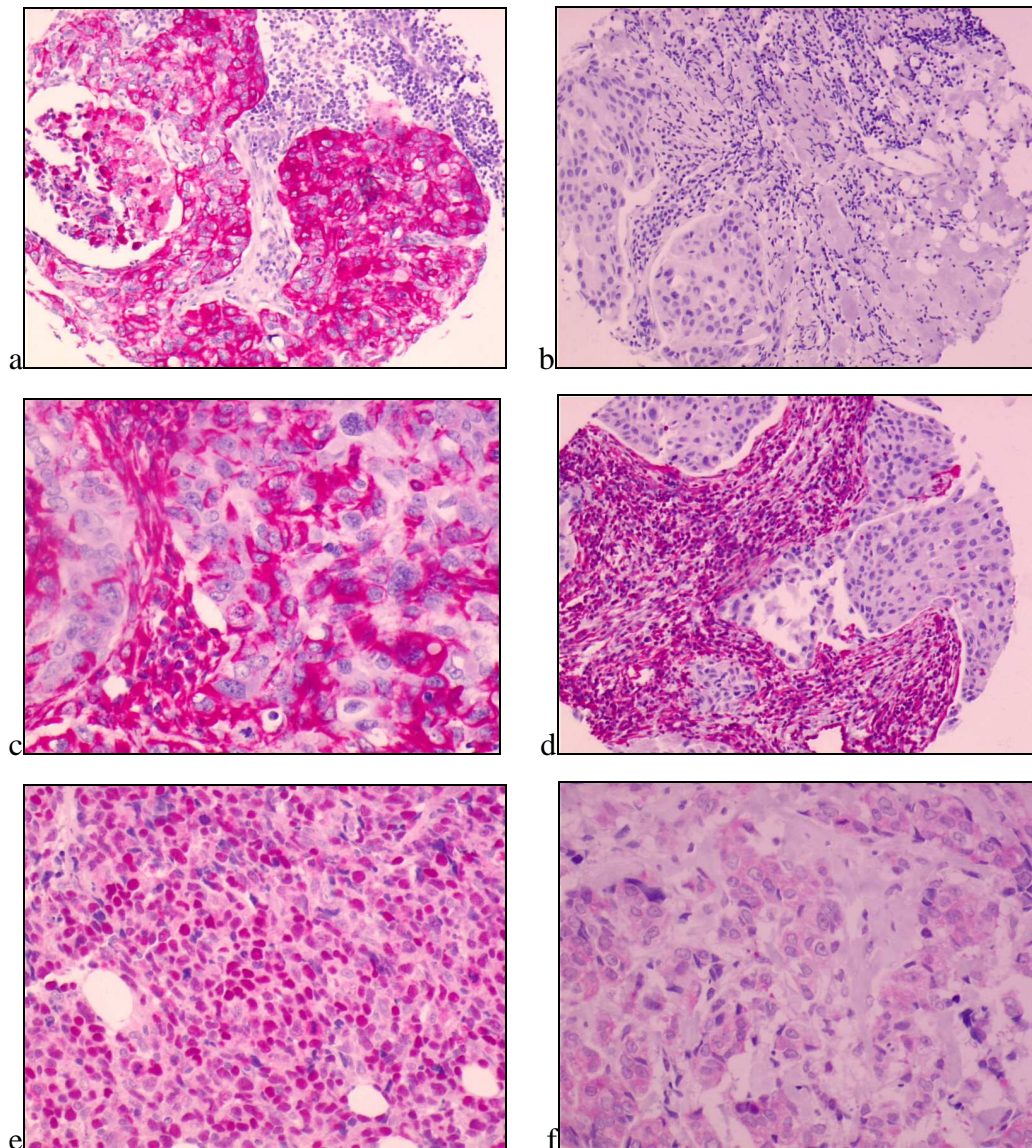


Abbildung: 7 a-f: Repräsentative Abbildungen der unterschiedlichen immunhistochemischen Anfärbungen in 10- bis 20-facher Vergrößerung.

a: CK5 pos (10-f.); b: CK5 neg (10-f.); c: Vimentin pos (20-f.); d: Vimentin neg (10-f.);

e: p63 pos (20-f.); f: p63 neg (20-f.);

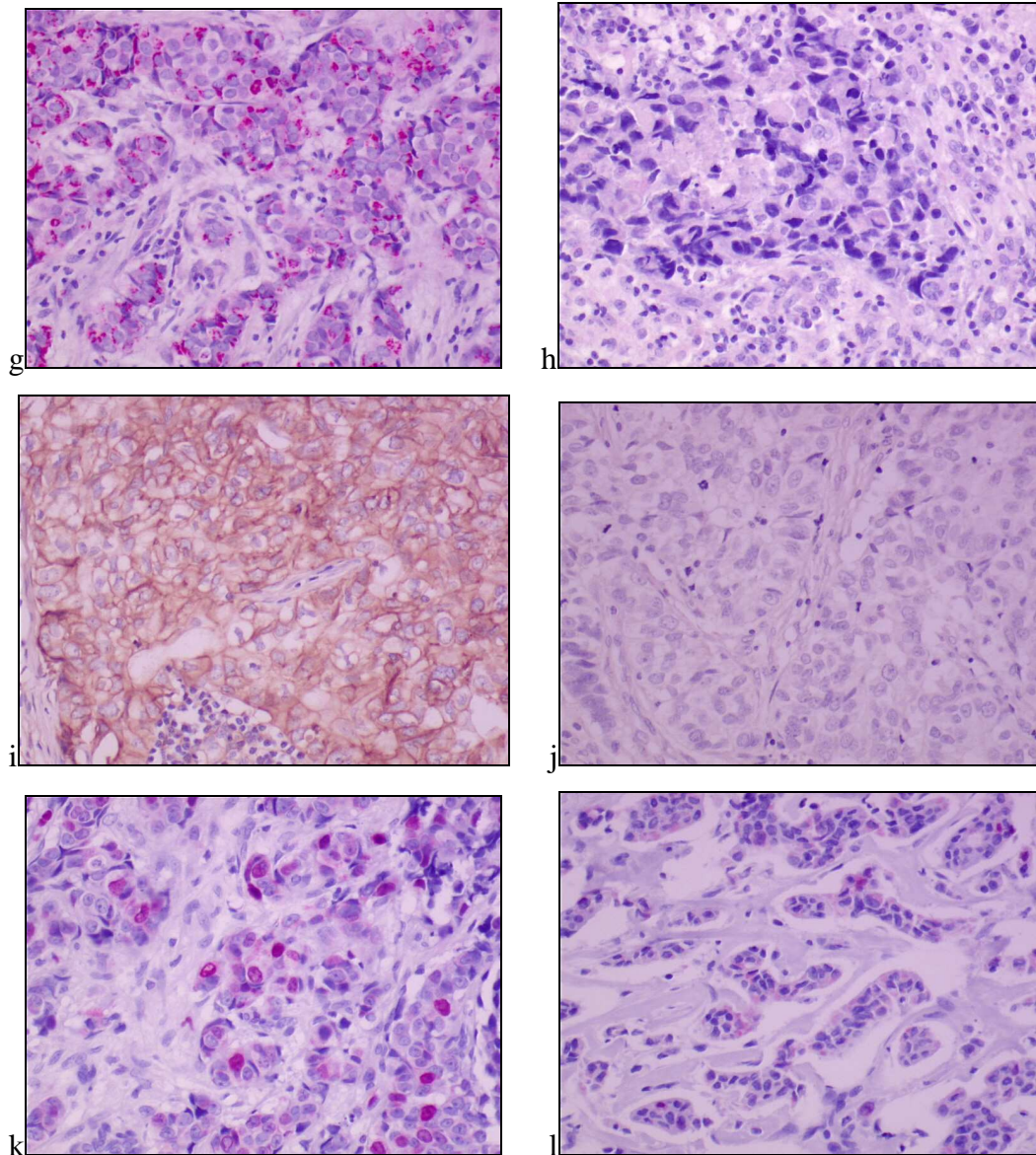


Abbildung: 7 g-l: Repräsentative Abbildungen der unterschiedlichen immunhistochemischen Anfärbungen in 10- bis 20-facher Vergrößerung.

g: BRCP-1 pos (20-f.); h: BRCP-1 neg (20-f.); i: EGFR pos (20-f.); j: EGFR neg (20-f.);

k: Mib-1 pos (20-f.); Mib-1 neg (20-f.)

3.4. Patientenkollektiv

Untersucht wurden 217 Gewebeproben eines primären Mammakarzinoms, die im Zeitraum von 1988-1992 als Operationspräparate im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster untersucht wurden. Das Tumorkollektiv setzte sich aus 19 hoch differenzierten (G1)(9,6%), 123 mittelgradig differenzierten (G2)(62,1%) und 56 niedrig differenzierten (G3)(28,3%) Mammakarzinomen zusammen. Die Klassifikation erfolgte nach Elston und Ellis. (34)(15) Bei 19 Gewebeproben konnte ein Differenzierungsgrad nicht ermittelt werden. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 55 Jahren. Die jüngste Patientin war bei Feststellung des Mammakarzinoms 31 Jahre alt und die älteste Patientin 90 Jahre. Histologisch fanden sich in 88,9% der Fälle ein duktal-invasives Mammakarzinom, 7,4% der Karzinome zeigten eine lobuläre Differenzierung, 2,8% zeigten eine medulläre oder tubuläre Differenzierung und in 0,9% der Fälle erfolgte keine histologische Klassifikation.

Das Tumormaterial wurde routinemäßig in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Erstellung des Tissue-Micro-Arrays und die sich anschließende Anfärbung erfolgten im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Münster.

3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Analytik erfolgte mit dem Programm SPSS in der Version 11.5.1.. Zur Analytik erfolgte die Berechnung der deskriptiven Häufigkeitsverteilung sowie die Überlebenszeitanalyse nach der Kaplan-Meier-Methode unter Einbeziehung des nichtparametrischen Log-Rank-Testes zur Erstellung der Gruppenvergleiche.

Es wurde mit einem vorgegebenem Fehlerniveau α von 5% ausgewertet. (131)(132)

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeine Ergebnisse der untersuchten Mamma-karzinome

Bei der Untersuchung der 217 Mammakarzinom-Gewebeproben konnten folgende Ergebnisse aufgezeigt werden. Die Patientinnen befanden sich zum Diagnosezeitpunkt zu 34,7% im prämenopausalen Status, zu 5,8 % im peri- und zu 59,4% im postmenopausalen Status.

Das mediale Erkrankungsalter lag bei 55. Lebensjahren, wobei die Gewebeproben von Patientinnen im Alter von 31-90 Jahren stammten. Im Durchschnitt hatte jede Patientin 2,44 Schwangerschaften, davon medial 2,03 beendet und im Mittel 0,41 Aborte.

