

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

**Proteinexpressionsmuster  
in phylloiden Tumoren der weiblichen Brust**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster

vorgelegt von

Abdullah Ibrahimsadeh

aus Mahabad (Iran)

2008

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

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

I. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Ralph Lellé

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Bürger

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12. 2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Pathologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker-  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Ralph Lellé  
Koreferent: Prof. Dr. med. Horst Bürger

## **ZUSAMMENFASSUNG**

### **Proteinexpressionsmuster in phylloiden Tumoren der weiblichen Brust**

vorgelegt von Abdullah Ibrahimsadeh

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einer Serie von immunhistochemischen Untersuchungen, welche von einer gemeinsamen Forschungsgruppe im Institut für Pathologie (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Deutschland) und Department für Pathologie (Universität Utrecht, Niederlande) durchgeführt wurde. Es wurden 58 phylloide Tumoren (40 benigne, 10 borderline und 8 maligne) jeweils mit 15 Antikörpern immunhistochemisch untersucht. Es handelte sich hierbei um folgende Antikörper: c-Kit, SMA, S100, Desmin, EMA, p53, Ki-67, EGFR, p16, p21, p27, Cyklin A, Cyklin D1, Cyklin E und c-Myc.

Die Schnittpräparate wurden nach der „Tissue Microarray Technik“ (TMA) angefertigt. Die immunhistochemischen Färbungen wurden bei einigen Antikörpern nach der ABC-Methode, bei den übrigen Antikörpern nach der LSAB/AP-Methode mittels DAKO-Autostainer durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden statistisch analysiert und eine Korrelationsanalyse nach KENDALL durchgeführt.

Die Immunreaktionen auf zahlreiche Proteine (p53, c-Kit, EGFR, MIB1, Cyklin E und Cyklin A) zeigten signifikante Korrelationen mit dem Malignitätsgrad der phylloiden Tumore. Diese Ergebnisse weisen auf eine diagnostische und biologische Bedeutung der genannten Proteine hin.

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12. 200

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Definition und Geschichte	1
1.2.	Epidemiologie	1
1.3.	Ätiologie	2
1.4.	Klinische Merkmale	2
1.5.	Makroskopie	3
1.6.	Histopathologie	3
1.7.	Therapie und Prognose	4
1.8.	Immunhistochemische Befunde	4
1.9.	Molekulare Befunde	6
1.10.	Fragestellung	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1.	Material	9
2.1.1.	Erläuterung der untersuchten Antikörper bzw. Antigene	9
2.1.1.1.	c-Kit	9
2.1.1.2.	SMA	9
2.1.1.3.	S100	10
2.1.1.4.	Desmin	10
2.1.1.5.	EMA	10
2.1.1.6.	p53	11
2.1.1.7.	Ki67 (MIB1)	11
2.1.1.8.	EGFR	11
2.1.1.9.	p16	12
2.1.1.10.	p21	12
2.1.1.11.	p27	13
2.1.1.12.	Cyklin A	13
2.1.1.13.	Cyklin D	14
2.1.1.14.	Cyklin E	14
2.1.1.15.	c-Myc	14

2.1.2. Gewebeproben	15
2.1.3. Praktische Details zu den verwendeten Antikörpern	15
2.1.4. Geräte, Zubehör und Reagenzien	15
2.2. Methoden	15
2.2.1. Immunhistochemie: Definition, diagnostische und therapeutische Bedeutung	15
2.2.2. Tissue-Microarray Technik (TMA)	17
2.2.2.1. Arbeitsschritte bei der Gewebsaufbereitung mittels TMA-Methode	19
2.2.3. Vorbehandlung der Schnittpräparate	20
2.2.4. Inkubation der Primärantikörper und Durchführung der immunhistochemischen Färbung	20
2.2.4.1. ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex)	21
2.2.4.2. LSAB-Methode (Labeled-Strept-Avidin-Biotin-Methode)	24
2.2.5. Auswertung der Färbeergebnisse	27
2.2.6. Statistische Analyse	27
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1. Gesamtübersicht über die Färbeergebnisse	29
3.2. Expressionsergebnisse der einzelnen Antikörper	29
3.2.1. c-Kit	29
3.2.2. SMA	30
3.2.3. S100	30
3.2.4. Desmin	31
3.2.5. EMA	31
3.2.6. p53	32
3.2.7. MIB1	32

3.2.8.	EGFR (im Stroma)	33
3.2.9.	EGFR (im Epithel)	34
3.2.10.	p16	34
3.2.11.	p21	35
3.2.12.	p27	36
3.2.13.	Cyklin A	36
3.2.14.	Cyklin D1	37
3.2.15.	Cyklin E	37
3.2.16.	c-Myc (im Epithel)	38
3.2.17.	c-Myc (im Stroma)	39
3.3.	Korrelationen	39
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>50</b>
5.1.	Geräte	50
5.2.	Zubehör	50
5.3.	Reagenzien	51
5.3.1.	Rezepturen der verwendeten Lösungen	52
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>63</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Definition und Geschichte

Der phylloide Tumor (syn. Cystosarcoma phylloides) ist ein seltener biphasischer Tumor der Mamma, dessen Biologie und Pathogenese bis heute nur in Ansätzen verstanden ist.

Laut Definition der World Health Organization (WHO) handelt es sich bei diesem Tumor um eine teils scharf, teils unscharf umschriebene Neoplasie mit einer blätterartigen Struktur, welche analog zum Fibroadenom aus Bindegewebe und epithelialen Elementen besteht, jedoch durch eine größere Zelldichte des Bindegewebes charakterisiert ist [77].

Obwohl von dieser Tumorart zum ersten Mal im Jahre 1774 berichtet wurde, erfolgte die vollständige Beschreibung jedoch erst im Jahre 1838 durch Johannes Müller. Der Tumor wurde als Cystosarcoma phylloides (CSP) bezeichnet, um einerseits auf die blätterartige Struktur des Tumors und andererseits auf die Ähnlichkeiten mit dem bösartigen Stromasarkom hinzuweisen. Die am häufigsten verwendete Bezeichnung ist jedoch „Phylloider Tumor“, da sie die charakteristische blätterartige Struktur des Tumors in den Vordergrund stellt und verglichen mit dem Begriff Cystosarcoma phylloides ein neutraler Begriff ist, der sowohl für die benigne als auch für die maligne Form verwendbar ist.

Zur Beurteilung des Tumorverhaltens wird nach der WHO-Klassifikation von 1981 der Begriff phylloider Tumor mit den Adjektiven „benigne“, „borderline“ und „maligne“ verwendet. Die Einteilung in diese Untergruppen basiert allein auf histologischen Kriterien. Das biologische Verhalten des Tumors ist allerdings anhand histologischer Kriterien nur sehr eingeschränkt vorherzusagen.

## 1.2. Epidemiologie

Der phylloide Tumor stellt eine vergleichsweise seltene Läsion dar und bildet in westlichen Ländern nur 0,3 - 1% aller Mammatumoren bzw. 2,5% der fibroepithelialen Läsionen der Mamma [88]. Das Auftreten phylloider Tumoren wurde im Altersspektrum von 10 - 86 Jahren berichtet. Der Altersgipfel liegt bei 40 - 50 Jahren, d.h. 15 - 20 Jahre höher als der Altersgipfel des Fibroadenoms. Bei Patientinnen unter 30 Jahren kommt der phylloide Tumor sehr selten vor

[77]. Eine Studie aus den USA hat für diese Tumorart eine Inzidenz von 2,1 pro einer Million Frauen im Jahr ergeben, wobei Frauen zwischen dem 45. und dem 49. Lebensjahr am häufigsten betroffen waren. Analysen zu Unterschieden zwischen ethnischen Bevölkerungsgruppen haben gezeigt, dass die betroffenen asiatischen und lateinamerikanischen Patientinnen deutlich jünger waren als Patientinnen aus der westlichen Welt [10]. Das durchschnittliche Alter der Patientinnen in asiatischen Ländern liegt bei 25 - 30 Jahren [88].

### **1.3. Ätiologie**

Nach dem derzeitigen Wissensstand ist davon auszugehen, dass sich der phylloide Tumor aus dem intralobulären oder periduktalen Stroma entwickelt. Die Entwicklung aus einem Fibroadenom ist diskutiert worden. Die Entartung eines benignen phylloiden Tumors zu einem malignen phylloiden Tumor ist möglich und meist von einer raschen Vergrößerung des vorher bestehenden Tumors begleitet [77].

### **1.4. Klinische Merkmale**

Der phylloide Tumor kommt meistens als solitäre, unilaterale Läsion vor. Die Größe des phylloiden Tumors variiert zwischen 1 cm und bis zu mehr als 20 cm. Die durchschnittliche Größe beträgt 4 - 5 cm, wobei der maligne phylloide Tumor meist mit einem größeren Durchmesser assoziiert ist. Die meisten Patientinnen zeigen eine feste bis harte, schmerzlose Brustmasse, die gut palpabel und nicht mit der Haut verwachsen ist. Die Unterscheidung zwischen einem Fibroadenom und einem benignen bzw. malignen phylloiden Tumor ist klinisch nicht möglich. Ein Tumor mit mehr als 4 cm Durchmesser und/oder raschem Wachstum erlaubt zumindest den Verdacht auf ein malignes Geschehen.

Mammographisch stellt sich der phylloide Tumor in den meisten Fällen als runde, läppchenartige, scharf begrenzte Masse dar. Durch klinische Untersuchungen wie Mammographie oder Sonographie ist eine Dignitätsabschätzung nicht möglich.

Phylloide Tumoren zeigen eine hohe Rezidivgefahr. In bis zu 15% der Fälle wurden Metastasen im Verlauf der Erkrankung beschrieben. Hierbei scheint die hämatogene Metastasierung in Lunge, Skelett, Herz und Leber im Vordergrund zu stehen [15].

## **1.5. Makroskopie**

Der phylloide Tumor ist gut vom umgebenden Gewebe abgrenzbar, jedoch nicht von einer Kapsel umgeben. Er kann aus einer solitären Masse bestehen oder multinodulär aufgebaut sein. Der durchgeschnittene Tumor besteht aus derbem, bauschigem Bindegewebe mit einer halbbraunen, grauen oder pinkfarbenen Schnittfläche mit möglichen mukoiden Anteilen. Bei den malignen Formen können insbesondere auch Areale mit Degenerationen, Nekrosen oder Infarkten vorhanden sein. Die Tumoren schließen teilweise Zysten und Fissuren (sog. „clefts“) ein. Kleinere Läsionen zeigen eine homogenere Gestalt [77, 88].

## **1.6. Histopathologie**

Der phylloide Tumor zeigt typischerweise ein intrakanalikuläres Wachstumsmuster mit blätterartiger Projektion in die erweiterten Lumina der Duktuli. Der epitheliale Bestandteil setzt sich aus Zellen luminaler, epithelialer und myoepithelialer Differenzierung zusammen.

In benignen phylloiden Tumoren ist das Stroma zellreicher als beim Fibroadenom, die spindelförmigen Nuclei sind relativ monomorph, Mitosen selten. Die Tumorränder sind meist gut begrenzt, obwohl sehr kleine Tumorknospen in das angrenzende Bindegewebe eindringen können. Beim malignen phylloiden Tumor wächst die Tumorfront eher infiltrativ als verdrängend. Das Stroma zeigt deutliche sarkomatöse, meistens fibrosarkomatöse Entdifferenzierungen. Heterogene Differenzierungen können entstehen. Phylloide Tumoren vom Borderline-Typ (syn. niedrigmaligner phylloider Tumor) zeigen intermediäre Merkmale, das Stroma kann in diesen Formen einem niedrig-malignen Fibrosarkom ähneln. Das Grading basiert auf der semiquantitativen Einschätzung der stromalen Zelldichte, des zellulären Pleomorphismus, der mitotischen Aktivität, der Randgestalt und dem Nachweis heterologen Stromas [88]. Eine maligne epitheliale Entartung (DCIS, CLIS oder invasives Karzinom) ist selten.

Verglichen mit dem Fibroadenom sind die Hauptmerkmale des benignen phylloiden Tumors eine höhere Zelldichte des Stromas sowie die Präsenz blätterförmiger Strukturen (sog. „processes“).

## **1.7. Therapie und Prognose**

Lokale Rezidive können bei allen Varianten des phylloiden Tumors auftreten. Das Rezidiv spiegelt meist das histomorphologische Muster des primären Tumors wider. Metastasen, wenn auch selten, wurden in fast allen Organen berichtet. Rezidive entwickeln sich meist innerhalb von 2 Jahren. Die meisten tumorbedingten Todesfälle treten innerhalb von fünf Jahren nach Diagnose ein. Die Häufigkeit der lokalen Rezidive und der Metastasierung korreliert mit dem Grading des phylloiden Tumors. Die durchschnittliche Rezidivrate beträgt nach den bisher veröffentlichten Daten insgesamt 21% mit 17%, 25% und 27% für jeweils benigne, borderline und maligne phylloide Tumoren. Die Metastasierungsrate beträgt insgesamt 10% mit 0%, 4% und 22% für jeweils benigne, borderline und maligne Tumoren. Das Auftreten eines Lokalrezidivs nach dem chirurgischen Eingriff ist stark von der Breite der tumorfreien Resektionsränder abhängig [88]. Entscheidend ist beim Ersteingriff die Resektion des Tumors mit einem 10 mm breiten tumorfreien Resektionsrand [15].