Die Einstufung nach dem pTNM System zeigte folgende Verteilung:

39,2% der untersuchten Mammakarzinome entsprachen einem pT1 klassifizierten Stadium, 39,2% einem pT2 Stadium, 7,4% zeigten eine pT3 Klassifikation und 14,3% ließen sich in das pT4 Stadium eingruppierten.

Bei 57,1% der Patientinnen fanden sich keine Lymphknotenmetastasen, 27,2% zeigten einen Befall entsprechend dem Stadium pN1, 13,4% eine pN2 Zugehörigkeit, 1,8% entsprachen pN3 und bei 0,5% der Fälle wurde das Stadium pN4 ermittelt. Fernmetastasen konnten in 10,6% der Fälle gefunden werden (M1), 89,4% zeigten kein Vorkommen von Fernmetastasen (M0).

Einen positiven Hormonrezeptorstatus fand man für Östrogen bei 64,7% und für Progesteron bei 58,9% der untersuchten Gewebeproben. Ein negativer Status zeigte sich für Östrogen bei 35,3%, für Progesteron bei 41,1% der Fälle. (siehe Tabelle 7)

Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der allgemeinen statistischen Auswertung

Parameter	Anzahl (n)	Prozent (%)	
pT	->1	85	39,2
	->2	85	39,2
	->3	16	7,4
	->4	31	14,3
pN	->0	124	57,1
	->1	59	27,2
	->2	29	13,4
	->3	4	1,8
	->4	1	0,5
M	->0	194	89,4
	->1	23	10,6
Grading	->1	19	8,8
	->2	123	56,7
	->3	55	25,3
	->4	1	0,5
Hormonrezeptorstatus	->ER+	123	64,7
	->ER-	67	35,3
	->PR+	112	58,9
	->PR-	78	41,1
Menopausaler Status	->prämenopausal	72	34,7
	->perimenopausal	12	5,8
	->postmenopausal	123	59,4

Im Verlauf der Erkrankung kam es bei 20,7% der Patientinnen zum Auftreten eines Tumorrezidives, im Mittel nach einer Erkrankungsdauer von 34,7 Monaten nach Erst-

diagnosezeitpunkt, bei 43,3% zeigte sich im Staging eine Metastasierung des Mammakarzinoms, welche durchschnittlich nach 27,35 Monaten auftrat.

Bei 34,6% der Patientinnen kam es aufgrund eines progredienten Krankheitsverlaufes zum tumorbedingten Versterben, gesehen auf einen Follow-up-Zeitraum von zwölf bis sechzehn Jahren bis einschließlich April 2004, welches im Mittel nach einem 53-monatigen Krankheitsverlauf eintrat.

Die durchschnittliche Überlebensdauer bis zum Auftreten eines Rezidiv, einer Metastase oder eines tumorbedingten Versterbens, welches bei 57,9% der untersuchten Fälle eintrat, betrug im Durchschnitt 38,13 Monate.

Die Gesamtüberlebenszeit aller Patientinnen, bei 8 Patientinnen wurden keine Angaben gemacht, lag durchschnittlich bei 112,7 Monaten. 37,9 % der untersuchten Patientinnen erlagen ihrer Tumorerkrankung, 50,2 % der Patientinnen lebten bis zum Ende des Follow-up-Zeitpunktes April 2004 noch. (siehe auch Tabelle 8)

Tabelle 8: Deskriptive Statistik des tumorfreien Überlebens und des Gesamtüberlebenszeitraumes

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Tumorfreies Überleben	215	0	195	86,40	69,88
Gesamtüberleben	209	1	195	112,69	62,57

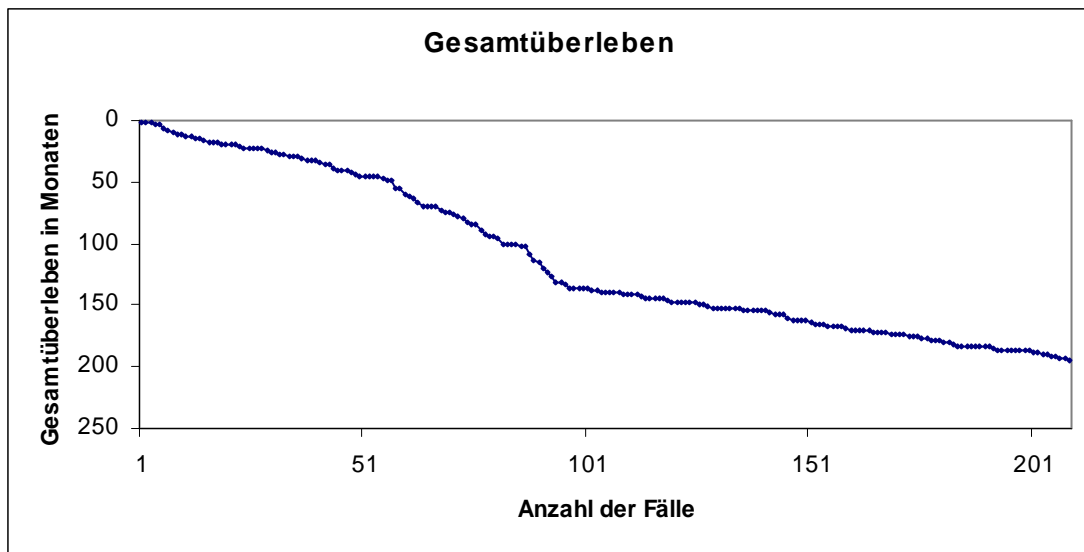


Abbildung 8: Gesamtüberleben bis zum Eintritt des tumorbedingten Todes.

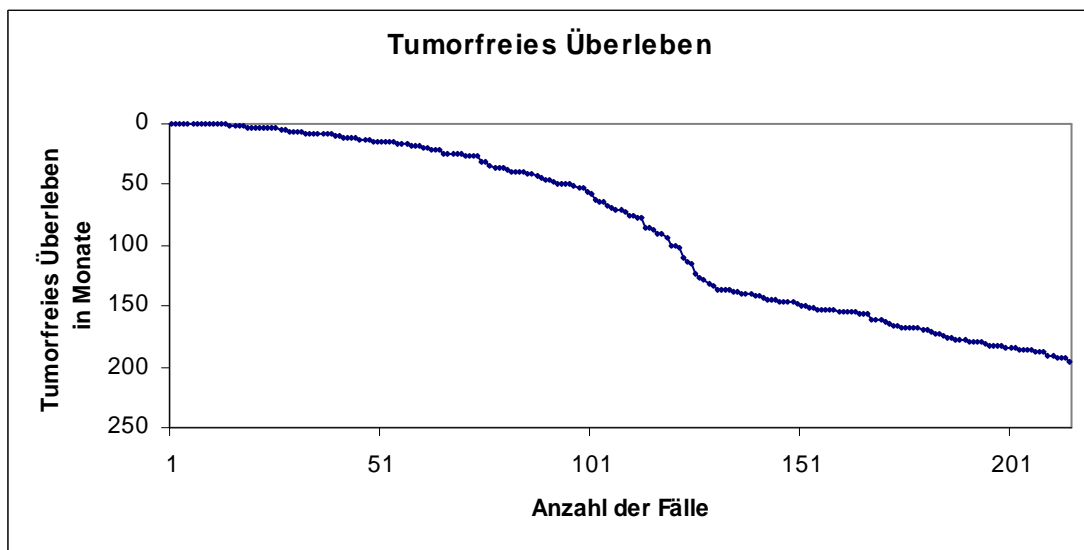


Abbildung 9: Tumorfreies Überleben bis zum Eintritt von Metastasen, Rezidiv oder tumorbedingtem Versterben.

Das therapeutische Konzept setzte sich wie folgt zusammen: 60,2% der Patientinnen erhielten eine postoperative Strahlentherapie, chemotherapeutisch wurden 26,7% der

Patientinnen behandelt, 1,4% davon neoadjuvant. Als Chemotherapieschemen wurden CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluoruracil), AC (Adriamycin, Cyclophosphomid) oder FAC/FEC durchgeführt. Eine endokrine Therapie erhielten 36,9% der Patientinnen, bei 4,1% wurde eine Kombination aus Chemo- und Hormontherapie durchgeführt. Auffallend war hierbei der sehr geringe Prozentsatz der Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten. Er liegt mit einem Prozentsatz von 26,7% weit unter dem heutzutage anzutreffenden Satz für adjuvante Chemotherapieregime des Mammakarzinomes.

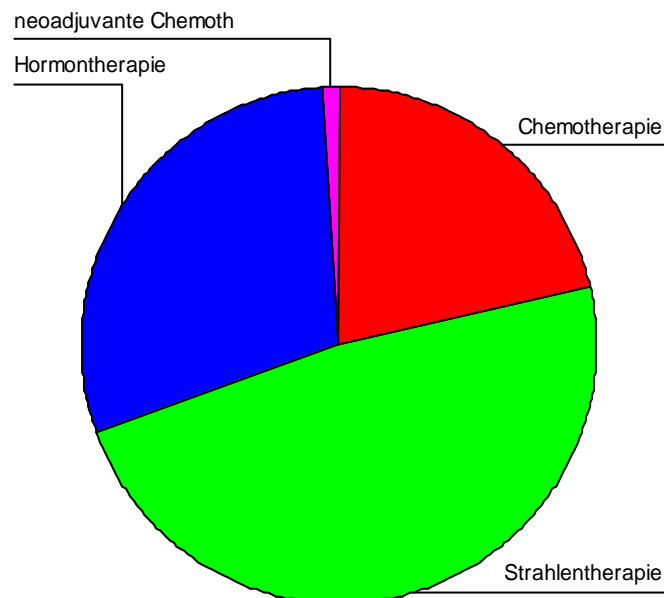


Abbildung 10: Verteilung der Therapieregime.

4.2. Auswertung der molekularbiologischen Parameter

Die Auswertung der angefärbten molekularbiologischen Marker zeigte folgende Ergebnisse. Das Tumorsuppressor-Gen BRCP-1, welches zytoplasmatisch angefärbt wurde, konnte bei n=175 zu 5,1% positiv ausgewertet werden. Als weiterer Tumorsuppressor wurde p63 untersucht, der in n =169 zu 5,3% positiv nachweisbar war. Der nukleär gefärbte Proliferationsmarker Mib-1/Ki-67 konnte in n=154 verwertet werden. Bei 54,5% der Fälle zeigte sich hierbei eine 0 bis 10%ige nukleäre Anfärbung der Zellen, 28,6% der Fälle exprimierten eine 11-25%ige Anfärbbarkeit und bei 16,9% der Fälle wurde eine über 25%ige nukleäre Markierung nachgewiesen. (61)

Die basalen, plattenepitheltypischen Zytokeratine der Gruppe 1, CK5/6, wurden bei n=170 zu 10% positiv gewertet. Das Zytokeratin der Gruppe 2, CK14, zeigte bei n =159 zu 9,4% ein positives Ergebnis. Vimentin konnte bei n =169 zu 13% positiv gewertet werden.