## **1.8. Immunhistochemische Befunde**

Zu phylloiden Tumoren wurden bereits mehrere immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war es herauszufinden, inwieweit die Untersuchungsergebnisse Hinweise für die Diagnose und Therapie des Tumors geben und ob sich aus den Ergebnissen Aussagen zur Prognose herleiten lassen.

Eines der am intensivsten untersuchten Proteine bei phylloiden Tumoren ist p53. Verschiedene Studien belegen, dass die erhöhte Expression dieses Proteins im phylloiden Tumor mit dem Tumorgrading bzw. mit seiner Malignität korreliert [30, 39, 44, 59, 90]. Die erhöhte p53-Expression wurde bei Kim et al. (1993) als einer der signifikantesten Parameter zur Unterscheidung benigner phylloider Tumoren von malignen bezeichnet [39]. Tse et al. wiesen eine positive Korrelation zwischen der p53-Expression und der Dichte kleiner Gefäße in phylloiden Tumoren nach [91], wobei ein signifikanter Unterschied in der Mikrogefäßdichte jedoch nicht von Dacic et al. (2002) nachgewiesen werden konnte. Diese berichteten jedoch auch über die Assoziation der p53- und Ki67-Positivität mit malignen Tumoren [23]. Gegenätzlich zu mehreren Studien stellten Witte et. al 1999 keine Korrelation zwischen der p53-

Expression und der Malignität phylloider Tumoren fest [98]. Ebenfalls fanden Shpitz et al. (2002) keine statistische Bedeutung für die erhöhte Immunreaktivität für p53 in atypischen phylloiden Tumoren [86].

In einigen Studien wurde darauf hingewiesen, dass die erhöhten Expressionen von p53, Ki67 (Niezabitowski et al. 2001) sowie von EGFR (Suo et al. 2000) von prognostischer Bedeutung sind [65, 87]. In den Untersuchungen von Gatalica et al. (2001) wurde eine stromale Überexpression von p53 nur in malignen phylloiden Tumoren festgestellt, welche mit einem erhöhten Proliferationsindex (MIB1-Expression) assoziiert war [23]. Die Korrelation zwischen dem Ki67-labeling-index (MIB1-Index) und dem histologischen Grad der phylloiden Tumoren wurde ebenfalls in mehreren Studien nachgewiesen [8, 40, 41, 95], wobei der prognostische Wert des MIB1-Index von Kocova et al. (1998) als gering eingeschätzt wurde [41]. Als potentieller diagnostischer Faktor bei der Unterscheidung phylloider Tumoren in schwierigen Fällen wurde die kombinierte Expression von CD34 und bcl-2 in Fibroadenomen, phylloiden Tumoren und pseudoangiomatösen Hyperplasien, die Abwesenheit einer CD34-Expression in Spindellzellkarzinomen sowie die Abwesenheit einer Cytokeratin-Expression (Ck) im Stroma phylloider Tumoren oder von Fibroadenomen diskutiert [25, 60].

Während die Expression von CD34 mit benignen phylloiden Tumoren assoziiert ist, werden CD117 (c-Kit) und Aktin vorzugsweise in malignen Tumoren exprimiert [19]. Die c-Kit-Positivität in benignen, borderline und malignen phylloiden Tumoren weisen signifikante Unterschiede auf [16, 92]. Es wird angenommen, dass die c-Myc-Überexpression die stromale Proliferation in malignen phylloiden Tumoren antreibt und die c-Kit-Überexpression am Wachstum der Tumoren beteiligt ist [79]. Weiterhin wurde berichtet, dass die CD10-Expression eine hohe Spezifität (95%) für die Unterscheidung benigner Läsionen von borderline und malignen phylloiden Tumoren aufweist [93].

Obwohl die SMA-Positivität verschiedener benigner und maligner Brustläsionen, darunter auch phylloider Tumoren, beschrieben wurde, zeigte diese jedoch keine eindeutigen differenzialdiagnostisch nutzbaren Ergebnisse [3, 6, 61].

Die Immunreaktivität phylloider Tumoren für S-100 ist in zwei Studien komplett negativ ausgefallen, in einer anderen Studie zeigte nur ein maligner Tumor unter vier benignen und sieben malignen phylloiden Tumoren Positivität für S-

100 [4, 45]. Die untersuchten Fälle bei Aranda et. al zeigten nicht nur für S-100, sondern auch für Keratine und EMA eine einheitlich negative Reaktion [3].

Weitere Studien wiesen darauf hin, dass die stromale Proliferation in benignen phylloiden Tumoren durch Veränderungen im Wnt-pathway bedingt ist, und die Überexpression von IGF-I und IGF-II eine Rolle in der Pathogenese fibroepithelialer Neoplasmen spielen könnte [80, 81].

Kuijper et al. (2005) berichteten, dass erhöhte Expressionen von p16, p21, p53 und Cyklin-A signifikante Korrelationen zum Tumorgrad aufweisen und Korrelationen im Hinblick auf die stromale Überexpression zwischen p16 und p21 und zwischen p16 und p53 bestehen. Hierbei wurde die stromale Expression von Cyklin-A als bester Marker für die Unterscheidung zwischen den Tumorgraden bezeichnet [44].

Im Gegensatz zu Witte et. al, die keine Expression von EGFR in epithelialen und stromalen Zellen phylloider Tumoren fanden [98], beobachteten Suo et al. (2000) die Expression von EGFR in epithelialen und mesenchymalen Zellen der benignen, borderline und malignen phylloiden Tumoren sowie eine signifikante Korrelation zwischen der erhöhten Expression von EGFR mit der Malignität des Tumors [87]. Nach der Untersuchung einer Reihe von Antigenen und Rezeptoren, darunter EGFR, ER und PR, in phylloiden Tumoren und Fibroadenomen nahmen Mechttersheimer et al. (1990) an, dass wahrscheinlich eine hormonunabhängige Stimulation der Stromazellen zu einer lokalen Proliferation als primäres Geschehen in der Tumorentstehung führen [55].

Die Analyse der Hormonrezeptoren phylloider Tumoren ergab, dass die Konzentration der drei Steroidhormonrezeptoren ER, PR und DR im Zytoplasma dieser Tumoren verglichen mit Karzinomen keine signifikanten Unterschiede aufweist [47] und phylloide Tumoren und Fibroadenomen einen ähnlichen Rezeptorstatus besitzen [96]. Bei Tse et al. (2002) zeigte die epitheliale ER- und PR-Expression eine reziproke Korrelation mit dem Malignitätsgrad. Die ER-Expression korrelierte mit der Anzahl der Mitosen [94].

### **1.9. Molekulare Befunde**

Im Gegensatz zu Layfield et al. (1989) wurde in der Arbeit von El Nagggar et al. (1990) eine signifikante Assoziation zwischen einem ungünstigen klinischen Verlauf des phylloiden Tumors und der DNA-Ploidie beobachtet [50, 27]. Birdsall et al. (1992) berichteten von einem phylloiden Tumor mit einem

Karyotyp mit klonalen Chromosomenveränderungen [11]. Diese Autoren wiesen 1995 wiederholt auf den klonalen Ursprung phylloider Tumoren hin, indem sie mittels zytologischer und FISH-Analysen zusätzliche Kopien von 1q sowie den Verlust von Chromosom 21 in zwei Schnitten eines phylloiden Tumors fanden [12]. Die Zunahme von 1q-Kopien wurde in weiteren Studien als häufigste und die strukturellen Änderungen von 10q als zweihäufigste chromosomale Veränderung angegeben [53, 74]. Allelische Ungleichgewichte an den Chromosomen 1q und 3p wurden im Stroma und/oder im Epithel phylloider Tumoren von Sawyer et al. (2000) beobachtet [82]. Jee et al. (2003) bestätigten die Zunahme der Kopienanzahl von 1q in benignen und malignen Tumoren, jedoch nicht die Änderungen der DNA-Kopienanzahl oder allelische Verluste an 3p [33]. Die allelischen Verluste auf Chromosom 3p wurden von Kleer et al. ebenfalls nicht gefunden [40]. In einer anderen chromosomalen Analyse mittels „GTG-banding“ wurden in Fibroadenomen zumeist numerische Aberrationen der Chromosomen 16, 18, 21 und in phylloiden Tumoren mehrere numerische Veränderungen wie Chromosomenzunahmen nachgewiesen [5]. Zur Untersuchung der Prognose analysierten Samaratunga et al. (2001) silbermarkierte „nucleolar-organizer-regions“ (Ag-NOR). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die „Ag-NOR-counts“ eine gewisse Aussagekraft zu Prognose und Überlebensrate besitzen [78]. Weiterhin können der p53-Genstatus und die BAX-Expression bei phylloiden Tumoren eine prognostische Bedeutung haben [43].

Die Studie von Kersting et al. (2005) erbrachte einige neue Erkenntnisse hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen der EGFR-Proteinexpression und Amplifikationen des EGFR-Gens in phylloiden Tumoren. Die Gesamtgen-Amplifikation sowie die Amplifikation des ersten CA-Repeats von Intron 1 des Gens wurden jeweils mittels FISH-Analyse und quantitativer rt-PCR nachgewiesen. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Tumordignität, EGFR-Überexpression und Amplifikationen des ersten CA-Repeats von Intron 1 des EGFR-Gens in Stromazellen, jedoch keine Korrelation mit Gesamtgenamplifikationen (FISH). Es wurde festgestellt, dass in phylloiden Tumoren die Zunahme der Genkopien nicht die Hauptursache für die Proteinexpression sein kann, sondern andere Veränderungen wie unter anderem die des ersten CA-Repeats von Intron 1 für die veränderte Proteinexpression verantwortlich sein müssen.

Bei Fibroadenomen konnte weder eine EGFR-Expression noch eine Erhöhung der EGFR-Gesamtgenkopien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vorhandensein von EGFR-Überexpressionen und EGFR-Amplifikationen eine deutliche Unterscheidung der beiden Tumorarten in schwierigen Fällen ermöglichen kann [38].

### **1.10. Fragestellung**

Der phylloide Tumor ist ein hinsichtlich Pathogenese und Progression nur ansatzweise verstandener Tumor der Brust. Eine Vielzahl immunhistologischer Untersuchungen konzentrierte sich speziell auf die Charakterisierung prognostischer Parameter. Aktivierende Genmutationen wurden in diesen Arbeiten jedoch nicht beschrieben.

Basierend auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe „Mammapathologie“ am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster zu EGFR-Amplifikationen in phylloiden Tumoren der Brust soll diese Arbeit sich mit der Bedeutung immunhistochemischer Parameter hinsichtlich Entstehung und Progression phylloider Tumoren befassen.

Hierbei sollen folgende Parameter untersucht werden:

1. Proteinexpressionsmuster in verschiedenen morphologischen Progressionsstufen phylloider Tumoren
2. Proteinexpressionsmuster, die mit einer EGFR-Expression und einer EGFR-Amplifikation assoziiert sind, um Aussagen über mögliche EGFR-abhängige Pathways in phylloiden Tumoren zu erhalten

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Erläuterung der untersuchten Antikörper bzw. Antigene**

Im Folgenden werden die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendeten Antikörper bzw. ihre spezifischen Antigene erläutert.

##### **2.1.1.1. c-Kit**

c-Kit ist ein Typ-III-Tyrosinkinase-Rezeptor (RTK) mit einem Molekulargewicht von 145 kDa. Der Ligand des c-Kit Proteins ist der Stammzellsfaktor (SCF). RTKs sind essentielle Enzyme intrazellulärer Signalwege, der Signaltransduktion, des Zellwachstums, der Differenzierung, Migration sowie des Zellmetabolismus. Aktivierende Mutationen von c-Kit sind bei verschiedenen menschlichen Erkrankungen wie dem gastrointestinalen Stromazelltumor (GIST) und der Mastozytose identifiziert worden. Eine Überexpression von c-Kit ist zudem mit einer Reihe von Tumoren beim Menschen wie z.B. dem adenoidzystischen Karzinom (ACC), dem Lungenkarzinom oder dem Karzinom der Brust assoziiert [52, 57, 73].

##### **2.1.1.2. SMA**

Fibroblasten stellen eine dynamische Zellpopulation dar, die innerhalb und zwischen den verschiedenen Geweben eine funktionelle Heterogenität zeigen. Diese Heterogenität ergibt sich aus phänotypischen Unterschieden und der Aktivität oder Differenzierung, die in den Zellen stattfinden. Fibroblasten können so induziert werden, dass sie Merkmale anderer Zelltypen entwickeln. Insbesondere wurde berichtet, dass eine Untergruppe von Fibroblasten die Differenzierungseigenschaften glatter Muskelzellen zeigen. Diese Zellen, auch als Myofibroblasten bekannt, exprimieren zytoplasmatische Aktinfilamente, die speziell durch die Expression von SMA (smooth-muscle-actin) charakterisiert sind. SMA ist typischerweise in Fibroblasten nicht, jedoch in glatten Muskelzellen vorhanden [49]. SMA-positive Myofibroblasten sind möglicherweise kausal an der Tumorinvasion beteiligt [7, 18].

### **2.1.1.3. S100**

Die S-100-Proteinfamilie besteht aus 21 niedermolekularen Proteinen (9-13 kDa), die durch das Vorhandensein zweier  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender EF-Handmotive gekennzeichnet sind. S-100-Proteine liegen in den Zellen wie antiparallele Hetero- und Homodimere vor und treten über  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung mit Zielproteinen in Wechselwirkung, um die Zellfunktion zu regulieren [26]. Es wird angenommen, dass wichtige Funktionen der S-100-Proteine in der Immunantwort, Differenzierung, Zytoskelettdynamik, Kalziumregulation und im Zellwachstum liegen. S-100 zeigt veränderte Expressionsniveaus in verschiedenen Tumorentitäten und teilweise auch in unterschiedlichen Tumorstadien [29]. Die Gene der S-100-Proteine befinden sich auf dem menschlichen Chromosom 1q21 [26]. S-100 Gene und Proteine sind entlang der verschiedenen Säugetierarten hochgradig konserviert [54].

### **2.1.1.4. Desmin**

Desmin ist ein Intermediärfilament (IF vom Typ III), das ausschließlich in allen Arten von Muskelgewebe und in Endothelzellen vorkommt [22]. Es sind mehrere Desmin-Isoformen beschrieben worden, die sich intrazytoplasmatisch vermehrt um die Kerne und um die Z-Linie anordnen. Die Funktion von Desmin ist derzeit noch unklar. Diskutiert werden Funktionen bei der Myofibrillogenese, der mechanischen Unterstützung für die Muskelzelle, der mitochondrialen Lokalisation und der Genexpressionsregulation. Die Expression des Desmin-Gens wird durch eine Kombination verschiedener Transkriptionskontrollregionen in Muskelzellen reguliert [71].

### **2.1.1.5. EMA**

EMA (Epitheliales-Membran-Antigen), auch bekannt als MUC1, ist ein membranassoziertes Muzin und gehört zu einer Gruppe von hochglykosylierten Proteinen, die in die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion eingreifen. EMA wird in den meisten normalen und neoplastischen epithelialen Zellen exprimiert. Wie bei anderen Muzinen dient MUC1 der Bildung der sog. Glycocalyx an der mukosalen Oberfläche der Epithelzellen und fungiert als Barrierschutz, der die Zellen vor Dehydrierung, Proteolyse und Infektion schützen soll. Die Überexpression von MUC1 ist mit einer verschlechterten Prognose bei einer Reihe von Karzinomen

assoziiert. Aus diesem Grund wird der EMA-Antikörper als nützlicher Marker für Diagnose und Prognose einiger Tumorarten eingesetzt [31, 48, 51].

#### **2.1.1.6. p53**

p53 ist ein Tumorsuppressorgen. Mutiertes p53 weist eine längere Halbwertszeit auf und ist in höheren Mengen in entarteten Zellen mit p53-Mutation vorhanden. Es aktiviert Zielgene wie p21 und GADD45 durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen im Promotorbereich. Die Überexpression des p53-Wildtyps verursacht einen Wachstumsstopp in der G1 und G2/M-Phase des Zellzyklus, fördert Differenzierung und Apoptose und besitzt zudem eine entscheidende Rolle in der Prävention genetischer Instabilität, die durch DNA-schädigende Einflüsse entsteht [99].

#### **2.1.1.7. Ki-67 (MIB-1)**

Die Expression des humanen Proteins Ki-67 ist streng mit der Zellproliferation assoziiert. Die Tatsache, dass dieses Protein während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) anwesend ist, jedoch bei ruhenden Zellen, also in der G0-Phase abwesend ist, macht es zu einem verlässlichen Marker zur Bestimmung der sog. Wachstumsfraktion einer Zellpopulation. Die Fraktion Ki-67-positiver Tumorzellen korreliert oft mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung. Ki-67 gehört zur Familie der MPM-2-Antigene, deren Phosphorylierung mit der Mitose sowie der Chromosomenkondensation und Trennung der Schwesterchromatiden assoziiert ist. Außerdem ist eine C-Terminale Bindungsstelle von Ki-67 in der Lage, alle drei Mitglieder der HP1-Familie (heterochromatin-protein-1) zu binden. Diese Tatsache weist auf eine Rolle bei der Kontrolle der Chromatinstrukturen hin [37, 56, 83].

#### **2.1.1.8. EGFR**

Der Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal-Growth-Factor-Receptor, EGFR) ist Mitglied einer Familie, die aus vier Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTKs) besteht: EGFR (HER1 oder ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). EGFR ist ein 170 kDa schweres, transmembranöses Protein. Der Rezeptor wird durch verschiedene Liganden wie z.B. den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den Transforming-Growth-Factor- $\beta$ , Betacellulin, Amphiregulin und Epiregulin aktiviert [73]. Wird EGFR

aktiviert, phosphoryliert und aktiviert es andere intrazelluläre Proteine, die die Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese mitregulieren. Eine Überexpression von EGFR korreliert häufig mit einer schlechten Differenzierung, einem fortgeschrittenen Stadium und einer schlechten Prognose [89]. EGFR ist an der Metastasierung beteiligt und wird von einer grossen Anzahl epithelialer Tumoren exprimiert [28].

#### **2.1.1.9. p16**

Das Tumorsuppressor-Protein p16INK4a wirkt hemmend auf CDK4 und CDK6, Cyclin-abhängige Kinasen vom D-Typ, die die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Tumorsuppressor-Proteins (RB) einleiten [68]. Die wachstumshemmenden Eigenschaften von RB werden durch Phosphorylierung inaktiviert [85]. Die durch das Retinoblastoma-Protein gesteuerte Signalkaskade (pRb1-cyclinD1-cdk4/6-p16) nimmt an der Regulation der zellulären Prozesse am Übergang der G1/S-Phasen des Zellzyklus teil. Störungen in dieser Signalkaskade führen zu einer Deregulation der Zellzyklus-Maschinerie, was in einer unkontrollierten Zellproliferation, Invasion und Metastasierung resultiert [84]. Das p16-Gen (CDKN2), welches auf Chromosom 9p21 lokalisiert ist, weist häufig Mutationen auf [13]. In Tumoren, in denen dieses Gen nicht durch Mutation inaktiviert ist, wird es oft durch Methylierung seiner kontrollierenden DNA-Sequenz stillgelegt [1].

#### **2.1.1.10. p21**

p21WAF1 (abgekürzt als p21) spielt eine kritische Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums und der Zellantwort auf DNA-Schäden. Die Primärziele von p21 sind CDK-Cykline und das "proliferating-cell-nuclear-antigen" (PCNA), die die Progression der eukaryotischen Zellen durch den Zellzyklus regulieren. p21 bildet Komplexe mit einer Klasse von CDK-Cyklinen, um deren Kinaseaktivität zu hemmen, und mit PCNA, um die DNA-Synthese zu hemmen. Das Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase nach erfolgter DNA-Schädigung wird durch p53 vermittelt. Die Expression von p53 führt zur induzierten Expression von p21, welches seinerseits die Aktivität von CDK2-assoziierten Kinasen hemmt [14]. Die p53-vermittelte p21-Induktion, welche auch durch p53-unabhängige Mechanismen vermittelt werden kann, ist somit für das Anhalten des Zellzyklus als Antwort auf die DNA-Schädigung essentiell [76]. Es gibt weitere Hinweise,

dass p21 nicht nur als Cyklin-abhängiger Kinasehemmer fungiert, sondern auch Einfluss auf die Zellproliferation und die Zellalterung nehmen kann [97].

#### **2.1.1.11. p27**

p27 ist ein CDK-Inhibitor und spielt eine wichtige Rolle bei der negativen Regulation des Zellzyklus während der G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phasen [42]. Es gilt als weiteres Schlüsselprotein bezüglich der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose [72]. Die Degradation von p27 ist ein kritischer Punkt des G<sub>1</sub>/S-Übergangs und wird durch die Ubiquitinierung durch SCF (Skp2) und die darauffolgende Degradierung durch das Proteasom 26S vermittelt (Ubiquitin-Proteasom-Bahn) [42]. Das p27-Gen wurde auf 12p13 lokalisiert [21]. p27-Mutationen wurden nur selten in menschlichen Neoplasien beschrieben. Die normale Funktion von p27 in Malignomen wird durch eine beschleunigte p27-Proteolyse, eine Sequestrierung durch Cyklin-D-CDKs und durch eine fehlerhafte Lokalisation von p27 im Zytoplasma der Tumorzellen beeinträchtigt. Eine verringerte Expression von p27 wurde wiederholt mit einer schlechten Differenzierung assoziiert. Im invasiven Mammakarzinom war eine verringerte p27-Expression oder gar der komplette Verlust von p27 in Fällen mit und ohne Lymphknotenmetastasen mit einer schlechten Prognose assoziiert [2].

#### **2.1.1.12. Cyklin-A**

Die periodischen Aktivitätsschwankungen der Cyklin-abhängigen-Kinasen (CDK) werden durch ein komplexes Ensemble von Enzymen und anderen Proteinen kontrolliert. Die wichtigsten dieser CDK-Regulatoren sind die Cykline. Nach der Stufe des Zellzyklus, in der sie an CDK binden und aktiv werden, werden vier Klassen von Cyklinen unterschieden, die jeweils mit der zugehörigen CDK reagieren: G<sub>1</sub>-Cykline (Cyklin D1-Cdk4,6), G<sub>1</sub>/S-Cykline (Cyklin E-CDK2-Komplex), S-Cykline (CyklinA-CDK2-Komplex), M-Cykline (CyklinB-CDK1-Komplex).

Die Aktivität eines Cyklin-CDK-Komplexes kann durch die Phosphorylierung eines Aminosäurepaares im Dach des aktiven Zentrums gehemmt werden. Die andere Regulationsmöglichkeit des Komplexes ist die Bindung von CDK-Inhibitor-Proteinen wie z.B. p27. p27 bindet sowohl die Cyklin- als auch die CDK-Untereinheit des Komplexes, wodurch das aktive Zentrum der CDK in seiner Funktion beeinträchtigt wird [69].

#### **2.1.1.13. Cyklin D**

Die Cyklin-D-Cdk4,6/INK4/Rb/E2F-Bahn spielt eine Schlüsselrolle beim Zellwachstum, indem sie mehrfache mitogene und antimitogene Anregungen integriert. Viele Krebszellen vermehren sich unangemessen, indem sie Rb ganz eliminieren oder indem sie Mutationen in anderen Komponenten des Rb-Regulationsweges erwerben. In normalen Zellen stimuliert ein Komplex von Cyklin-D1 und der Cyklin-abhängigen-Kinase CDK4 (G1-CDK) das Durchlaufen des Zellzyklus durch Phosphorylierung von Rb. Das p16-Protein (INK4) inhibiert den Verlauf des Zellzyklus, indem es die Bildung eines aktiven Cyklin-D1-CDK4-Komplexes verhindert. Amplifikationen von Genen wie CDK4 oder Cyklin-D1 wurden in Glioblastomen und im invasiven Mammakarzinom beschrieben. Folge ist eine vermehrte Zellproliferation [69]. Dem menschlichen Cyklin-D1-Gen, auch bekannt als PRAD1, wird somit eine protoonkogene Funktion zugeschrieben [64].

#### **2.1.1.14. Cyklin E**

E-Cykline (Cyklin-E1 und Cyklin-E2) werden während der späten G1-Phase des Zellzyklus bis zum Ende der S-Phase exprimiert. Die Expression von Cyklin-E wird auf dem Niveau der Gentranskription hauptsächlich durch Mitglieder der E2F-Familie und durch seinen Abbau durch das Proteasom reguliert. Cyklin-E bindet und aktiviert die Kinase CDK2 und leitet über die Bildung von Cyklin/CDK2-Komplexen eine Kaskade ein, die zur Expression der spezifischen Gene der S-Phase führen. Neben dieser spezifischen Funktion als Regler der S-Phase spielt Cyklin-E eine direkte Rolle in der DNA-Replikation, in der Kontrolle der Genomstabilität und im Centrosomen-Zyklus [63]. Die Deregulation von Cyklin-E ist in einem breiten Spektrum humaner Malignome beschrieben worden [17].

#### **2.1.1.15. c-myc**

c-myc, ein Protoonkogen, das auf Chromosom 8q24 lokalisiert wurde und zur Myc-Genfamilie gehört, kodiert für ein DNA-bindendes Kernprotein, das als Transkriptionsfaktor fungiert [20]. Es handelt sich hierbei um ein Protein mit einer sog. „helix-loop-helix-Konfiguration“, das mit einem Partnerprotein dimerisiert, wobei ein sog. „Myc-Max-Komplex“ entsteht. Dieser Komplex bindet DNA-

Aufstellungsorte 5'-CACGTG-3, die als sog. „E-boxes“ bekannt sind. Die Myc-aktivierten Funktionen gehen mit einem Zustand einher, in dem die Kohlenstoffquellen schnell verbraucht werden, Vorläufer für makromolekulare Synthesen entstehen und sich zelluläre Massen ansammeln. Demgegenüber sind die meisten Myc-unterdrückten Gene an der Interaktion und Kommunikation der Zellen mit ihrer äußeren Umgebung und mit Faktoren beteiligt, welche antiproliferative oder antimetastatische Eigenschaften besitzen [67]. Die Überexpression von Myc korreliert mit einer breiten Reihe menschlicher Malignome einschließlich des Brustkrebses [36].

### **2.1.2. Gewebeproben**

- Paraffinblöcke mit 58 formalinfixierten und paraffineingebetteten phylloiden Tumoren der weiblichen Brust aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der westfälischen Wilhelm Universität Münster entnommen wurden
- Kontrollgewebe (s. Tab. 2)

### **2.1.3. Praktische Details zu den verwendeten Antikörpern**

Tabelle 1 zeigt die verwendeten Antikörper.