Die EGFR Analytik erfolgte nach Werten von 0 bis 3 in n =171. Davon zeigten 66,1% keine, 16,4% eine geringe, 14% eine mäßige und 3,5% der Fälle eine starke Membranexpression. Bei der zusammengelegten Auswertung wurden die Werte 2 und 3 zu 17,5% als positiv zusammengefasst und die Ergebnisse für 0 und 1 mit einem prozentualen Vorkommen von 82,5% als negativ eingestuft.

Tabelle 9: Übersicht der Häufigkeitsverteilungen der Färbeergebnisse

Parameter	Anzahl (n)	Prozent (%)
BRCP-1		
-> pos	9	5,1
-> neg	166	94,9
P63		
-> pos	9	5,3
-> neg	160	94,7
Mib-1/Ki-67		
-> 0-10% pos	84	54,4
-> 11-24% pos	44	28,6
-> über 25% pos	26	16,9
CK 5/6		
-> pos	17	10
-> neg	153	90
CK 14		
-> pos	15	9,4
-> neg	144	90,6
EGFR-Expression		
-> keine	113	66,1
-> geringe	28	16,4
-> mäßige	24	14
-> Starke	6	3,5
Vimentin		
-> pos	22	13
-> neg	147	87

4.3. Gruppenspezifische Vergleiche der Überlebenswahrscheinlichkeiten

Die Auswertung der unterschiedlichen Überlebenszeiten erfolgte mittels der Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier unter Einbeziehung des nichtparametrischen Log-Rank-Testes zur Erstellung der Gruppenvergleiche. Die 217 Mammakarzinom-Gewebeproben des Untersuchungs-Zeitraumes von 1988-1992 zeigten dabei signifikante Ergebnisse im Gesamtüberleben nach der Erstdiagnose für folgende Prognoseparameter: Grading, Lymphknotenstatus und Hormonrezeptorstatus. Die signifikanten Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen präsentiert.

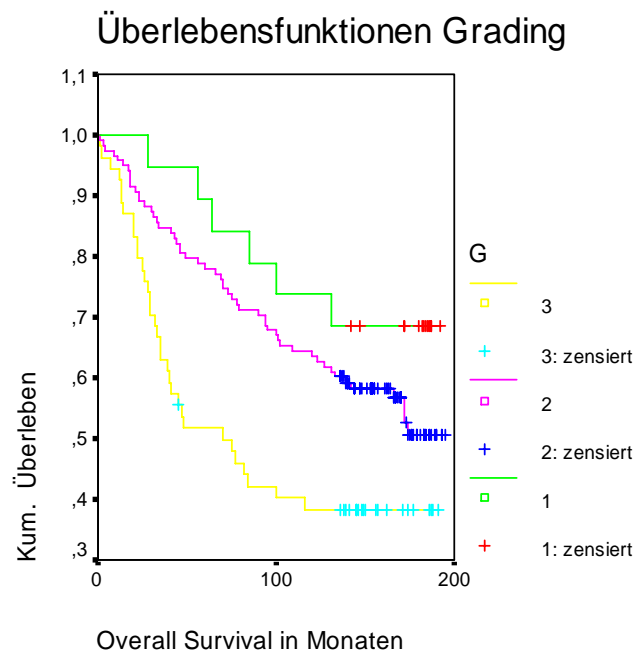


Abbildung 11: Statistische Auswertung der Grading-Unterteilung; $p = 0,003$

G1: n (19); Mean Survival Time 156 Monate; Standardfehler 13;
95% Konfidenzintervall (130;181)

G2: n (138); Mean Survival Time 138 Monate; Standardfehler 6;
95% Konfidenzintervall (125;150)

G3: n (54); Mean Survival Time 97 Monate; Standardfehler 11;
95% Konfidenzintervall (77;118)

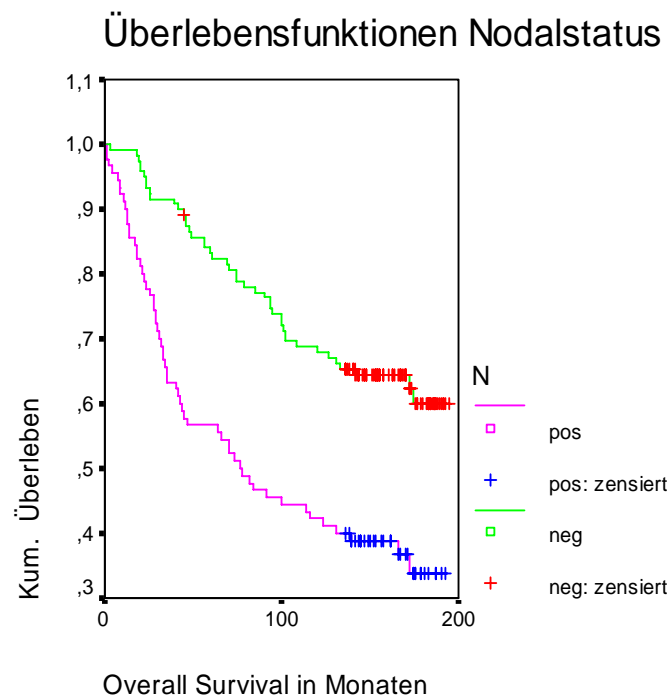


Abbildung 13: Statistische Auswertung bezogen auf den vorhandenen Lymphknotenstatus bei Erstdiagnose; $p = 0,000$

N negativ: n (119); Mean Survival Time 149 Monate; Standardfehler 6;
95% Konfidenzintervall (137;160)

N positiv: n (90); Mean Survival Time 100 Monate; Standardfehler 8;
95% Konfidenzintervall (84;116)

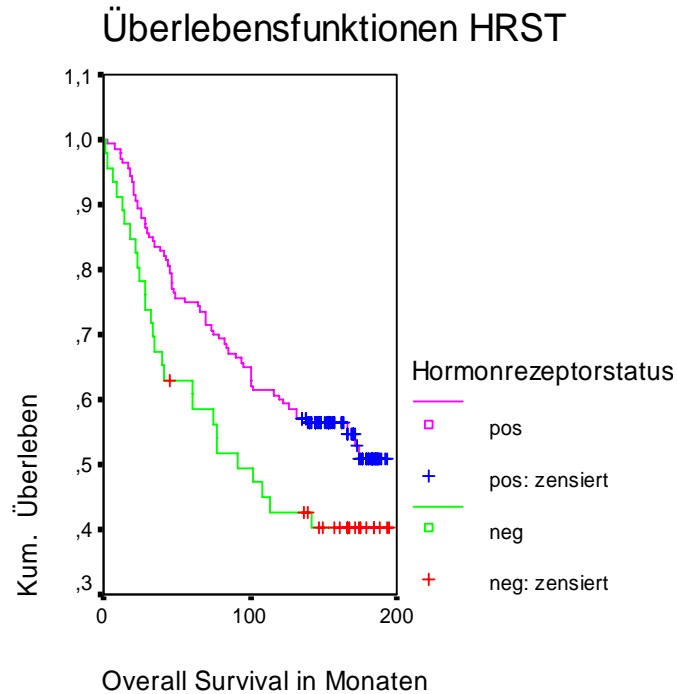


Abbildung 14: Statistische Auswertung des vorhandenen Hormonrezeptorstatus; $p = 0,049$

Hormonrezeptorstatus negativ: n (46); Mean Survival Time 107 Monate; Standardfehler

12; 95% Konfidenzintervall (85;130)

Hormonrezeptorstatus positiv: n (140); Mean Survival Time 133 Monate; Standardfehler

6; 95% Konfidenzintervall (121;145)

Im Hinblick auf die zum Teil hochsignifikanten Ergebnisse im Bereich dieser Prognosefaktoren kann das hier untersuchte Patientenkollektiv als valide eingestuft werden. Auch in der Verteilung der allgemeinen Parameter wie Hormonrezeptorstatus, TNM-Klassifikation und weiterer Faktoren wie oben angegeben entspricht das Patientenkollektiv der allgemein angenommenen Normalverteilung untersuchter Mammakarzinome.

Des Weiteren erfolgte die Untersuchung folgender immunhistochemischer Marker:

Mib-1 als Proliferationsmarker, BRCP-1 und p63 als Tumorsuppressor-Gene, CK5/6, CK14 und Vimentin als Marker für mesenchymales Gewebevorkommen, EGFR und Östrogen- sowie Progesteronrezeptor als Hormonrezeptormarker. Die untersuchten Parameter wurden jeweils in Abhängigkeit zu den oben genannten Prognoseparametern in der multivariaten Analyse gesetzt.

Bei der Auswertung der genannten Faktoren zeigten sich erhebliche Schwierigkeiten, da es aufgrund der Schichtung nach den oben genannten Prognosefaktoren zur Aufspaltung in nicht mehr signifikant zu untersuchende Subpopulationen von zum Teil $n=1$ kam. Dies soll beispielsweise an der Auswertung des Mib-1 Vorkommens, der Vimentin- sowie der p63- und CK5/6-Expression verdeutlicht werden. Die Auswertung erfolgte gesehen auf das Gesamtüberleben, unterteilt nach dem unterschiedlichen Grading. (siehe Abb. 15 -18) Weitere nicht signifikante Daten wurden nicht aufgeführt.

Die Mib-1 Auswertung erfolgte nach folgendem Standard:

- 1 = bis 10% der Zellen zeigten eine nukleäre Anfärbung,
- 2 = 11- 25%,
- 3 = >25% der Zellen lassen sich anfärben.

G1 Karzinome zeigen eine signifikant geringere Proliferationsrate mit unter 10% angefärbten Zellkernen als G3 Karzinome mit einem Anteil von über 20%.

Durch die Schichtung nach dem Grading kam es bei dem vorhandenen Patientenkollektiv zur Aufteilung in sehr kleine Subpopulationen, so dass bei der Aufteilung keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten.