### **2.1.4. Geräte, Zubehör und Reagenzien**

(siehe Anhang)

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Immunhistochemie: Definition, diagnostische und therapeutische Bedeutung**

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Sammelbegriff für verschiedene Methoden, die zur Darstellung von zell- und gewebespezifischen Antigenen (meist Proteinen) verwendet werden. Mit Hilfe von Antikörpern werden die gesuchten Antigene in-situ markiert und visualisiert. Durch den spezifischen Nachweis von Proteinen erlaubt die IHC im Idealfall die Darstellung von Zellen mit gleichen funktionellen Eigenschaften oder Zellen gleichen Ursprungs. Zur Visualisierung eines gebundenen Antikörpers können je nach Fragestellung verschiedene Techniken verwendet werden.

Die immunhistochemischen Techniken haben in den letzten Jahren maßgeblich zur effizienten Phänotypisierung von Tumoren und Zellen in Diagnostik und Forschung beigetragen. Die Sensitivität und Spezifität der IHC-Techniken wurden durch Fortschritte bei der Gewebepreparation wesentlich verbessert und erlauben heutzutage den breiten Einsatz an routinemäßig formalinfixiertem Gewebe.

<b>Antikörper</b>	<b>Herstellerfirma</b>	<b>Klon</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Isotyp</b>
<b>EGFR</b>	Monosan	EGFR.113	1:20	Monoklonal
<b>c-Kit</b>	DAKO	(p)	1:100	Polyklonal
<b>SMA</b>	DAKO	1A4	1:4000	Monoklonal
<b>S100</b>	DAKO	(p)	1:10000	Polyklonal
<b>EMA</b>	DAKO	E29	1:2000	Monoklonal
<b>P53</b>	DAKO	DO-7	1:2000	Monoklonal
<b>Ki-67</b>	DAKO	Mib-1	1:1000	Monoklonal
<b>P16</b>	Neomarkers	16P07	1: 160	Monoklonal
<b>P21</b>	Oncogene	WAF1	1:10	Monoklonal
<b>P27</b>	BD Pharmingen	57	1:1000	Monoklonal
<b>Desmin</b>	DAKO	D33	1:1000	Monoklonal
<b>Cyklin A</b>	Monosan	6E6	1:100	Monoklonal
<b>Cyklin D1</b>	Novocastra	DCS-6	1:20-	Monoklonal
<b>Cyklin E</b>	Monosan	13A3	1:200	Monoklonal
<b>c-myc</b>	Santa Cruz	9E10	1:150	Monoklonal

**Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper und ihre Eigenschaften**

In der Pathologie findet die IHC folgende Verwendungen:

- Diagnose und Klassifizierung maligner Tumoren durch Verwendung spezifischer AK (Tumormarker) und Nachweis spezifischer Antigene
- Identifikation des Primärtumors bei Vorliegen einer Metastase durch Nachweis von organ- und zellspezifischen Antigenen
- Nachweis infektiöser Erreger bei Verdacht auf Erreger-assoziierte Tumoren und Entzündungen
- Klassifizierung von Lymphomen und Leukämien
- Aussagen zu prädiktiven Faktoren bei bestimmten Malignomen[15, 35].

Da die Bestimmung der Dignität des phylloiden Tumors nach histologischen Kriterien nicht immer einwandfrei möglich ist, kann die Verwendung immunhistochemischer Methoden insbesondere bei komplizierten Fällen möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen, aber auch Hinweise auf molekulare Abläufe in der Entstehung und Progression dieser Tumorentität geben.

### **2.2.2. Tissue-Micro-Array Technik (TMA)**

Die konventionelle mikroskopisch-pathologische Untersuchungsmethode, die seit gut über einem Jahrhundert verwendet wird, wird normalerweise auf die Untersuchung ein oder zwei spezifischer Eigenschaften eines einzelnen formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnittes auf einem einzelnen Objektträger begrenzt [46].

Die konventionelle Untersuchung von Gefriermaterial oder paraffineingebetteten Geweben ist zu teuer und zu zeitaufwändig, um sie für die Charakterisierung hunderter oder tausender mit bestimmten Tumorarten oder Erkrankungen assoziierter Gene oder Gencluster zu verwenden. Aus diesem Grund sind Methoden entwickelt worden, die das parallele Forschen an einer großen Serie von Geweben in einem einzelnen Versuch erleichtern können. Die von Kononen et al. 1998 beschriebene Tissue-Micro-Array Technik ermöglicht die Bearbeitung und Untersuchung zahlreicher Gewebeproben auf einem Objektträger mit Hilfe eines hochpräzisen Stanzinstrumentes, das die exakte und reproduzierbare Platzierung von Gewebeproben ermöglicht.

Die Spendergewebeblöcke sollen histologisch repräsentativ sein und eine Dicke von mindestens 1 mm, vorzugsweise 3-4 mm, aufweisen. Archivblöcke, die 20-

40 Jahre alt sind, können üblicherweise für IHC-Untersuchungen verwendet werden, wenn sie in 4%igem Formalin fixiert wurden.

Nach initialer Überprüfung und Auswahl der Originalblöcke ist es ratsam, diese in der Reihenfolge der späteren Versuche in den TMA-Block einzustanzen. Dies erleichtert mögliche Überprüfungen und die Konstruktion weiterer Serien aus denselben Originalblöcken. Es ist weiterhin empfehlenswert, den Aufbau des Arrays computer-gestützt zu archivieren, damit die Koordinaten des Originalblocks und die Grunddaten der Patienten (evtl. mit Identifikationsnummer) sicher gespeichert, schnell zugänglich und wenn nötig veränderbar und erweiterbar sind.

Von den Originalblöcken wird jeweils ein frischer Schnitt angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) angefärbt. Dieses Schnittpräparat wird verwendet, um bei der Probeentnahme eine histomorphologisch repräsentative Stelle des Gewebeblocks zu treffen. Durch Nadelbiopsie entnommene Gewebsexemplare aus den paraffineingebetteten Donor-Originalblöcken werden in einen leeren Rezeptor-Paraffinblock übertragen, wobei die Gewebeproben in vorgesehenen Bohrungen (Stanzen) platziert werden, die durch eine definierte x-y- Position eingeführt wurden. Die Biopsienadeln sind mit verschiedenen Durchmessern von 0,6 bis 2 mm verfügbar. Je kleiner der Nadeldurchmesser ist, umso größer ist die Anzahl der möglichen Gewebeexemplare auf dem Rezeptor-Block. Mit 0,6 mm Nadeldurchmesser und 0,8 mm Abstand der einzelnen Stanzen untereinander können ungefähr 1000 Gewebsexemplare auf einer Fläche von 45 x 25 mm angeordnet werden. Von dem so angefertigten Rezeptor-Paraffinblock (= TMA-Block) können anschließend mittels eines Mikrotoms 5 µm dicke Schnitte angefertigt werden, wobei von jedem TMA-Block insgesamt bis zu 300 Schnitte abgetragen werden können. Diese werden schließlich auf Objektträger aufgebracht und können nun angefärbt werden [34, 70].

Die Vorteile der TMA-Technik verglichen mit konventionellen immunhistochemischen Untersuchungsansätzen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- weitaus höherer Probendurchsatz
- umfassendere und wesentlich erleichterte Analyse großer Patientenzahlen, aus der statistisch deutlich validere Aussagen

hinsichtlich der prognostischen Bedeutung untersuchter Biomarker resultiert

- suffiziente Charakterisierung veränderter Proteinexpressionsmuster humaner Malignome hinsichtlich Tumorentstehung und -progression mit der zumindest teilweise eine zeit- und kostenintensive molekulargenetische Analytik umgangen werden kann
- Möglichkeit von Untersuchungen zur Co-Expression einzelner Biomarker durch Auswertung serieller Gewebeschnitte - bisher unbekannte Interaktionen zwischen einzelnen Proteinen können auf diese Weise nachgewiesen werden, auf DNA- bzw. RNA-Ebene eventuell bestehende regulatorische Zusammenhänge kann so letztendlich zurückgeschlossen werden [58].

#### **2.2.2.1. Arbeitsschritte bei der Gewebeaufarbeitung mittels TMA-Methode**

- Die ausgesuchten phylloiden Tumoren wurden eingehend untersucht, das Grading wurde nach WHO-Richtlinien (WHO 2003) durchgeführt.
- Von jedem paraffineingebetteten Tumorblock wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnittpräparate angefertigt, um repräsentative Tumorareale zu lokalisieren, die später durch Nadelbiopsie gewonnen werden sollen.
- Festlegung der Anzahl der durchzuführenden Nadelbiopsien.
- Anfertigung eines Rezeptorblocks aus Paraffin, welcher fest in den Plastikblockhalter montiert wurde. Hierzu wurde der Block im gleichen Winkel wie das Mikrotommesser eingestellt, damit alle Gewebeexemplare im Rezeptorblock gleichzeitig geschnitten werden.
- Die Mikrometerschraube wurde auf „null“ eingestellt, danach wurde die X-Y-Position für die erste und alle nachfolgenden Stanzen eingestellt. Die Nadeltiefe wurde so eingestellt, dass diese ungefähr 0,5 - 1 mm oberhalb des Plastikblockhalters stoppt. Mit der Nadel mit dem kleineren Querschnitt wurde für jede Gewebestanze ein Stanzzylinder aus dem Rezeptorblock herausgestantzt. Mit der Nadel mit dem größeren Querschnitt wurde dann die Gewebestanze entnommen und in die vorbereitete Stanzbohrung eingebracht. Die Gewebestanze wurde dann mit einem Objektträger vorsichtig eingedrückt, damit sie mit der Oberfläche des Blocks bündig abschloss.

- Pro Originalgewebeblock wurden jeweils 6 Stenzen phylloider Tumoren entnommen. Für diese Arbeitsschritte wurde ein speziell entwickeltes TMA-Stanzgerät verwendet.
- Die Nadelbiopsien mit einem Durchmesser von 0,6 mm wurden in einem Abstand von 0,2 mm im Rezeptorblock platziert. Insgesamt wurden drei Rezeptorblöcke angefertigt.
- Anschließend wurden die Rezeptorblöcke mit einem Mikrotom geschnitten. Die Dicke der Schnittpräparate betrug 3-4 µm.

### **2.2.3. Vorbehandlung der Schnittpräparate**

Um das Paraffin vollständig aus dem Gewebe herauszulösen, wurden die Schnittpräparate in Xylol gestellt. Nach der Entparaffinierung erfolgte die Rehydrierung der Schnittpräparate mittels einer absteigenden Alkoholreihe und anschließendem Wässern in Aqua dest. Das Xylol wird durch den 99%-igen Alkohol herausgewaschen, die absteigende Alkoholreihe verhindert, dass die Präparate zu abrupt von hochprozentigem Alkohol in Aqua dest. überführt werden.

Um falsch positive Ergebnisse zu verhindern wurde die Mitreaktion endogener Enzyme im Gewebe blockiert.

Durch eine Reihe von Reaktionen zwischen dem Fixativ und den Gewebsproteinen kommt es bei der Fixierung von Geweben mit Formaldehyd zu Gewebsalterationen mit Maskierungen repräsentativer Antigene. Bindungen von Kalzium an Gewebsproteine werden neben Strukturänderungen der Proteine durch die Formalinfixierung als Ursache für die Maskierung der Antigene verantwortlich gemacht [9]. Der Wiedergewinn des Antigens, der als Demaskierung bezeichnet wird, kann durch verschiedene Methoden wie z.B. die Hitzedemaskierung im Dampfgarer erreicht werden.

### **2.2.4. Inkubation der Primärantikörper und Durchführung der immunhistochemischen Färbungen**

Nach der Vorbehandlung der Schnitte wurden die Primärantikörper aufgetragen. Die kommerziell erhältlichen Antikörper können konzentriert, vorverdünnt oder als Lyophilisate vorliegen. Aus Konzentraten wurden die Antikörperverdünnungen errechnet und hergestellt. Bei zu geringer Verdünnung des Primärantikörpers kann der sog. „Big-bee-Effekt“ auftreten. Hierbei bindet

der Brückenantikörper mit seinen Fab-Bindungsstellen an das Fc-Stück des Primärantikörpers und hat keine Bindungsstellen mehr für weitere Komplexe frei. Das Ergebnis wäre in diesem Fall falsch negativ.

Die Schnittpräparate wurden jeweils mit den entsprechend verdünnten Primärantikörpern inkubiert (Tab. 1). Bei einigen Fällen wurden die Primärantikörper manuell aufgetragen, die Inkubation lief über Nacht bei 4 °C ab. Bei den übrigen Fällen erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern mittels DAKO-Autostainer für 25 min. bei Raumtemperatur (Tab. 2).

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper kann dessen Reaktion mit dem spezifischen Antigen nachgewiesen bzw. sichtbar gemacht werden. Hierzu können direkte und indirekte Nachweismethoden angewandt werden.

In unseren Untersuchungen wurde ein Teil der Primärantikörper durch die ABC-Methode und ein anderer Teil durch die LSAB/AP-Methode nachgewiesen (Tab. 2).

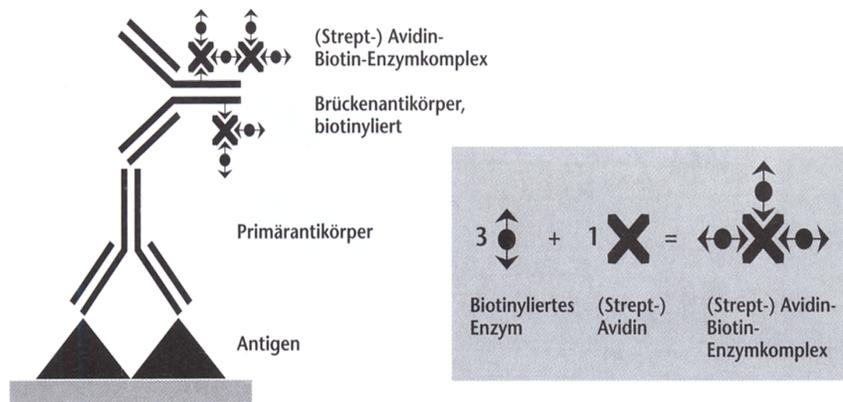
#### **2.2.4.1. ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Methode)**

Bei der ABC-Methode wird ein biotinylierter Brückenantikörper verwendet. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut an Brückenantikörper koppeln lässt und die Verbindung zum ABC-Komplex herstellt. Bei der Herstellung wird an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins jeweils ein Biotinmolekül gebunden. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein (Tetramer) mit vier Bindungsstellen für Biotin. An den Komplex ist ein Enzym wie Peroxidase oder Phosphatase gekoppelt (Abb. 1). Die Detektion wird durch ein bestimmtes Chromogen (Farbstoff), das mit Hilfe des Substratpuffers und der Einwirkung eines Enzyms als Katalysator, eine Farbreaktion bildet ermöglicht.

Die ABC-Methode besitzt eine ca. 4-8-fach höhere Sensitivität als z.B. die PAP- oder APAAP-Methode. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass wie bei der PAP- und APAAP-Methode keine Signalverstärkung durch Wiederholung möglich ist [66].

<b>Antikörper</b>	<b>Antigendemaskierung</b>	<b>Inkubation</b>	<b>IHC-Methode</b>	<b>Positivkontrolle</b>
<b>EGFR</b>	Autoklav	über Nacht bei 4°C	ABC-Methode	Squamöses Karzinom
<b>c-kit</b>	Dampfgarer (Steamer)	DAKO-Autostainer	LSAB/AP-Methode	normales Brustgewebe
<b>SMA</b>	Dampfgarer (Steamer)	DAKO-Autostainer	LSAB/AP-Methode	normales Brustgewebe
<b>S100</b>	keine	DAKO-Autostainer	LSAB/AP-Methode	Appendix
<b>EMA</b>	Dampfgarer (Steamer)	DAKO-Autostainer	LSAB/AP-Methode	normales Brustgewebe
<b>P53</b>	Dampfgarer (Steamer)	DAKO-Autostainer	LSAB/AP-Methode	Ovarialkarzinom
<b>Ki-67</b>	Dampfgarer (Steamer)	DAKO-Autostainer	LSAB/AP-Methode	Tonsille
<b>c-myc</b>	Dampfgarer (Steamer)	DAKO-Autostainer	LSAB/AP-Methode	Granulationsgewebe
<b>P16</b>	Autoklav	über Nacht bei 4°C	ABC-Methode	Granulationsgewebe
<b>P21</b>	Autoklav	über Nacht bei 4°C	ABC-Methode	Granulationsgewebe
<b>P27</b>	Autoklav	über Nacht bei 4°C	ABC-Methode	Granulationsgewebe
<b>Cyklin A</b>	Autoklav	über Nacht bei 4°C	ABC-Methode	Granulationsgewebe
<b>Cyklin D1</b>	Autoklav	über Nacht bei 4°C	ABC-Methode	Granulationsgewebe
<b>Cyklin E</b>	Autoklav	über Nacht bei 4°C	ABC-Methode	Granulationsgewebe

**Tabelle 2: Die verwendeten Methoden bei der Antigendemaskierung, Inkubation mit AK, IHC-Anfärbung und Gewebearten der Positivkontrollen**



**Abb. 1: Schematische Darstellung der ABC-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex [66]**

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der biotinylierte Rabbit-Anti-Maus-Antikörper (DAKO) als Brückenantikörper verwendet. Die Signalverstärkung erfolgte durch den Einsatz des Avidin-Biotin-Komplexes. Als Chromogen für die Färbung der Präparate wurde DAB (3,3 Diaminobenzidin - in organischen Lösungsmitteln unlösliche Substanz mit einem braunen Farbprodukt) verwendet. Um einen höheren Farbkontrast zu erzielen, wurde nach der Färbung der Schnitte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, das eine eindeutige blaue Färbung der Zellkerne bewirkt, durchgeführt.

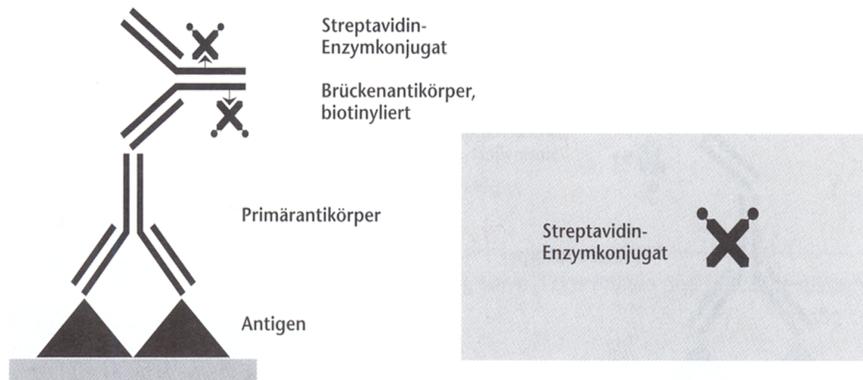
Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte der ABC-Methode sowie die durchgeführten Vorbehandlungsschritte beschrieben:

- Entparaffinierung der Schnitte durch Einstellen in Xylol (2 x 10 min.)
- Rehydrierung durch kurzes Eintauchen in eine absteigende Alkohol-Reihe (zweimal 99%, einmal 96%, einmal 80% und einmal 70%)
- 30 min. Inkubation in einer Methanollösung mit 3%iger Hydrogenperoxidase, um die Aktivität der im Gewebe enthaltenen endogenen Peroxidase zu blockieren
- 10 min. Antigendemaskierung in mit 0,01 M Citratpuffer gefüllten Plastikkuvetten (mit einem Deckel verschlossen und mit Alufolie umwickelt) bei 120°C im Autoklaven
- 30 min. Abkühlen der Schnitte auf Raumtemperatur, anschließend kurzes Spülen mit 0,5 M TRIS-Puffer (pH 7,4 - 7,6)

- Austestung der Primärantikörper in einer Verdünnungsreihe (für jeden AK wurde die Verdünnung ausgewählt, die in der Austestung zu dem bestem Ergebnis geführt hatte (Tab. 2))
- Inkubation der Schnittpräparate mit dem Primärantikörper über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C
- gründliches Abspülen der Schnitte in 0,5 M TRIS-Puffer, danach Inkubation mit dem jeweiligen biotinylierten Brückenantikörper für 30 min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
- erneutes gründliches Abspülen der Schnitte in 0,5 M TRIS-Puffer
- Inkubation mit dem jeweiligen ABC-Komplex nach entsprechender Verdünnung für 60 min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur
- erneutes gründliches Abspülen der Schnitte in 0,5 M TRIS-Puffer
- zur Entwicklung der Enzymreaktion 30 min. Inkubation der Schnitte in frisch angesetzter DAB-Lösung bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln
- Kerngegenfärbung durch kurzes Eintauchen der Objektträger in Hämatoxylin-Lösung mit anschließendem Bläuungsvorgang für 5 Min. unter fließendem Leitungswasser
- Eindecken der Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine nach dem Überführen in Aqua dest.

#### **2.2.4.2. LSAB-Methode (Labeled-Strept-Avidin-Biotin-Methode)**

Bei dieser Methode macht man sich ebenfalls die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Zum Einsatz kommen hier identische biotinylierte Brückenantikörper. Im dritten Schritt folgt das Auftragen eines direkt mit einem Enzym (alkalische Phosphatase oder Peroxidase) gebundenen Avidins. Bei Verwendung des Enzyms alkalische Phosphatase - wie in unseren Untersuchungen – wird das Verfahren als LSAB/AP-Methode bezeichnet. Alle vier möglichen Bindungsstellen des Avidins sind für das am Brückenkörper vorhandene Biotin frei (Abb. 2). Der Einsatz von LSAB- Systemen ist durch die hohe Spezifität und einfache Handhabung zu einer bevorzugten Methode avanciert [66].



**Abb. 2: Schematische Darstellung der LSAB-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und Streptavidin-Enzym-Komplex [66]**

Bei dieser Untersuchungsreihe, die mit einem DAKO-Autostainer durchgeführt wurde, wurden biotinylierte Rabbit-Anti-Maus-Antikörper als Brückenantikörper bzw. Sekundärantikörper sowie mit dem Enzym alkalische Phosphatase gebundenes Streptavidin verwendet.

Bei dem verwendeten Kit (ChemMate™-Detection-Kit) wurde ein sekundäres Antikörperreagenz mit Biotin markiert. So konnte jedes biotinylierte Antikörpermolekül mit einigen an alkalische Phosphatase gebundenen Streptavidinmolekülen reagieren. Hierdurch wurde die Sensitivität des Nachweissystems erhöht. Die Konjugation erfolgte über die Zweischnitt-Glutaraldehydmethode.

Die Färbereaktion wurde mittels DAKO-Red durchgeführt. Bei diesem Chromogen handelt es sich um modifiziertes Neufuchsin, das zu einer rotbraunen Farbentwicklung führt. Das Substratsystem bestand bei dem verwendeten Kit aus vier Komponenten: Chromogen Red 1, Chromogen Red 2, Chromogen Red 3 und dem AP-Substratpuffer. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Das durchgeführte Verfahren gliederte sich in folgende Arbeitsschritte gegliedert:

- Entparaffinierung und Rehydrierung in einer Alkoholreihe und Aqua dest. (s.o.)
- 30 min. Antigendemaskierung im Dampfgarer, der 10 mM-Citratpuffer (pH 6,0) enthält

- Verdünnung der Primärantikörper nach Austestung der jeweiligen Antikörper, zur Verdünnung wurde DAKO ChemMate™-Antibody-Diluent (Code-Nr. 2022) verwendet, diese Lösung enthält Trispuffer (pH 7,2) mit 15 mmol/l NaN<sup>3</sup> und Protein
- Programmierung des DakoCytomation-Autostainer-Geräts nach Anleitung
- Bereitstellung der vorgefertigten Reagenzien nach Anzahl der Schnitte bzw. zu färbenden Primärantikörper
- nach dem Einsetzen der Objektträger wurden diese gemäß Objektträgeranordnungsplan im DakoCytomation-Waschpuffer, Code-Nr. S 3006, vorbereitend angefeuchtet
- die Anordnung, die Position der Objektträger und das Volumen der Reagenzien erschienen auf dem Bildschirm
- Reagenzien wurden in die Autostainer Reagent Vials eingefüllt und diese entsprechend dem Reagenzanordnungsplan im Reagenziengestell angeordnet
- Starten des Programms
- Anhalten des Programms beim „Substrate-Batch“-Inkubationsschritt, um das Ansetzen der Substrate-Working-Solution (CHROM) zu ermöglichen
- Vorbereitung und Eingeben der Substrate-Working-Solution (CHROM) entsprechend dem Reagenzmittelanordnungsplan
- sofortige Fortsetzung des Programms, da der Ansatz und die Ladung der Substrate-Working-Solution in das Gerät innerhalb von 20 min. erfolgen müssen, das Chromogen ist nach 20 min. nicht mehr ausreichend reaktionsfähig
- Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung und Blauanfärbung mit Leitungswasser außerhalb des Gerätes, da diese Schritte außerhalb schneller durchführbar sind als im Gerät
- Dehydrieren der Schnitte mittels Alkoholreihe und Xylol sowie deren Eindecken mit Vitro Clud

Tabelle 3 zeigt die notwendigen Reagenzien und Inkubationszeiten bei Verwendung des ChemMate™-Autostainer-Gerätes.