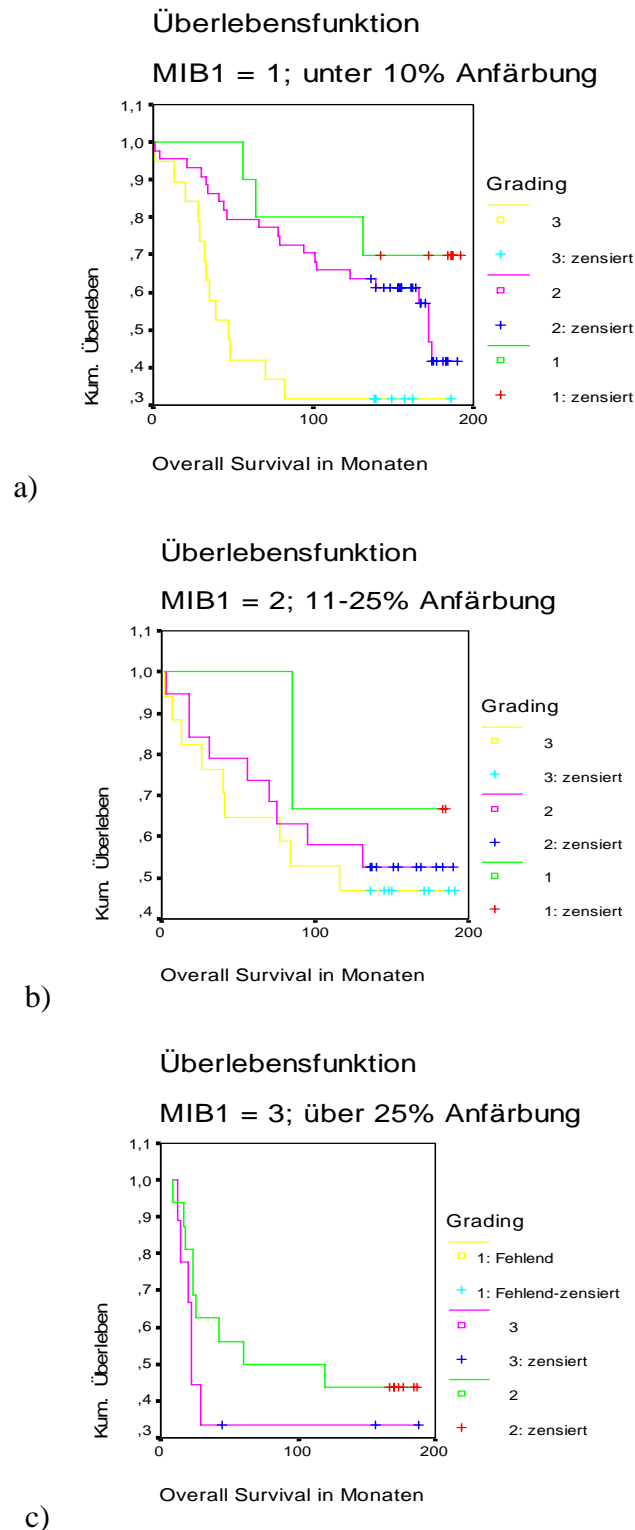


Abbildung 15 a-c: Statistische Auswertung nach dem Vorkommen des Proliferationsmarkers Mib-1 in der multivariaten Analyse. Die unterschiedliche Differenzierung erfolgte in Abhängigkeit von dem Prognosefaktor Grading. Die Berechnungen für die Überlebenszeiträume sind

im Anhang aufgelistet und für die jeweiligen Subpopulationen berechnet. Auffallend ist hierbei, dass die Mib-1 Expression für G1 Tumoren noch im signifikanten Bereich liegt. Hier sind die Mib-1=3 Tumoren unabhängig vom Grading betrachtet mit dem schlechtesten Outcome assoziiert. Bei den höheren Grading-Aufteilungen konnte aufgrund der geringen Subpopulationen keine signifikante Aussage gemacht werden. Anhand der Graphen kann dies nachvollzogen werden. Hier finden sich zum Teil Überschneidungen der unterschiedlichen Mib-1 Expression. Dies zeigt, dass es sich hierbei um nicht signifikante zu bezeichnende Ergebnisse handelt.

Auch die zytoplasmatische Anfärbung basal-, myoepithelialen und plattenepitheltypische Zytokeratine CK5 und CK6 wurde in der multivariaten Analyse untersucht, gesehen auf eine eventuelle Abhängigkeit vom Grading, welches sich signifikant als Prognosefaktor zeigte.

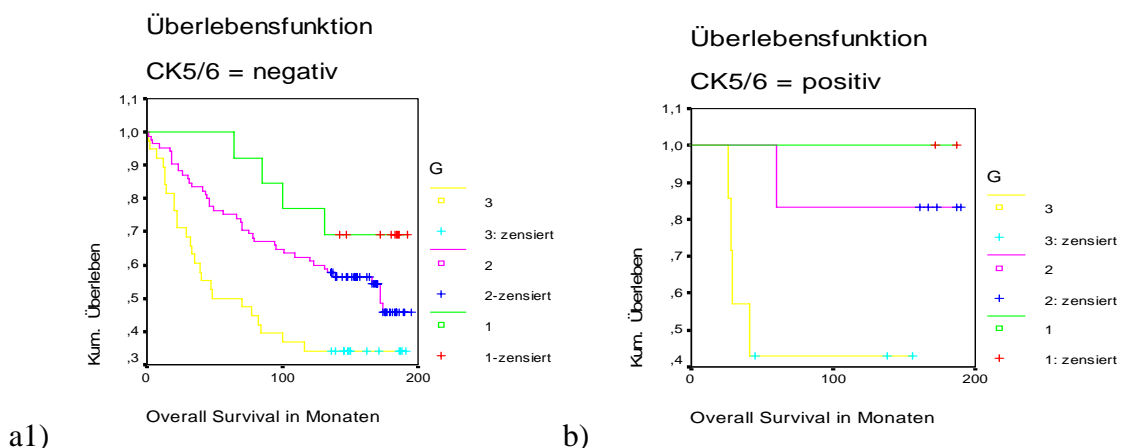


Abbildung 16 a/b: Statistische Auswertung der CK 5/6 Differenzierung der Mammakarzinome. Die Unterteilung erfolgte in Abhängigkeit vom jeweiligen Grading. Für die Gruppe der CK5/6 negativen Tumoren konnten signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Hier findet sich eine Unabhängigkeit vom unterschiedlichen Grading. Bei den CK5/6 positiven Tumoren ergaben sich zum Teil so geringe Subpopulationen, dass eine signifikante Aussage hier nicht zu treffen ist.

Vimentin wurde als Marker für mesenchymales Gewebevorkommen bei den Mammakarzinomen untersucht. Es wurde vermutet, ob hier möglicherweise eine alleinige prognostische Aussage aufgrund der Vimentin Expression gemacht werden kann. Leider zeigte sich auch hier, dass eine Unabhängigkeit vom Prognosefaktor Grading nicht gegeben war.

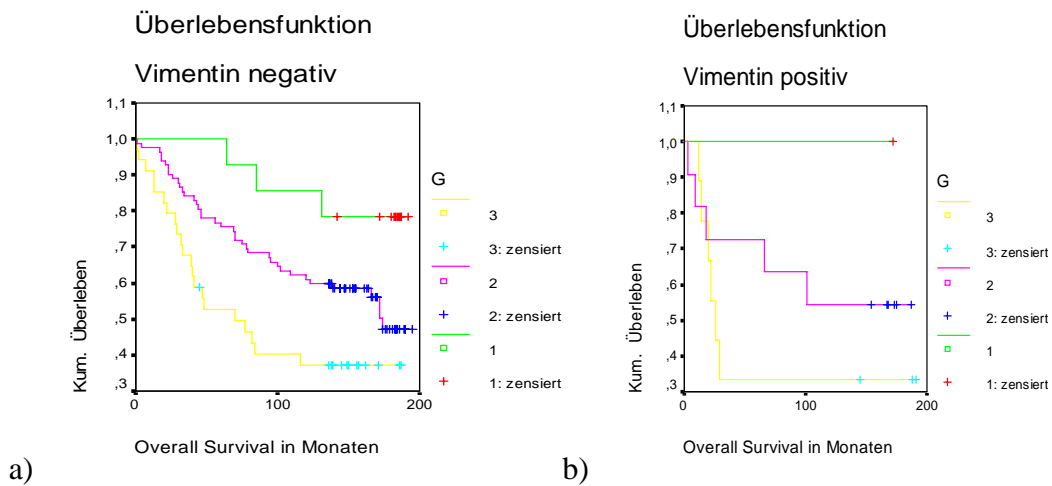


Abbildung 17 a/b: Statistische Auswertung der Vimentin-Expression, differenziert nach der unterschiedlichen Grading- Unterteilung. Für die Vimentin negativen Tumoren lagen die Ergebnisse im signifikanten Bereich, bei den positiven Tumoren zeigten sich wieder starke Unregelmäßigkeiten, so dass nicht allein durch das Vimentin-Vorkommen unabhängig vom Grading eine prognostische Aussage getroffen werden kann.

Das Tumorsuppressorgen p63 konnte in der zuvor schon erläuterten multivariaten Analyse nicht als unabhängiger Prognosemarker erkannt werden.

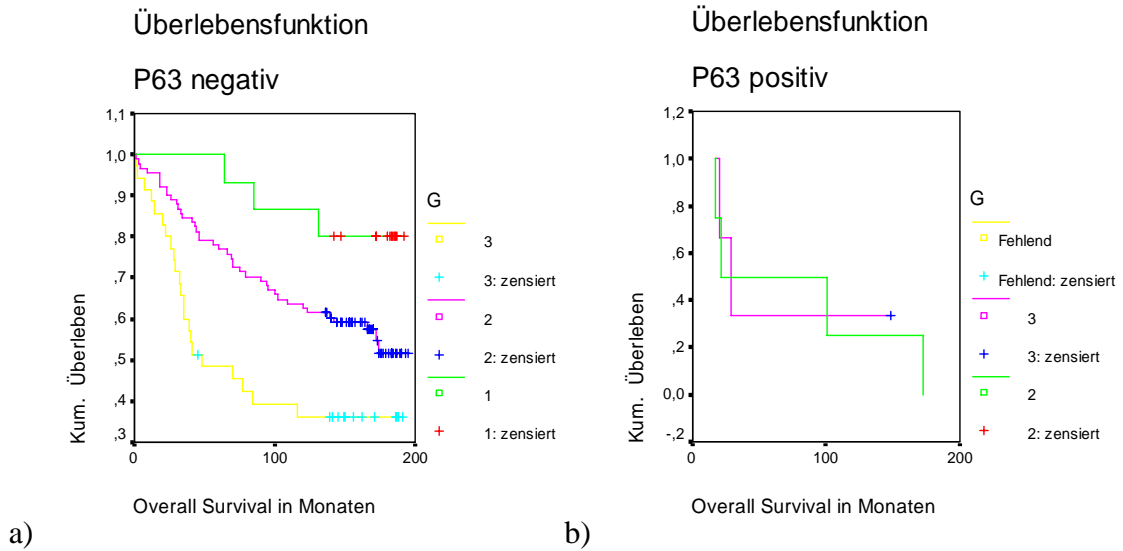


Abbildung 18 a/b: Statistische Auswertung des p63 Vorkommens, differenziert nach der unterschiedlichen Grading-Unterteilung. Bei den negativen Tumoren fallen wieder signifikante Ergebnisse auf. Die p63-negativen Tumoren waren so gering vertreten, dass eine signifikante Aussage nicht getroffen werden konnte.

5. Diskussion

Das Mammakarzinom nimmt weltweit die führende Position der Mortalitäts- und Morbiditätsliste von Erkrankung bei Frauen ein und repräsentiert morphologisch wie klinisch eine ausgesprochene heterogene Gruppe von malignen Tumoren. (39)(78) Dies zeichnet sich insbesondere aus durch unterschiedliche histologische und immunhistochemische Phänotypen sowie speziellen biologischen, genetischen und molekularen Charakteristika, welche teilweise mit sehr eigenen Überlebensprognosen assoziiert sind. (19)(37)(43)(54) Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass auch Unterschiede in den verschiedenen Therapieoptionen und im Ansprechen auf mögliche, teils bekannte, teils noch zu entwickelnde Therapien bei den verschiedenen Formen des Mammakarzinoms derzeit schon zu finden beziehungsweise in der Zukunft zu erwarten sind. (28)(43)(73) Durch ein enorm gesteigertes Wissen, welches in den letzten Jahrzehnten angehäuft wurde, wird es demnach immer wichtiger, Mammakarzinom-Patientinnen gezielter zu untersuchen und die entsprechenden Gewebeproben im Hinblick auf immunhistochemische Eigenschaften und spezifische molekularbiologische Marker genauer und eingehender zu diagnostizieren. Dies geschieht zum einen zur besseren Abschätzung der Prognose als auch zur gezielteren Therapieprädiktion. Dementsprechend befinden sich molekulare Faktoren / Marker im Übergang zum routinemäßigen klinischen Gebrauch. Der genaue prognostische Wert, welcher über das derzeit durchgeführte Tumorigradung, das Staging und den Hormonrezeptorstatus hinausgeht, muss jedoch in Zukunft erst noch evaluiert werden. (6)(64)(125) Um auf die prognostische Relevanz der unterschiedlichen Faktoren einzugehen ist neben einem allgemeinen Verständnis um die Wertigkeit prognostisch und prädiktiver Marker auch ein sehr detailliertes Verständnis über Mechanismen der Tumorentstehung notwendig. (4)(17)(29)(30)(67)(122)(125) Es fällt auf, dass dieser Bereich der Onkologie in den letzten Jahren sehr rapiden Entwicklungen und einem erweiterten Erkenntnisstand unterworfen ist. Speziell Erkenntnisse aus der Entwicklungsbiologie werden derzeit immer mehr auf die Tumorentstehung angewandt. Dementsprechend wird ein Tumor nicht mehr als Anhäufung maligner, entarteter Zellen gesehen sondern vielmehr als ein "Tumororgan". (4)(123)

Speziell beim Mammakarzinom ist derzeit das Verständnis der Tumorentstehung neuen Überlegungen ausgesetzt. Dies beruht auf der Kenntnis um physiologische Stammzellen der Brustdrüse. (1)(4)(16)(67)(101)(122) Ausgehend von der These, dass das Mammagewebe zahlreichen Um- und Aufbauvorgängen während des normalen Zyklus, der postnatalen Involution, der pubertären Entwicklung sowie Schwangerschaft und laktationsbedingten Proliferationsvorgängen unterworfen ist, ist davon auszugehen, dass die Brustdrüse, wie bisher immer beschrieben, nicht aus zwei, sondern vielmehr aus drei verschiedenen Zellkompartimenten aufgebaut ist. (121) Dies steht im Gegensatz zum bislang postulierten Modell von zwei Zellkompartimenten, mit einer inneren luminalen, drüsigen Zellpopulation und einer äußeren basalen, myoepithelialen Zellschicht. (57)

Basierend auf den Untersuchungen von Boecker et al. konnte gezeigt werden, dass putative physiologische Brustdrüsenzellen mit einem Brustdrüsen-Stammzellpool in den terminalen-duktalem-lobulären-Einheiten (TDLE) der Mamma zu sehen sind. (16) Diese Zellpopulation erfüllt theoretisch typische Stammzellcharakteristika, wie ein Selbsterneuerungspotenzial und eine Differenzierungsmöglichkeit in alle in der Brustdrüse exprimierten Zelltypen. So konnte aufgezeigt werden, dass sowohl glanduläre / luminalen / CK8 / CK18 und CK19 positive Zelllinien als auch myoepitheliale / SMA positive Zelllinien von dieser Zellpopulation ausgebildet werden können. (23)(57)(61)(100)(126) Eine besondere Eigenschaft dieser putativen Brustdrüsenzellen ist die Expression von hochmolekularen Zytokeratinen, speziell von CK5, CK14 und CK17. Dies steht speziell auch im Einklang mit den Studien von Shackelton et al. mit einer CK5 Positivität, gleichzeitiger hoher Expression von CD29 und CD24. (100) Wie aus immunhistochemischen Arbeiten indirekt hergeleitet, konnte zwischenzeitlich von der Arbeitsgruppe von Shackelton et al. das Vorkommen der möglichen Brustdrüsen-Stammzellen in die terminale Endstände der Brustdrüse vorgenommen werden. (16)(67)(100)(101)(129) Ob diese physiologischen Stammzellen durch die maligne Entartung als möglichen Anfangszellen eines Tumors anzusehen sind oder in wieweit Parallelen zwischen den beiden Modellen der Tumorstammzellen und den physiologischen Stammzellen gezogen werden können, ist jedoch Bestandteil noch einer sehr intensiven Forschung und bedarf sehr weitgehender experimenteller Ansätze. Trotzdem gibt es jedoch schon weitreichende Hinweise dafür, dass die so genannten basalen

Karzinome auf Grund ihrer Übereinstimmung mit der Zytokeratin-Expression, als auch einer Vielzahl anderer immunhistochemischer Marker, welche die Zelldifferenzierung als auch den Zellzyklus betreffen, in Verbindung gebracht werden können. (18)(26)(63)(92)(103)

Besondere Aufmerksamkeit erfuhr die Gruppe der basalen Mammakarzinome durch die Arbeit von Perou et al. im Jahre 2000 mit der Diskreption eines intrinsischen Gensets, welches gerade die basalen Karzinome als Mammakarzinome mit schlechter Prognose ansieht. (63)(80)(105) Die letztendliche prognostische Relevanz dieser Tumoren, welche sich abgrenzen von der so genannten luminalen A und B Gruppe mit Expression von Östrogenrezeptoren, der normal-like Mammakarzinome mit Negativität für den Östrogenrezeptor sowie der Gruppe der erbB-2 positiven Mammakarzinome, ist jedoch noch umstritten. (19)(23)(33)(72)(104) Auffallend bei dieser Unterteilung ist jedoch, dass die Mammakarzinome vormerklich nach basalen und nichtbasalen getrennt wurden und hierbei der Gradingeffekt teilweise nicht ausreichend gewürdigt wurde. (63) Es ist bekannt, dass G3 Tumoren häufig den basalen Phänotyp aufweisen und niedrigmaligne Tumoren den nicht basalen, teils luminalen oder normal-like Mammakarzinomen zugerechnet werden.

Grade das Grading zählt zu den weltweit anerkannten Prognosefaktoren beschrieben von Elston et al. und Fitzgibbons. (34)(35)(88) Darüber hinaus sind die Prognosefaktoren, zu denen auch der Lymphknotenstatus, der Hormonrezeptorstatus, das TNM-System und die histologische Differenzierung zählen, in zahlreichen unabhängigen Studien bestätigt worden. (17)(32)(54)(75)(77)(113)(130) Die Definition des basalen Mammakarzinoms durch immunhistochemische Marker ist nach wie vor nicht geklärt. So zeigen manche Arbeitsgruppen eine gehäufte Expression von p63 und CK5 Positivität in untersuchten basalen Mammakarzinom-Zelllinien. (72)(92) Speziell das p63 Gen, welches zu den Tumorsuppressor-Genen zählt, ist assoziiert mit einer steigenden Invasionsbereitschaft und zunehmender Metastasierungstendenz von Karzinomen. Weiterhin zeigen sich basale Karzinome durch eine sehr hohe Proliferationsaktivität aus, wie sie zum Beispiel mit einem Antikörper gegen Ki-67 /Mib-1 gemessen werden kann. (38)(106) Dennoch ist dieser Marker nicht als basaler Marker zu betrachten und eignet sich vorwiegend zur Einordnung des Malignitätsgrades und einem, wenn auch beschränkten, prognostischen Wert. (35)(38)(85) Die Expression von Mib-1 ist mit der

Expression von p53, EGFR und Vimentin, wie 2005 durch Kosching et al. gezeigt, assoziiert. (61) Darüber hinaus zeigen Mammakarzinome eine Assoziation mit P-Cadherin, C-Kit und eine Vielzahl anderer Marker. (1)(23)(61)(85)(86)(94)(100)(116)

Basierend auf diesen widersprüchlichen Ergebnissen beruht diese Arbeit auf der immunhistochemischen Analyse von 217 Mammakarzinom-Gewebsproben von Brustkrebs-Patientinnen, bei denen ein invasives Mammakarzinom in den Jahren 1988-1992 an der Universitäts-Frauenklinik Münster diagnostiziert wurde. Wie im Ergebnissteil der Arbeit eingehend erläutert, konnten die untersuchten, weltweit anerkannten Prognosefaktoren, welche von Fitzgibbons als prognostisch hochrelevant beschrieben wurden, auch in dieser Gruppe als valide und hochsignifikant eingestuft werden. (15)(34)(44)(62)(81)(97) Hierzu zählten speziell die bekannten Prognoseparameter wie das Grading, der Lymphknotenstatus und der Hormonrezeptorstatus. Am aussagekräftigsten war hierbei der Lymphknotenstatus, welcher in nahezu allen Therapiestudien für das weitere Therapievorgehen von zentraler Bedeutung ist. Dies wurde noch einmal auf dem neunten St. Galler Expertenkonsensus 2005 betont. (33)(54)(113)(130) Letztendlich zeigten die Einzelanalysen für die untersuchten Faktoren keine signifikanten Ergebnisse, wenn der Hormonrezeptorstatus und das Grading in die multivariate Analyse eingeschleust wurden. Dementsprechend ist zu betonen, dass signifikante Ergebnisse nur dann erreicht werden können, wenn eine stadiengerechte Auswertung, entsprechend der Studien, unter Berücksichtigung des Grading erfolgt. (34)

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit auf, dass in der multivariaten Analyse dementsprechend keine unabhängige Signifikanz der basalen Marker gefunden werden konnte. Dies bestätigen die Angaben aus der Literatur. (26)(63)(104)(118) Auch herrscht eine gewisse Unordnung in den vormals von Sørli et al. definierten Subgruppen der Mammakarzinome, so dass Bertucci et al. 2006 aufzeigen konnten, dass das medulläre, basale Karzinom konträren prognostischen Aussagen zuzuordnen ist. So zeigte sich das medulläre Mammakarzinom bei der Untersuchung mit einer deutlich besseren Prognose gegenüber den anderen basalen Karzinomen seiner Gruppe. (13) Auch Jaquemier et al. beschrieben ein paradoxes Verhalten der basalen Karzinome im Bezug auf die erwarteten prognostischen Daten. (55)

Laakso et al. zeigten auf, dass das tumorfreie Überleben bei baso-luminalen Karzinomen im Verhältnis zu luminalen Karzinomen signifikant besser war. Ebenso konnten Mi-Jung et al. belegen, dass nicht das basale Karzinom mit der schlechtesten Prognose assoziiert war, sondern die Her2/ neu-überexprimierten Karzinome. (59)(63)

Obwohl die Notwendigkeit der Einführung neuer prognostischer Marker nach wie vor zu einem interessantem Forschungsfeld gehören, zeigen die hier untersuchten Marker wie p63, EGFR und BRCP-1 jedoch kein Potenzial, beim derzeitigen Wissenstand als prognostische Faktoren in die Routinediagnostik eingeführt werden zu können. (17)(34)(37)(61)(86)(106) Zukünftig wäre es sicherlich von nutzen, weiter valide Faktoren zu ermitteln, um ein invasives Mammakarzinom besser klassifizierten und damit typengerecht besser behandeln zu können. Ob hierbei die pathomorphologische Mammakarzinom-Diagnostik von immunhistochemischen Analysen und möglichen Gen-Expressions-Muster-Analysen mittels der Gen-Chip-Analyse abgelöst wird, bleibt abzuwarten. Die gewonnenen Ergebnisse auf dem Gebiet der Tumorpathologie würden jedoch möglicherweise zur Einführung neuer Therapieregime führen.