Reagenz	Code-Nr.	Template- Schritt	Inkubationszeit
ChemMate Proteinase K Solution	S 2019 S 2032	Pre-Treatment under Antibody	10 Minuten
Primärantikörper	individuell	Antibody	25 Minuten
ChemMate Detection Kit, Alkaline Phosphatase/RED (link)	K 5005	Secondary reagent	20 Minuten
ChemMate Detection Kit, Alkaline Phosphatase/RED (Streptavidin/AP)	K 5005	Tertiary reagent	20 Minuten
ChemMate Detection Kit, Alkaline Phosphatase/RED (CHROM)	K 5005	Chromogen	2 x 8 Minuten
Hämatoxylin-Gegenfärbung (außerhalb des Gerätes, je älter die Lösung, desto längere Inkubation)	S 3301	Auxiliary	1-5 Minuten
Blauanfärbung in Leitungswasser (außerhalb des Gerätes)	S 3006	Auxiliary	5 Minuten

**Tab. 3: Reagenzienliste und Inkubationszeiten des ChemMate™-Autostainer-Gerätes [24]**

### 2.2.5. Auswertung der Färbeergebnisse

Die Auswertung der Färbeergebnisse wurde durch zwei unabhängig voneinander arbeitende Untersucher in semiquantitiver Form durchgeführt. Hierzu wurden die Färbereignisse nach ihrer Intensität in drei Gruppen zusammengefasst (Kerne + Zytoplasma):

1. (-): keine Anfärbung oder schwache Anfärbung (Score 1), d.h. Anfärbung in weniger als 10% der Zellen
2. (+): mäßige Anfärbung in 10 - 50% der Zellen (Score 2)
3. (++) : starke Anfärbung in mehr als 50% der Zellen (Score 3)

### 2.2.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse und die Auswertung wurden mit SPSS Version 11.5.1 durchgeführt. Die Korrelationen zwischen EGFR-Expression und klinischen Parametern wurden mit Chi-Kreuztabellen ausgewertet, die Analyse der Korrelationen wurde nach KENDALL durchgeführt.

	c-Kit (Stroma)	SMA (Stroma)	S100 (Stroma)	Desmin (Stroma)	EMA (Stroma)	p53 (Stroma)	MIB1 (Stroma)	EGFR (Stroma)	EGFR (Epithel)	p16 (Stroma) %	p21 (Stroma) binary	p27 (Stroma) 0-3 (%)	Cytl. A (Stroma) 0-3 (%)	CyclinD1 (Stroma) binary	CyclinE (Stroma) binary	c-Myc (Stroma) binary	c-Myc (Stroma) binary
P1	0	0	0	0	0	0	1	2	n	70	0	2	1	0	0	.	0
P2	0	0	0	0	0	0	1	0	n	5	0	3	0	0	0	.	.
P3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	15	1	2	0	1	0	1	1
P4	0	2	0	0	0	0	20	0	0	40	1	3	1	0	0	1	1
P5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0
P6	0	0	0	0	0	0	1	0	1	7	1	3	0	0	0	1	0
P7	0	1	0	0	0	0	1	0	1	40	0	2	0	0	0	0	0
P8	0	1	0	1	0	0	1	0	n	30	0	3	0	.	0	0	0
P9	0	2	0	0	0	0	1	0	1	15	0	1	0	1	0	.	0
P10	1-2	2	0	0	0	2	20	2	0	3	1	3	2	0	0	1	1
P11	1-2	0	0	0	0	2	40	2	n	1	1	3	3	1	0	0	0
P12	0	0	0	0	0	1	1	0	n	35	1	3	0	0	0	1	0
P13	1	0	0	0	0	0	3	0	0	60	1	2	0	1	0	1	0
P14	0	2	0	0	1	0	1	0	1	50	0	3	0	0	0	1	1
P15	2	1	0	0	1	3	7	2	0	90	1	3	1	0	1	1	1
P16	0	2	0	0	0	0	1	2	0	60	1	3	0	0	1	1	0
P17	0	0	0	1	0	0	1	0	0	30	0	3	0	0	0	1	0
P18	1	2	0	0	0	0	1	0	1	17	1	3	0	1	0	1	0
P19	0	2	0	3	0	0	2	0	n	25	1	3	0	0	0	1	1
P20	1	0	0	0	0	3	25	0	n	2	1	3	1	0	1	.	0
P21	1	0	0	0	0	0	2	2	0	2	1	3	1	0	1	0	1
P22	0	2	0	0	0	0	15	0	0	50	1	3	1	0	0	1	1
P23	0	0	0	0	0	0	2	0	0	40	1	3	0	1	0	1	0
P24	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	0	3	0	0	0	1	0
P25	0	2	0	2	0	0	1	0	0	45	1	3	0	0	0	1	0
P26	0-1	2	0	0	0	0	15	1	1	40	1	3	1	0	1	1	1
P27	0	1	0	1	0	0	8	1	1	60	0	3	1	1	0	1	1
P28	2	1	0	1	2	2	10	0	n	2	1	3	1	0	1	.	2
P29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	10	0	1	0	0	0	1	0
P30	1	2	0	0	0	2	20	0	0	45	1	3	2	0	0	1	0
P31	2	2	0	0	2	1	30	0	n	5	1	3	1	0	0	.	0
P32	2	0	0	0	0	1	1	0	0	40	1	3	0	1	1	1	1
P33	0	2	0	0	0	1	2	2	1	5	1	3	1	1	1	1	1
P34	0	2	0	0	0	0	1	0	1	25	1	3	0	0	0	1	0
P35	2	2	0	0	0	3	15	2	n	2	1	3	2	0	0	.	0
P36	0	2	0	0	0	0	1	0	2	30	0	2	0	0	1	1	0
P37	0	2	0	0	0	0	1	0	n	15	1	0	0	.	0	.	0
P38	0	1	0	0	0	0	1	0	1	10	0	3	0	0	0	1	0
P39	0	1	0	0	0	0	1	0	2	50	0	3	0	0	0	1	0
P40	0	0	0	0	0	0	1	0	n	20	0	3	0	0	0	1	0
P41	0	0	0	0	0	0	1	0	1	5	.	2	0	.	0	1	0
P42	0	0	0	0	0	1	1	0	n	15	.	3	0	0	0	1	0
P43	0	2	0	0	0	0	1	0	1	5	.	3	0	0	0	1	1
P44	0	1	0	0	0	0	1	0	0	12	1	3	0	0	0	1	1
P45	0	0	0	0	0	0	1	0	0	30	.	3	0	0	0	1	0
P46	0	1	0	0	0	1	3	2	0	5	1	3	1	0	0	1	1
P47	0	2	0	0	0	0	15	1	0	15	0	3	0	0	0	0	1
P48	0	1	0	0	0	3	12	3	0	85	.	3	1	0	1	0	0
P49	0	1	0	0	0	0	1	1	0	30	1	3	0	0	0	1	1
P50	n	1	0	0	0	0	1	0	n	5	.	2	0	.	0	1	1
P51	1	2	0	0	0	0	15	3	0	80	1	3	1	0	0	1	1
P52	0	0	0	0	0	0	1	0	1	15	0	3	0	0	0	1	0
P53	0	0	0	0	0	0	3	0	1	17	0	3	0	1	0	1	0
P54	1	2	0	2	0	0	1	1	0	15	0	3	0	0	0	1	0
P55	0	0	0	0	0	0	1	0	0	85	1	2	0	0	0	1	0
P56	0	2	0	0	0	0	1	0	0	20	1	3	0	0	0	1	0
P57	0	2	0	1	0	0	1	0	0	50	1	3	0	0	1	1	0
P58	0	2	0	1	0	0	1	0	0	25	1	1	0	0	0	1	0

Tab. 4: Expressionsergebnisse der 15 Antikörper in 58 phylloiden Tumoren

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Gesamtübersicht über die Färbeergebnisse

Tabelle 4 zeigt eine Gesamtübersicht der immunhistologischen Untersuchungsergebnisse bzgl. der Expression der 15 verschiedenen Antikörper in den 58 Tumorgeweben. Es handelte sich bei diesen um 8 maligne, 10 borderline und 40 benigne phylloide Tumoren. Die malignen Tumoren sind schwarz und die borderline Tumoren grau markiert.

Die Expressionen von EGFR und c-Myc wurden sowohl im Stroma als auch im Epithel bestimmt. Bei den anderen Antikörpern erfolgte die Bestimmung der Expressionen nur im Stroma.

#### 3.2. Expressionsergebnisse der einzelnen Antikörper

##### 3.2.1. c-Kit

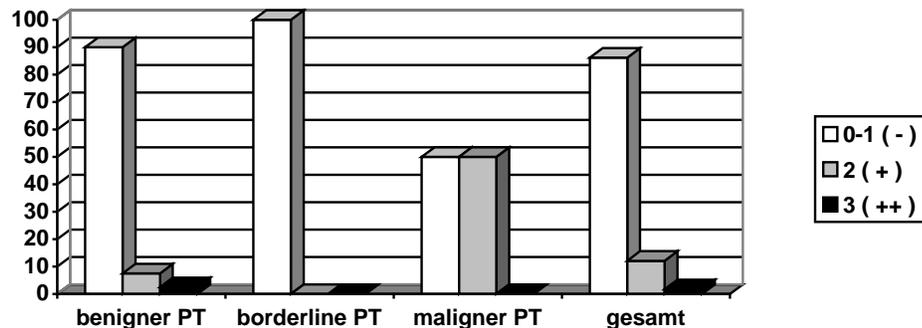


Abb. 3: Reaktionsmuster für c-Kit

Von den 40 benignen Tumoren zeigten 33 Fälle (82,5%) keine Reaktion auf c-Kit. Eine schwache Reaktion zeigte sich in 3 Fällen (7,5%). In einem Fall (2,5%) war die Reaktion schwach bis mäßig (Score 1-2). Mäßige Immunreaktion (Score 2) zeigten 2 benigne Tumoren (5%). Ein benigner Tumor (2,5% aller benignen Tumoren) hatte eine starke Expression (Score 3).

Bei den borderline Tumoren zeigte sich folgende Verteilung: 6 von 10 (60%) zeigten keine Reaktion auf c-Kit. In einem Fall (10%) wurde eine fehlende bis schwache Reaktion mit einer Bewertung von Score 0-1 nachgewiesen. Eine schwache Reaktion war in 3 Fällen (30 %) zu erkennen.

Die Verteilung der Reaktionsmuster bei den 8 malignen phylloiden Tumoren war folgendermaßen: Von 8 Tumoren zeigten 3 (37,5 %) keine Reaktion und 1

Tumor (12,5 %) eine schwache Reaktion. In einem Fall (12,5 %) war eine schwache bis mäßige Reaktion nachweisbar (Score 1-2). Eine mäßige Reaktion fand sich in 3 Fällen (37,5 %).

### 3.2.2. SMA

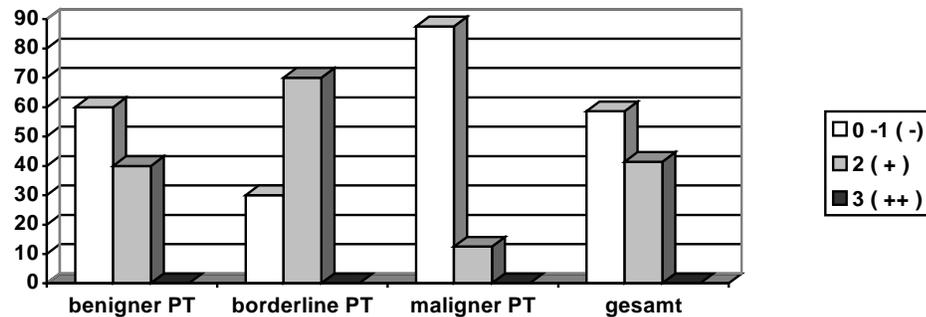


Abb. 4: Reaktionsmuster für SMA

Die benignen Tumoren zeigten in 17 Fällen (42,5 %) keine Immunreaktion. Eine schwache Reaktion war in 7 Fällen (17,5 %) festzustellen. Eine mäßige Reaktion (Score 2) war in 16 Fällen (40 %) nachweisbar.

Bei den borderline Tumoren zeigten sich folgende Reaktionsmuster: In 3 Fällen (30 %) konnte eine schwache und in 7 Fällen (70 %) eine mäßige Reaktion (Score 2) nachgewiesen werden.

Die malignen Tumoren waren in 4 Fällen (50 %) ohne Immunreaktivität für SMA, in 3 Fällen (37,5 %) schwach reaktiv und in einem Fall (12,5 %) mäßig reaktiv (Score 2).

### 3.2.3. S100

Bei allen Subtypen war keine Immunreaktivität vorhanden.

### 3.2.4. Desmin

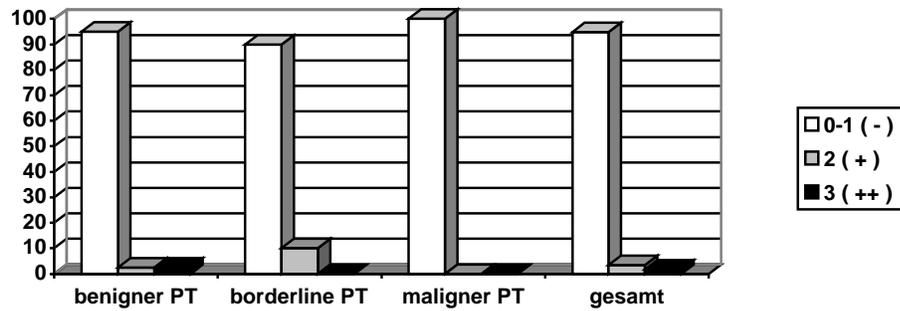


Abb. 5: Reaktionsmuster für Desmin

Die benignen Tumoren zeigten in 35 Fällen (87,5 %) keine Reaktion, 3 Fälle (7,5 %) waren schwach reaktiv, ein Fall mäßig und ein Fall stark positiv (Score 3).

Bei den borderline Tumoren wurden folgende Werte festgestellt: In 7 Fällen (70 %) war keine Reaktion, in 2 Fällen (20 %) eine schwache Reaktion und in einem Fall (10 %) eine mäßige Reaktion zu beobachten.

7 maligne Tumoren (87,5) zeigten keine Immunreaktion für Desmin und nur in einem Fall (12,5 %) konnte eine schwache Reaktion nachgewiesen werden.