Es bleibt jedoch zu betonen, dass die untersuchten Marker mit ihren entsprechenden Ergebnissen nur bedingt einen Rückschluss erlauben auf die Frage, ob es sich bei diesen basalen Mammakarzinomen um wirkliche Stammzellkarzinome handelt.

Eine alternative Theorie, die so genannte Tumorstammzell-Hypothese deutet in Zukunft auf mögliche neue Therapieansätze hin. Basierend auf den Arbeiten von Al Hajj et al. aus dem Jahre 2003, welche eine Zellpopulation mit CD44 Expression sowie einer niedrigen Expression von CD24 mit einer sehr hohen Tumorbildungsrate assoziieren konnten, besteht der Hinweis auf eine Hierarchie von Brustkrebszellen, in denen nur einige wenige Zellen tatsächlich eine hohe Proliferationsfähigkeit / Aktivität und entsprechende Fähigkeit zur Tumorneubildung aufweisen. (1)(4)(17)(29)(67)(122)(125)

Diese Theorie ist in sofern interessant, da sie zahlreiche Phänomene in der Behandlung des invasiven Mammakarzinoms erklären könnte, speziell den teilweise sehr langen Verlauf mit dem Auftreten von Metastasen nach mehreren Jahren bis Jahrzehnten.

So zeigt der Befund einer sehr hohen Rate von nachgewiesener Mikrometastasierung im Knochenmark bei Mammakarzinom-Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose keine Korrelation mit einer erhöhten Metastasenbildung in dem nachfolgenden Beobachtungszeitraum. War man früher von so genannten dormant / schlafenden Tumorzellen ausgegangen, so gibt es heute Hinweise dafür, dass diese Zellen möglicherweise tatsächlich auf der Präsenz von so genannten Tumorstammzellen beruhen. (16)(23)(61)(67)(100)(101)

Nur bei Präsenz dieser Zellpopulation würde sich dann ein neuer, metastatischer Tumor bilden. Diese Überlegungen haben sich allerdings nicht nur auf das invasive Mammakarzinom beschränkt, sondern zeigen sich vor allem in der Tumorgenese des hämatopoetischen Systems. Es liegen bislang keine Untersuchungen vor, die das eigentliche histogenetische Mammakarzinom-Modell mit dem so genannten Tumorstammzell-Modell tatsächlich korreliert hätten. Weitere Studien haben letztendlich zu zeigen, inwieweit es sich um ergänzende oder konkurrierende Modelle mit entsprechenden klinischen Konsequenzen handelt.

6. Anhang: Ergebnisse

1. Ergebnisberechnung für die Mib-1 Expression gegliedert nach der Grading- Unterteilung. Siehe hierzu auch Abbildung 15 a-c:

Mib-1=1 /Grading: G1 = n (10) Mean Survival Time: 160 Mo.
p= 0,0082 Standardfehler 17, 95% Konfidenzintervall (127;192)
G2 = n (44) Mean Survival Time: 136 Mo
Standardfehler 10; 95% Konfidenzintervall (117;156)
G3 = n (19) Mean Survival Time: 84 Monate
Standardfehler 16; 95% Konfidenzintervall (52;116)

Mib-1=2 /Grading: G1 = n (3) Mean Survival Time: 152 Monate
p= 0,7355 Standardfehler 27; 95% Konfidentintervall (98;205)
G2 = n (19) Mean Survival Time: 126 Monate
Standardfehler 17; 95% Konfidenzintervall (94;159)
G3 = n (17) Mean Survival Time: 114 Monate
Standardfehler 19; 95% Konfidenzintervall (77;151)

Mib-1/Grading 3: G2 = n (16) Mean Survival Time 103 Monate
p= 0,3404 Standardfehler 19, 95% Konfidenzintervall (65;141)
G3 = n (9) Mean Survival Time 76 Monate
Standardfehler 26, 95% Konfidenzintervall (24;128)

2. Ergebnisberechnung für das CK5/6 Vorkommen gegliedert nach der unterschiedlichen Grading-Unterteilung. Siehe hierzu auch Abbildung 16 a/b:

CK 5/6 negativ /Grading: G1 = n (13) Mean Survival Time: 162 Mo.

p= 0,0064

Standardfehler 13, 95% Konfidenzintervall (137;188)

G2 = n (85) Mean Survival Time: 133 Mo

Standardfehler 8; 95% Konfidenzintervall (117;148)

G3 = n (38) Mean Survival Time: 91 Monate

Standardfehler 12; 95% Konfidenzintervall (67;115)

CK 5/6 positiv /Grading: G1 = n (0)

p= 0,1107

G2 = n (6) Mean Survival Time: 168 Monate

Standardfehler 20; 95% Konfidenzintervall (130;207)

G3 = n (7) Mean Survival Time: 85 Monate

Standardfehler 23; 95% Konfidenzintervall (39;131)

3. Ergebnisberechnung für die Vimentin Expression gegliedert nach der unterschiedlichen Grading-Unterteilung. Siehe hierzu auch Abbildung 17 a/b:

Vimentin negativ /Grading: G1 = n (14) Mean Survival Time: 171 Mo.

p= 0,0039

Standardfehler 11, 95% Konfidenzintervall (149;193)

G2 = n (82) Mean Survival Time: 135 Mo

Standardfehler 8; 95% Konfidenzintervall (120;150)

G3 = n (34) Mean Survival Time: 95 Monate

Standardfehler 13; 95% Konfidenzintervall (70;120)

Vimentin positiv /Grading: G1 = n (0)

p= 0,4342

G2 = n (11) Mean Survival Time: 120 Monate

Standardfehler 23; 95% Konfidenzintervall (74;166)

G3 = n (9) Mean Survival Time: 77 Monate

Standardfehler 27; 95% Konfidenzintervall (25;130)

4. Ergebnisberechnung für die p63 Vorkommen gegliedert nach der unterschiedlichen Grading-Unterteilung. Siehe hierzu auch Abbildung 18 a/b:

p63 negativ /Grading:

p= 0,0015

G1 = n (15) Mean Survival Time: 172 Mo.

Standardfehler 11, 95% Konfidenzintervall (151;193)

G2 = n (91) Mean Survival Time: 137 Mo

Standardfehler 7; 95% Konfidenzintervall (123;152)

G3 = n (35) Mean Survival Time: 93 Monate

Standardfehler 13; 95% Konfidenzintervall (67;119)

p63 positiv /Grading:

p= 0,8828

G1 = n (0)

G2 = n (4) Mean Survival Time: 78 Monate

Standardfehler 37; 95% Konfidenzintervall (5;150)

G3 = n (3) Mean Survival Time: 66 Monate

Standardfehler 34; 95% Konfidenzintervall (0;132)

7. Literaturverzeichnis

1. Al-Hajj M; Wicha M; Benito-Hernandez A; et al.; Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells; PNAS, Vol.100, No.7, 3983-3988, 2003
2. Allred D, O'Connell P; et al.; Biomarkers in early breast neoplasia. J Cell Biochem; Suppl. ;17G, 1993
3. Allred D; Harvey J; et al.; Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis; Mod Pathol; 11: 155-168, 1998
4. Alvi A; Clayton H; Joshi C; Enver T.; et al.; Funktional and molecular characterisation of mammary side population cells; Breast Cancer Res., 5:R1-R8, 2003
5. Amador M, Oppenheimer D, Perea S; et al.; An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors; Cancer Res 64(24):9139-9143, 2004
6. American Joint Committee on Cancer (AJCC), Cancer Staging Manual, 6. Auflage, Philadelphia, PA:Lippincott-Raven, 2002
7. Banerjee S; Reis-Filho J; et al.; Basal like breast carcinomas:clinical outcome and response to chemotherapy; J Clin Pathol; 59: 729-35, 2006
8. Barbieri C; Tang L; Brown K; et al.; Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis; Cancer Res; 66:7589-97; 08/2006
9. Becker N, Wahrendorf J; Atlas of cancer mortality in Germany. Heidelberg, Germany: Springer; 1998.