### 3.2.5. EMA

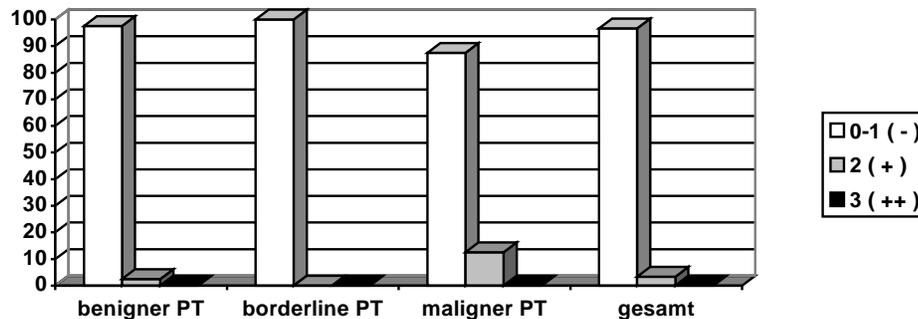


Abb. 6: Reaktionsmuster für EMA

38 von 40 benignen Tumoren (95 %) zeigten keine Reaktion, in einem Fall (2,5 %) ergab sich eine schwache Reaktion und in einem Fall eine mäßige Reaktivität (Score 2) für EMA.

Alle borderline Tumoren zeigten keine Reaktion für EMA.

Bei den malignen Tumoren waren 6 Fälle (75 %) ohne Reaktion, 1 Fall (12,5 %) schwach und 1 weiterer Fall (12,5 %) mäßig reaktiv (Score 2).

### 3.2.6. p53

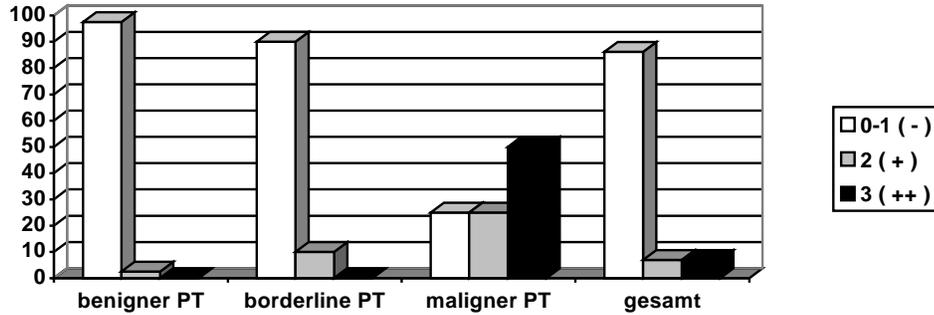


Abb. 7: Reaktionsmuster für p53

In 33 von 40 benignen (82,5 %) Tumoren wurde keine Reaktion auf p53 festgestellt. In 6 Fällen (15 %) war die Reaktion schwach (Score 1). In einem Fall (2,5 %) war eine mäßige Reaktion (Score 2) erkennbar.

Bei den borderline Tumoren fehlte die Reaktion in 9 Fällen (90 %). In einem Fall (10 %) wurde eine mäßige Reaktion (Score 2) ermittelt.

Die Reaktion fehlte in 2 malignen Tumoren (25 %). Eine mäßige Reaktion war in 2 Fällen (25 %) und eine deutliche Reaktion in 4 Fällen (50 %) zu beobachten.

### 3.2.7. MIB1

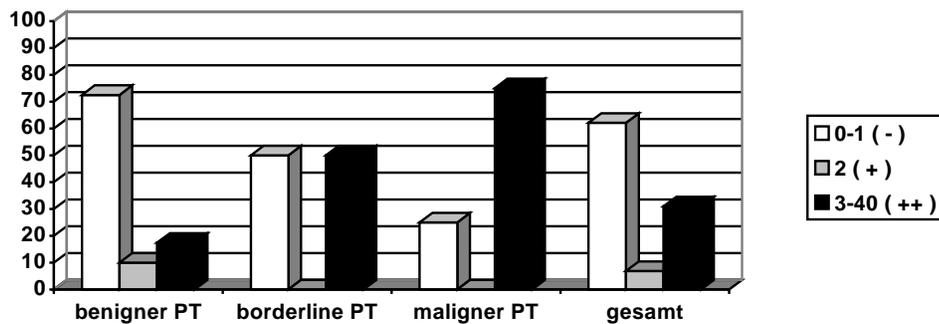


Abb. 8: Reaktionsmuster für MIB1

Bei den benignen Tumoren zeigten 29 Fälle (72,5 %) eine schwache, 4 Fälle (10 %) eine mäßige (Score 2) und 7 Fälle (17,5 %) eine starke Reaktivität für MIB1.

Die borderline Tumoren zeigten in 5 Fällen (50 %) eine schwache Reaktion und in weiteren 5 Fällen (50 %) eine verstärkte Reaktion.

Bei den malignen Tumoren wurde in 2 Fällen (25 %) eine schwache Reaktion und in 6 Fällen (75 %) eine deutliche Reaktivität ermittelt.

### 3.2.8. EGFR (im Stroma)

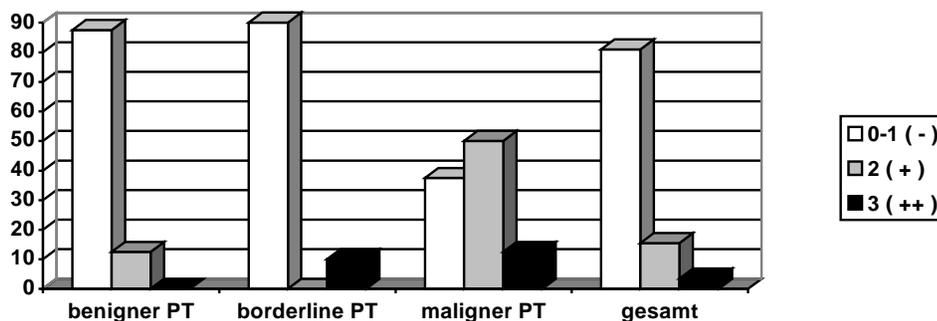


Abb. 9: Reaktionsmuster für EGFR im Stroma

Eine fehlende Reaktion für EGFR wurde in 33 Fällen der benignen Tumoren (82,5 %) und eine schwache Reaktion in 2 Fällen (5 %) beobachtet. In 5 Fällen (12,5 %) war die Reaktivität mäßig (Score 2).

Bei den borderline Tumoren fand man in 6 Fällen (60 %) keine Reaktion. Eine schwache Reaktion ließ sich in 3 Fällen (30 %) beobachten. In einem Fall (10 %) war die Reaktion stark positiv (Score 3).

In 3 Fällen maligner Tumoren (37,5 %) wurde keine Reaktion beobachtet. Eine mäßige Reaktion (Score 2) zeigten 4 von 8 Fällen (50 %), eine stark positive Reaktion war in einem Fall (12,5 %) nachweisbar.

### 3.2.9. EGFR (im Epithel)

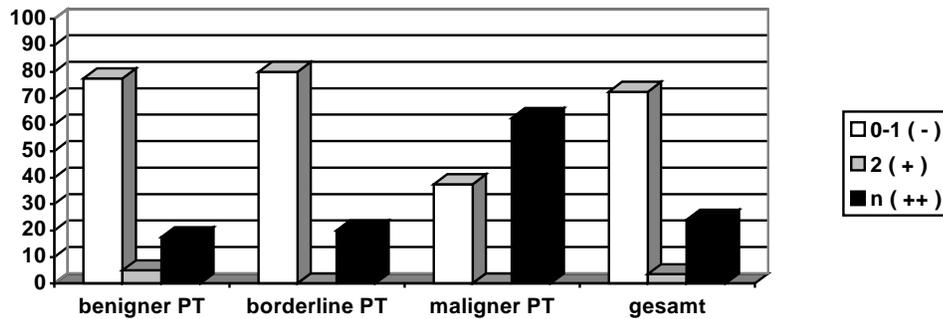


Abb. 10: Reaktionsmuster für EGFR im Epithel

21 benigne Tumoren (52,5 %) zeigten keine Reaktion, eine geringe Expression (Score 1) lag in 10 Fällen (25 %) vor. In 2 Fällen (5 %) war eine mäßige Expression vorhanden. Eine starke Expression (Score n) wurde in 7 Fällen (17,5 %) beobachtet.

Bei den borderline Tumoren ließ sich folgendes Verteilungsmuster erkennen: fehlende Reaktion in 4 Tumoren (40 %), geringe Reaktion in 4 Tumoren (40 %) und starke Expression in 2 Fällen (20 %).

Bei den malignen Tumoren zeigten 3 Fälle (37,5 %) eine fehlende und 5 Fälle (62,5 %) eine sehr starke Expression (Score n).

### 3.2.10. p16

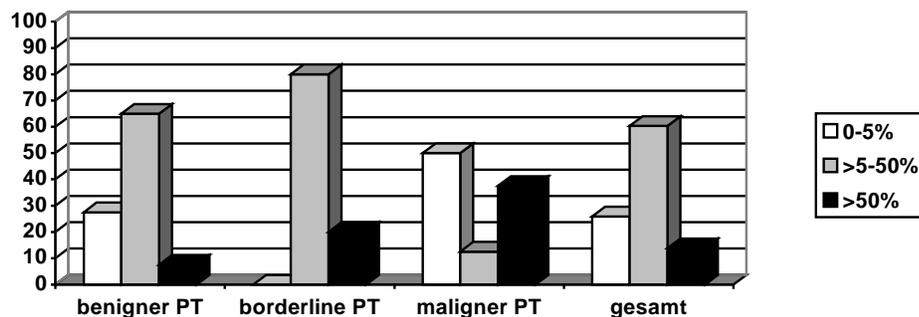


Abb. 11: Reaktionsmuster für p16

In 15 Tumoren (25,9 %) reagierten 0-5 % der Tumorzellen positiv für p16. Eine Anfärbung von 5-50 % der Zellen war in 35 Fällen (60,3 %), eine Anfärbung in mehr als 50 % der Zellen war bei 8 Tumoren (13,8 %) nachweisbar.

Folgendes Reaktionsmuster zeigte sich bei den benignen Tumoren: 0-5 % positive Zellen in 11 Fällen (27,5 %), 5-50 % positive Zellen in 26 Fällen (65 %) und über 50 % positive Zellen in 3 Fällen (7,5 %).

Bei den borderline Tumoren zeigten 8 Fälle (8%) eine Immunreaktion in 5-50 % und 2 Fälle (20 %) eine Reaktion in mehr als 50 % der Zellen.

Bei 4 malignen Tumoren (50 %) ergab sich eine positive Immunreaktion in 0-5 % der Zellen. Eine positive Reaktion von 5-50 % der Zellen war in einem Fall (12,5 %) zu beobachten. 3 Tumoren (37,5 %) reagierten positiv in mehr als 50 % ihrer Zellen.

### 3.2.11. p21

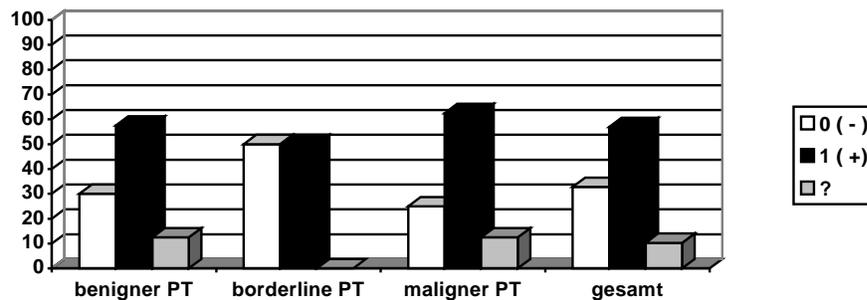


Abb. 12: Reaktionsmuster für p21

12 von 40 Fällen (30 %) der benignen phylloiden Tumoren zeigten ein negatives Ergebnis. In 23 Fällen (57,5 %) konnte eine positive Reaktion nachgewiesen werden. In 5 Fällen (12,5 %) konnte die Expression nicht analysiert werden.

In 5 Fällen (50 %) der borderline Tumoren konnte keine und in weiteren 5 Fällen (50 %) eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden.

Unter den 8 Fällen der malignen Tumore waren 2 Fälle (25 %) negativ, 5 Fälle (62,5 %) positiv, in einem Fall (12,5%) konnte die Reaktion nicht analysiert werden.

### 3.2.12. p27

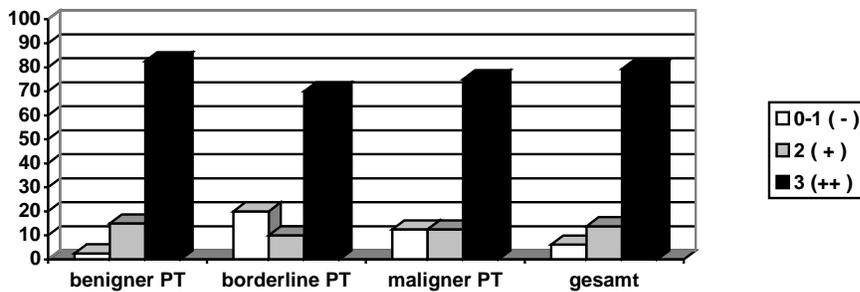


Abb. 13: Reaktionsmuster für p27

In einem Fall (2,5 %) der benignen Tumoren zeigte sich eine geringe p27-Expression. In 6 Fällen (15 %) konnte eine mäßige und in 33 Fällen (82,5) eine intensive Expression nachgewiesen werden. Bei den borderline Tumoren fehlte die Expression in einem Fall (10 %). Eine geringe Expression konnte in einem weiteren Fall (10 %) und eine mäßige Reaktion (Score 2) in einem Fall (10 %) nachgewiesen werden. In 7 Fällen (70 %) zeigte sich eine intensive Anfärbung. Unter den malignen Tumoren konnte 1 Fall (12,5 %) als gering positiv, 1 weiterer Fall (12,5 %) als mäßig positiv (Score 2) und 6 Fälle (75 %) als stark positiv bewertet werden.