10. Beckmann MW, Niederacher D; et al.; Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity; *J. Mol. Med.* 75(6):429-439, 1997
11. Bergamaschi A; Kim Y; Sorlie T; et al.; Distinct pattern of DNA copy number alteration are associated with different clinopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer; *Genes Chromosomes and Cancer*; 45: 1033-40, 2006
12. Berry D, Muss H, Thor A, et al.; HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer; *J Clin. Oncol.*;18(20):3471-3479, 2000
13. Bertucci F; Finetti P; et al.; Gene Expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancer; *Cancer Res*; 66; 4636-44, 2006
14. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, et al.; Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines; *Mod. Pathol* 16(2):173-182, 2003
15. Bloom H; Richardson W; Histological differentiation in breast cancer, *Aust N Z J Surg*, No.54, 10-403, 1957
16. Böcker W; Moll R; Poremba C; et al; Common Adult Stem cell in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: A new cell biological concept; *Lab. Invest.* 82: 737-46, 2002
17. Böcker; Denk; Heitz; *Pathologie*, 2. überarbeitete Auflage, Urban &Fischer Verlag, 175-181, 2001
18. Boecker W, Buerger H, Schmitz K; et al.; Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns; *J Pathol*;195:415-421, 2001

19. Brenton J; Carey L; Ahmed A; et al.; Molecular Classification and molekular Forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*; 23:7350- 7360, 2005
20. Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H; et al.; Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and EGFR-expression; *Cancer Res.*;60:854-857, 2000
21. Buerger H, Packeisen J, Boecker A, et al.; Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J Pathol*, 203(1):545-550, 2004
22. Camp R; Charette L; Rimm D; Validation of Tissue Microarray Technology in breast carcinoma, *Lab Invest*, 80:1943-1949, 2000
23. Charafe-Jauffret E; Ginestier C; Monville F; et al.; Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers, *Oncogene*, 1-12, 2005
24. Chepko G; Smith G; Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal; *Tissue Cell*; 29: 239-53, 1997
25. Clarke M; Fuller M; Stem cells and cancer: Two faces of eve, *Cell*; 124, 1111-1115, 03/2006
26. Collett K; Stefansson I; Eide J; et al.; A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors; *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*; 14: 1108-12, 2005

27. DAKO REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse Code K5005, 3.Auflage
28. De Laurentiis M; Canello G; et al.; Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology, *Ann Oncol*; 16 Supp 4:7-13, 2005
29. Dick J; Bonnet J; Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell; *Nature Medicine*; Vol3, No.7, S.730-737, 1997
30. Dick J; Breast cancer stem cells revealed; *PNAS*, Vol.100,No.7, 3547-3549, 04/2003
31. Dupont W und Page D; Risk factors for breastcancer in women with proliferative breast disease, *JNatl.Cancer Inst*, 312:146-151,1981
32. El-Rehim D; Ball G; Pinder S; et al.; High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses; *Int. J. Cancer*:116, 340-350, 2005
33. El-Rehim D; Pinder S; Paish C; et al.; Expression of luminal and Basal cytokeratins in human breast carcinoma, *Journal of Pathology*, 203: 661-671, 2004
34. Elston C; Ellis I; Pathological prognostic factor in breast cancer.I. The Value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up, *Histopathology* 1991;19:403-410; *Histopathology*; 41:151-153, 2002

35. Fitzgibbons P; Page D; Weaver D; et al.; Prognostic Factors in breast cancer; Arch Pathol Lab Med; 124: 966-978, 2000
36. Fulford L; Easton D; Reis Filho J; et al.; Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast; Histopathology, 49, 22-34, 2006
37. Gelsi-Boyer V; Orsetti B; Cervera N; et al.; Comprehensive Profiling of 8p11-12 Amplification in breast cancer, Mol. Cancer. Res; 3:655-667, 2005
38. Gerdes J; Lembke H; Baisch H; et al.; Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human antigen defined by monoclonal antibody Ki-67; J Immunol; 133:1710-1715; 1984
39. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, Krebs in Deutschland, 5. überarbeitete aktualisierte Auflage, 53-55, 2006
40. Giersiepen K.; Haartje U.; Hentschel S.; et al.; Brustkrebsregistrierung in Deutschland: Tumorstadienverteilung in der Zielgruppe für das Mammographiescreening, Deutsches Ärzteblatt 101, Ausgabe 30, 07/2004
41. Giltane J; Rimm D; Technology Insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology; Nature Clinical Practice Oncology, 1: 104-11; 2004
42. Goeke K; Balzen U; Gynäkologie und Geburtshilfe, 1. Auflage, Urban&Fischer Verlag, 19-34, 2005
43. Goldhirsch A; Wood W; Gelber R; et al.; Meeting Highlights: Updated International Expert Consensus on the Primary Therapy of early Breast Cancer; Journal of Clinical Oncology, Vol.21, Issue 17, S.3357-3365, 2003

44. Goldhirsch A; Glick J; Gelber R; et al.; Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005; *Annals of Oncology*; 16: 1569-1583, 09/2005
45. Gray J, Collins C, Henderson I, et al.; Molecular cytogenetics of human breast cancer; *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* ;59:645-652, 1994
46. Haag P; Hanhart N; Müller M; *Gynäkologie und Urologie*, 2.Auflage, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2005/2006
47. Hansen L; Woodson R; Holbus S; et al.; The epidermal Growth Factor Receptor is required to maintain the proliferative population in the basal compartment of epidermal Tumors, *Cancer Research* 60, 3328-3332; 2000
48. Hardy PA; Zacharias H; Reappraisal of the Hansemann-Boveri hypothesis on the origin of tumors, *Cell Biol Int*; 29(12): 983-992, 12/2005
49. Hendrix M; Seftor E; et al.; Role of intermediate Filaments in Migration, Invasion and Metastasis, *Cancer and Metastasis Review* 15: 507-525, 1996
50. Henson D; Fielding L; Grignon D; et al.; College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors: Summary Members of the committee; *Arch Pathol Lab Med*; 119: 1109-12, 1995
51. Hill R; Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven; *Cancer Res.*,66, 1891-1896, 02/2006
52. Hinkeldey K; Kriegsmann J; Otto M; *Standards der morphologischen Mammadiagnostik*, 2002

53. Holzgreve W; Jonat W; Schneider K; Weiss J; Gynäkologie und Geburtshilfe, 1.Auflage, Springer Verlag, 628-665, 2000
54. Jacquemier J; Ginester C; Rougemont J; et al.; Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis, *Cancer Res*;65: 767-779, 2005
55. Jacquemier J; Padovani L; et al.; Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype, *J Pathol* 207: 260-68, 2005
56. Jensen H; Rice J; Wellings S; Preneoplastic lesions in the human breast, *Science*, 191:295-297, 1976
57. Jones C; Ford E; Gillett C; et al.; Molekulare cytogenetic identification of subgroups of grade 3 invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcome; *Clin Cancer Res*; 10: 5988-97, 2004
58. Kaplan E; Meier P; Non parametric estimation from incomplete observations; *J Am Stat Assoc*; 53: 457-481, 1958
59. Kim M; Ro J; Ahn S; Kim H; et al, Clinicopathologic significance of the basal like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes; *Human Pathology*; 37, 1217-26, 2006
60. Kononen J; Bubendorf L; et al.; Tissue Microarray for high-throughput molecular profiling of tumor specimens, *Nature Medicine*, Vol.4 No.7, 844-847, 1998
61. Kosching E; Packeisen J; et al.; The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential?; *J. Pathol*, 206(4): 451-457, 2005

62. Kreienbaum R; Kopp I; Lorenz W; et al.; Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften; Deutsche Krebsgesellschaft e.V.; Stand 07/2004

63. Laakso M; Tanner M; Nilsson J; et al., Basolumental Carcinoma: A new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast carcinoma; Clin Cancer; 12(14) 7/2006

64. Lacroix M; Leclercq G; Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update; Breast cancer Res and Treatment; 83: 249-289; 2004

65. Landberg G; Östlund H; Nielsen N; et al.; Downregulation of the Potential suppressor gene IGFBP-rP1 in human breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein, cyclin E overexpression and increased proliferation in estrogen receptor negative tumors, Oncogene, 20, 3497-3505, 2001

66. Li N und H; Cherukuri P; Farzan S; et al.; TA-p63-gamma regulates expression of deltaN-p63 in a manner that is sensitive to p53; Oncogene, 13;25:2349-59, 04/2006

67. Li Y; Welm B; Podsypanina K; Huang; et al.; Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells; PNAS, Vol.100, No.26, 15853-15858, 12/2003

68. Löffler G; Petrides P; Biochemie und Pathobiochemie, 6. überarbeitete Auflage, Springer Verlag, S.194-211, 1090-1113, 1998

69. Makretsov N; Huntsman D; et al.; Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma; Clin Cancer Res; 10: 6143-51, 2004

70. Malzahn K; Mitze M; et al.; Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas; Virchows Arch; 433: 119-129, 1998
71. Marrelli D; Pinto E; Neri A; Megha T; et al.; Mib-1 proliferation index an independent predictor of lymph node metastasis in invasive breast cancer: A prospective study on 675 patients; Oncology Reports; 15:425-429; 2006
72. Matos I; Dufloth R; Alvarenga M; et al.; P63, cytokeratin5 and P-cadherine: three molekular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas; Virchows Arch, 447 :688-694, 2005
73. Morrow M: Limiting breast surgery to the proper minimum, Breast; 14:7-8, 2005
74. Nielson T; Hsu F; Jensen K; et al.; Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma; Clin Cancer Res; 10: 5367-74, 08/2004
75. Oshima R; Baribault H; Caulin C; Oncogenic regulation and function of keratin 8 and 18, Cancer and Metastasis Review 15: 445-471, 1996
76. Owens D; Watt F; Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours; Nature, Vol.2, 444-450, 06/2003
77. Page D und Jensen R; Ductal carcinoma in situ of the breast: understanding the misunderstood stepchild; JAMA, 275 :948-949, 1996
78. Parkin D; Bray F; et al.; Global cancer statistics, CA Cancer J Clin, 55:74-108, 2002, 2005

79. Perez-Losada J; Balmain A; Stem cell hierarchy in skin cancer; *Nature*, Vol.3, 434-443, 06/2003

80. Perou C; Srlie T; Eisen M; et al.; Molecular portraits of human breast tumours; *Nature* 406: 747-52, 2000

81. Perry N; Broeders M; de Wolf C; et al.; European Guidelines for Quality Assurance in Breast cancer Screening and diagnosis, 4.Edition, European Communities, 1-332, 2006

82. Pfreudschuh M; Schlmerich J; Pathophysiologie, Pathobiochemie; 2.Auflage, Urban &Fischer Verlag, 49-59, 2004

83. Pharoah P, Antoniou A; et al.; Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention; *Nat. Genet* 31(1):33-36, 2002

84. Pimanda J; Silberstein L; Dominici M; et al., Transcriptional link between blood and bone: The stem cell leukemia gene and its +19 stem cell enhancer are active in bone cells; *Molecular and cellular Biology*, 2615-25, 2006

85. Prechtel K; Aktueller Stand der Diagnostik des Mammakarzinoms in der Praxis, *Der Pathologe*, 22:281-284, 04/2001

86. Putti A; El-Rehim D; Rakha E; et al.; Estrogen receptor-negative breast carcinomas: A review of morphology and immunophenotypical analysis, *Modern Pathology*, 18:26-35, 2005

87. Rakha E; Putti T; El-Rehim D; et al.; Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation; *J Pathol* 208: 495-506, 2006

88. Rampaul R; et al.; Prognostic and predictive factors in primary breast cancer and their role in patient management: The Nottingham Breast Team, *European Journal of Surgical Oncology*, 27: 229-238, 2001
89. Reis- Filho J; Milanezi F; Steele D; et al., Metaplastic breast carcinomas are basal like tumours, *Histopathology*, 49: 10-21, 2006
90. Remmele W, Dietz M; et al.; Relation of elastosis to biochemical and immunohistochemical steroid receptor findings, Ki-67 and epidermal growth factor receptor (EGFR) immunostaining in invasive ductal breast cancer; *Virchows Arch. A. Pathol Anat. Histopathol*; 422(4):319-326, 1993
91. Reya T; Morrison S; et al.; Stem cells, cancer, and cancer stem cells; *Nature*, Vol.414, 105-111, 2001
92. Ribeiro- Silva A; Ramalho L; Garcia S; et al.; P63 correlates with both BRCP1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer; *Histopathology*, 47, 458-66, 2005
93. Riede U; Schäfer H; *Allgemeine Pathologie und Spezielle Pathologie*, 4.aktualisierte Auflage, Thieme Verlag, 954-961, 1995
94. Ross J; Fletcher J; Linette G; et al.; The Her-2/Neu gen and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy; *Oncologist*, 8: 307-325, 2003
95. Rouzier R; Perou C; Symmans W; et al., Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative Chemotherapy, *Clin Cancer Res*; 11: 5678-85, 2005

96. Rummukainen J; Salminen T; et al.; Amplification of c-myc Oncogene by chromogenic and fluorescence in situ hybridization in archival breast cancer tissue array samples, *Lab Invest*, Vol.81, No.11, 1545-1551, 2001
97. Sauer H; *Manual Mammakarzinom*; Tumorzentrum München, Zuckschwerdt Verlag, 2003
98. Schmidt- Matthiesen H; Wallwiener D; *Gynäkologie und Geburtshilfe*; 10te überarbeitete Auflage, Schattauer Verlag, 416-435, 2005
99. Schraml P; Kononen J; et al.; Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types; *Clin Cancer Res*; 5: 1966-75, 1999
100. Shackleton M; Vaillant F; et al.; Germination of a functional mammary gland from a single stem cell ; *Nature*, Vol.; 439/5, 84-88, 01/2006
101. Smalley M; Ashworth A; Stem cell and breast cancer: a field in transit, *Nature Cancer Review* Vol.3, 832-844, 11/2003
102. Sommers C; Byers S; Thompson E; et al.; Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines; *Breast Cancer Res Treat*; 31: 325-335, 1994
103. Sommers C; Heckford S; Skerker J; et al.; Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastin- resistant human breast cancer cell lines, *Cancer Research* 52, 5190-5197, 1992
104. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J; et al.; Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,100 (14): 8418-8423, 2003

105. Srlie T; Perou C; Tibshirani R; et al.; Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications; PNAS; 98: 10869-74, 2001
106. Stein H; Gerdes J; Kirchner H; Diehl V; et al.; Immunohistological analysis of Hodgkin's and Sternberg-Reed cells: Detection of a new antigen and evidence for selective IgG uptake in the absence of B-cell, T-cell and histiocytic markers; J Cancer Res Clin Oncol; 101:125-134, 1981
107. Stemmermann G; The pathology of breast cancer in Japanese women compared to other ethnic groups: a review; Breast Cancer Res Treat; 18 Suppl 1, 1991
108. Stryer J; L; Tymoczko J; Biochemie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S.111-113, 453-457, 1995
109. Tanner M; Kapanen A; et al.; Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer, Mol Cancer Ther; 3(12): 1585-1592, 12/04
110. Taylor-Papadimitrou J; Lane E; Keratin expression in mammary gland. In: Neville M, Daniel C, editors; The mammary gland; Plenum Publishing Corporation; 181-215, 1987
111. Thompson E; Paik S; Brunner N; et al.; Association of increased basement membrane invasiveness with the absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer lines; J Cell Physiol. 150: 534-544, 1992
112. Tidow N, Boecker A, Schmidt H; et al.; Distinct Amplification of an Untranslated Regulatory Sequence in the egfr Gene Contributes to Early Steps in Breast Cancer Development; Cancer Res; 63(6):1172-1178, 2003

113. Tong D; Schneeberger C; et al.; Messenger RNA determination of estrogen receptor, progesteron receptor, pS2 and plasminogen activator inhibitor-1 by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction in human breast cancer, *Clin Cancer Res*; 5: 1497-1502, 1999
114. Tonin P; Genes implicated in hereditary breast cancer Syndroms, *Semin Surg Oncol*, 18:281-286, 2002
115. Troester M; Hoadley K; Sorlie T; et al.; Cell type specific responses to chemotherapeutics in breast cancer; *Cancer Research*, 64: 4218-4226, 06/2004
116. Turner N; Reis-Filho J; Basal like breast cancer and the BRCA1 phenotype, *Oncogene*; 25: 5846-5853, 2006
117. Turner N; Reis-Filho J; Russell A; et al BRCA 1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer *Oncogene*; 1-7, 2006
118. Van de Rijn M; Perou C; et al.; Expression of cytokeratin 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome; *Am J Pathol*, 161:1991-96, 2002
119. Veronesi U, Cascinelli N; et al.; Prognosis of breast cancer patients after mastectomy and dissection of internal mammary nodes; *Ann. Surg*; 202(6):702-707, 1985
120. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al.; Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series; *J Natl. Cancer Inst.*; 91(4):368-373, 1999
121. Villadsen Rene; In search of a stem cell hierarchy in the human breast and its relevance to breast cancer evolution; *AMPIS* 113: 903-21, 2005

122. Welm B; Tepera S; Venezia T; et al.; Sca-1pos cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population; *Developmental Biology*, 245, 42-56, 2002
123. Weinberg R. Et al.; The hallmark of cancer; *Cell*; 100(1): 57-70, 2000
124. Wetzels R, Kuijpers H, Lane E, et al.; Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer; *Am. J. Pathol*; 138(3):751-763, 1991
125. World Health Organisation; *Classification of Tumours; Pathology and Genetics of Tumours of the breast and female genital organs*, Tavassoli F; DevileeP, eds. Lyon: IARC Press; 9-112, 2003
126. Wicha M; Liu S; Dontu G; Cancer stem cells : an old idea - a paradigm shift; *Cancer Res*; 66, 1883-1890, 02/2006
127. Wu A, Ziegler R, Horn R, et al.; Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans; *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*; 5:901-906, 1996
128. Wu A, Ziegler R, Nomura A, et al.; Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans; *Am J Clin. Nutr*; 68(6 Suppl):1437S-1443S, 1998
129. Yu K; Lee C; Tan P; Tan P; Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations; *Clin Cancer Res* 10: 5508-17, 2004
130. Zafrani B; Aubriot M; Mouret E; et al., High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases; *Histopathology*; 37: 536-45, 2000

131. Ziegler A; Artikel 15 der Statistik Serie; Deutsche Medizinische Wochenschrift; 127: T14-T16, 2002
132. Ziegler A; Artikel 17 der Statistik Serie; Deutsche Medizinische Wochenschrift; 129: T4-T6. 2004

8. Auflistung der verwendeten Tabellen

- Tabelle 1: Etablierte Risikofaktoren
- Tabelle 2: Gradingkriterien
- Tabelle 3: pTMN-Klassifikation
- Tabelle 4: Intermediärfilamente
- Tabelle 5: Reagenzienliste und optimale Inkubationszeiten
- Tabelle 6: Primäre Antikörper
- Tabelle 7: Häufigkeitsverteilung der allgemeinen statistischen Auswertung
- Tabelle 8: Deskriptive Statistik des tumorfreien Überlebens und
des Gesamtüberlebenszeitraumes
- Tabelle 9: Übersicht der Häufigkeitsverteilungen der Färbegergebnisse

8. Auflistung der verwendeten Abbildungen

- Abbildung 1: Normale Stamm-Zell Entwicklung
- Abbildung 2: Mögliche zukünftige Therapieansätze
- Abbildung 3: Ablaufschritte der TMA Erstellung
- Abbildung 4: Tissue-Array-Präzisions-Instrument
- Abbildung 5: Fertiggestellter TMA-Block
- Abbildung 6: Paraffinschnitt des angefertigten TMA-Blocks
- Abbildung 7 a-l: Repräsentative Abbildungen der unterschiedlichen immunhistochemischen Anfärbungen in 10- bis 20-facher Vergrößerung
- Abbildung 8: Gesamtüberleben bis zum Eintritt des tumorbedingten Versterbens
- Abbildung 9: Tumorfrees Überleben bis zum Eintritt von Metastasen, Rezidiv oder tumorbedingtem Versterben
- Abbildung 10: Verteilung der Therapieregime
- Abbildung 11: Statistische Auswertung der Grading-Unterteilung
- Abbildung 12: Statistische Auswertung bezogen auf das vorhandene T-Stadium bei Erstdiagnose
- Abbildung 13: Statistische Auswertung bezogen auf das vorhandene Nodalstadium bei Erstdiagnose
- Abbildung 14: Statistische Auswertung des Hormonrezeptorstatus
- Abbildung 15 a-c: Statistische Auswertung des Mib-1 Vorkommens differenziert nach der Grading-Unterteilung
- Abbildung 16 a/b: Statistische Auswertung des Mib-1 Vorkommens, differenziert nach der unterschiedlichen Grading-Unterteilung
- Abbildung 17 a/b: Statistische Auswertung der CK 5/6 Differenzierung, geschichtet nach der unterschiedlichen Grading-Unterteilung
- Abbildung 18 a/b: Statistische Auswertung des p63 Vorkommens, differenziert nach der unterschiedlichen Grading-Unterteilung

10. Auflistung der verwendeten Abkürzungen

ASR	Age Standardised Rate
DCIS	Duktales Karzinoma In Situ
CLIS	Karzinoma Lobulare In Situ
TDLE	Terminal-Dukto-Lobuläre-Einheit
TMA	Tissue-Micro-Array
NPI	Nottingham-Prognose-Index
EMT	Epithelial-Mesenchymal-Transition
EGFR	Epithelial-Growth-Faktor-Rezeptor
ER	Östrogenrezeptor
PR	Progesteronrezeptor
TIC	Tumor-Initiating-Cells
LK	Lymphknoten
SNL	Sentinel-Lymphknoten

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinen beiden Betreuern, Herrn Prof. Dr. med. Horst Bürger und Frau PD Dr. med. Pia Wülfing, für die Überlassung des Dissertations-Themas sowie für die exzellente Betreuung im Verlauf meiner Dissertation.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Werner Böcker bedanken, dass ich meine Dissertation am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie durchführen durfte, sowie für die Bereitstellung und Nutzung der Materialien des Institutes.

Im Weiteren danke ich dem MTA-Team um Frau Inka Buchroth des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie der Universität Münster für die Mithilfe bei den Anfärbungen und sachkundige Unterstützungen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. Christian Kersting und meinem Kommilitonen Hans-Jörg Gilmann, die mir mit Rat und Tat bei statistischen Problemen zur Seite standen.

Frank Weber und Nikola Adler möchte ich dafür danken, dass sie sich durch die Berge von geschriebenen Seiten durcharbeiteten immer auf der Suche nach Fehlern und grammatikalischen Unstimmigkeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie.

Meinen Eltern, Doris und Friedrich Karl, meiner Schwester Nikola und meinem Bruder Frederik, danke ich sehr für hilfreiche Anregungen, liebevolle Unterstützung und immer anwesenden Rückhalt.

Danke, dass Ihr immer hinter mir steht!