### 3.2.13. Cyklin A

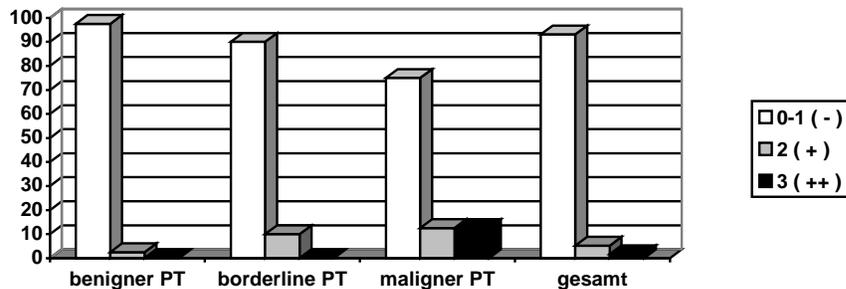


Abb. 14: Reaktionsmuster für Cyklin A

Die benignen Tumoren zeigten in 34 von 40 Fällen (85 %) keine Immunreaktivität auf den Antikörper Cyklin A. Eine schwache Reaktion ergab sich in 5 Fällen (12,5 %), eine mäßige Reaktion war in einem Fall (2,5 %) nachweisbar.

Bei den borderline Tumoren zeigte sich für 5 der 10 Fälle (50 %) keine Reaktion auf den Antikörper. In 4 Fällen (40 %) war eine schwache und in einem Fall (10 %) eine mäßige Reaktion nachweisbar.

Die malignen Tumoren ließen in einem Fall (12,5 %) keine Reaktion, in 5 Fällen (62,5 %) eine schwache, in einem Fall (12,5 %) eine mäßige und in einem Fall (12,5 %) eine intensive Anfärbung erkennen.

### 3.2.14. Cyklin D1

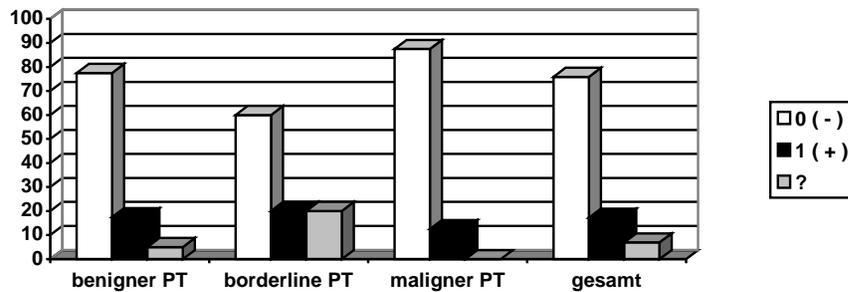


Abb. 15: Reaktionsmuster für Cyklin D1

Die benignen Tumoren reagierten in 31 von 40 Fällen (77,5 %) negativ auf den Antikörper Cyklin D1. In 7 Fällen (17,5 %) reagierten sie positiv, in 2 Fällen (5 %) ließ sich die Reaktivität nicht analysieren.

Von 10 borderline Tumoren waren 6 Fälle (60 %) negativ, 2 Fälle (20 %) positiv.

In 2 (20 %) Fällen ließ sich die Reaktivität nicht eindeutig klären.

7 von 8 malignen Tumoren (87,5 %) zeigten eine negative und nur 1 Fall (12,5 %) eine positive Reaktion für Cyklin D1.

### 3.2.15. Cyklin E

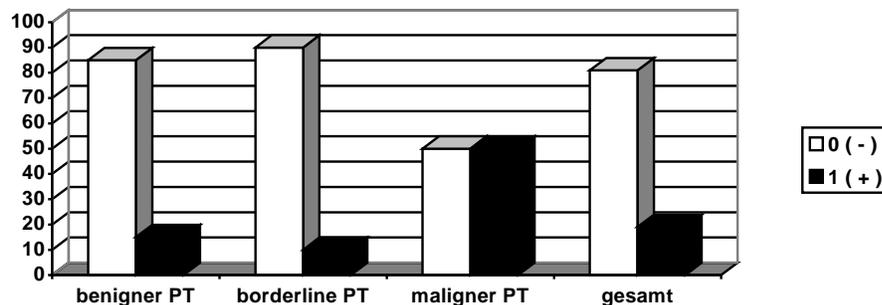


Abb. 16: Reaktionsmuster für Cyklin E

Für Cyklin E waren die benignen Tumoren in 34 von 40 Fällen (85 %) negativ und in 6 Fällen (15 %) positiv.

Die borderline Tumoren zeigten in 9 Fällen (90 %) keine und in einem Fall (10 %) eine positive Reaktion.

4 von 8 malignen Tumoren (50 %) zeigten eine positive, die 4 weiteren Fälle (50 %) eine negative Reaktion.

### 3.2.16. c-Myc (im Epithel)

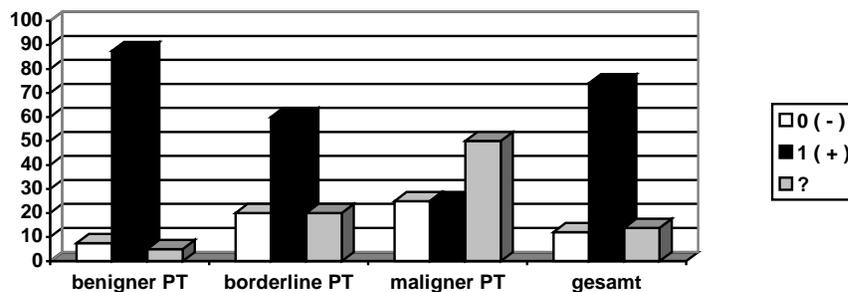


Abb. 17: Reaktionsmuster für c-Myc im Epithel

Bei 3 der benignen Tumoren (7,5 %) zeigte sich eine negative Reaktion für c-Myc, 35 Fälle (87,5 %) waren positiv. In einem Fall (2,5 %) ließ sich die Immunreaktivität nicht analysieren.

Von 10 borderline Tumoren zeigten 2 Fälle (20 %) keine Immunreaktivität und 6 Fälle (60 %) eine positive Reaktion. In 2 Fällen (20 %) konnte die Reaktion nicht analysiert werden.

Bei den 10 malignen Tumoren waren 2 (25 %) negativ, 2 (25 %) positiv und 4 (50%) nicht eindeutig analysierbar.

### 3.2.17. c-Myc (im Stroma)

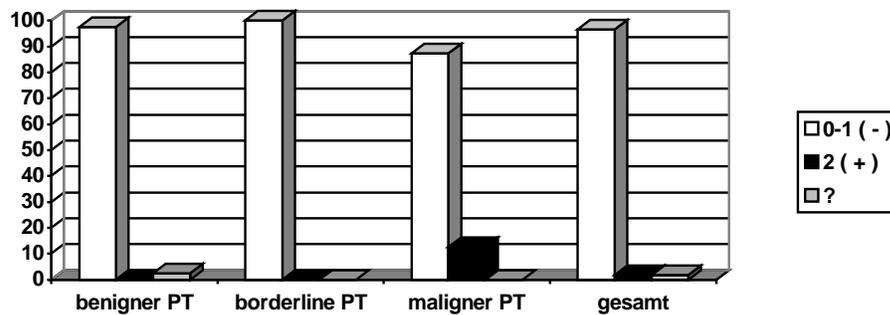


Abb. 18: Reaktionsmuster für c-Myc im Stroma

In 25 Fällen (62,5 %) der benignen Tumoren zeigte sich keine Reaktivität für c-Myc. In 14 Fällen (35 %) war eine schwache Reaktion zu beobachten. In einem Fall (2,5 %) ließ sich die Reaktivität nicht eindeutig klären.

Die Immunreaktion war in 6 Fällen (60 %) der borderline Tumoren nicht vorhanden und in 4 Fällen (40 %) nur schwach vorhanden.

Unter den malignen Tumoren ergab sich in 6 Fällen (75 %) keine Reaktion, in einem Fall (12,5 %) eine schwache und in einem Fall (12,5 %) eine mäßige Reaktion.

### 3.3. Korrelationen

Die folgende Korrelationstabelle (Tab. 5) zeigt die Korrelationen zwischen den verschiedenen Immunreaktionen auf den jeweiligen Antikörper. Die Korrelationswerte wurden nach KENDALL berechnet. Die signifikanten Korrelationen befinden sich auf dem 0,01 und 0,05 Niveau und sind mit dem Buchstaben „s.“, die nichtsignifikanten mit „n.s.“ verzeichnet.

	c-Kit	SMA	S100	Desmin	EMA	p53	MIB1	EGFR	p16	p21	p27	CyklinA	CyklinD	CyklinE	Malignität
<b>c-Kit</b>	1	n.s.	.	n.s.	s.	s.	s.	s.	n.s.	s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.	s.
<b>SMA</b>	n.s.	1	.	s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.							
<b>S100</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>Desmin</b>	n.s.	s.	.	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.							
<b>EMA</b>	s.	n.s.	.	n.s.	1	n.s.	s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>p53</b>	s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	1	s.	s.	n.s.	s.	n.s.	s.	n.s.	s.	s.
<b>MIB1</b>	s.	n.s.	.	n.s.	s.	s.	1	s.	n.s.	s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.	s.
<b>EGFR</b>	s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	s.	s.	1	n.s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	s.	s.
<b>p16</b>	n.s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>p21</b>	s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	s.	s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>p27</b>	n.s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Cyklin A</b>	s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	s.	s.	s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	s.
<b>Cyklin D</b>	n.s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.
<b>Cyklin E</b>	n.s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	s.
<b>Malignität</b>	s.	n.s.	.	n.s.	n.s.	s.	s.	s.	n.s.	n.s.	n.s.	s.	n.s.	s.	1

Tab. 5: Die Korrelationstabelle zeigt signifikante und nichtsignifikante Korrelationen

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen Korrelationen zwischen der Expression verschiedener Antikörper in phylloiden Tumoren und dem Malignitätsgrad des phylloiden Tumors. Weiterhin konnten Korrelationen zwischen der Expression einzelner Antikörper in phylloiden Tumoren nachgewiesen werden. Von den verwendeten Antikörpern sind einige schon in anderen Studien untersucht worden, zu einigen Antikörper gibt es jedoch nur wenige oder gar keine vergleichbaren Untersuchungen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen detailliert diskutiert und mit den Ergebnissen aus der Literatur verglichen soweit diese existieren.

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Antikörpern wurde eine negative Immunreaktion gegen S100 bei allen Tumorgraden nachgewiesen. Dieses Ergebnis stimmt weitgehend mit den in der Literatur gefundenen Ergebnissen überein [3, 4, 45]. Die Verwendung von S100-Antikörpern ist somit für phylloide Tumoren als diagnostischer oder prognostischer Marker nicht geeignet.

Die Antikörper gegen SMA, Desmin, EMA, p16, p21, p27, c-Myc und Cyklin D zeigten keine signifikanten Korrelationen mit der Malignität phylloider Tumoren. Es konnten bei diesen Antikörpern lediglich fehlende, schwache bzw. mäßige und nur in seltenen Fällen starke (Score 3) Immunreaktivitäten nachgewiesen werden. Obwohl bezüglich p27 in ca. 75% der Fälle intensive Immunreaktivitäten festgestellt wurden, zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation mit der Malignität des phylloiden Tumors.

Die fehlenden bzw. schwach bis mäßig positiven Immunreaktionen gegenüber SMA, die bei allen drei Subtypen nachgewiesen wurden, bestätigen die Ergebnisse der bereits erwähnten Studien [6, 61]. Bemerkenswert ist, dass in der vorliegenden Studie bei den borderline Tumoren im Gegensatz zu den benignen und malignen Tumoren eine vollständig negative Reaktion auf SMA fehlte. Die SMA-Reaktivität zeigte lediglich mit Desmin eine signifikante Korrelation. Die Ergebnisse für Desmin unterschieden sich kaum von den in der Literatur vorhandenen Ergebnissen [3, 4]. Es kann jedoch kein Vergleich hinsichtlich der Korrelation von Desmin und SMA miteinander und mit anderen Antikörpern angestellt werden, da vergleichbare Angaben in der Literatur fehlen. Obwohl unter acht malignen Tumoren nur ein Fall eine schwach-positive Reaktion gegen Desmin zeigte, konnte keine signifikante negative Korrelation

mit dem Malignitätsgrad nachgewiesen werden. Beim Reaktionsmuster der borderline Tumoren hinsichtlich Desmin fällt auf, dass eine fehlende Reaktion weniger häufig (70%) war als bei den benignen und malignen Tumoren (jeweils 87,5%).

In 93% der Fälle fehlte eine EMA-Expression. Dieses Ergebnis zeigt eine weitgehende Übereinstimmung mit der bei Aranda et al. [3] angegebenen vollständigen Negativität. Zu erwähnen ist, dass die borderline Tumoren verglichen mit den benignen und malignen phylloiden Tumoren überhaupt keine Reaktion für EMA zeigten. In unserer Studie konnten außer der Korrelation von p53 mit der Malignität die anderen von Kuijper et al. (2005) erwähnten Korrelationen[44] nicht bestätigt werden: Die erwähnten Korrelationen von p16 und p21 mit dem Faktor Malignität stellten sich als nicht signifikant heraus. Die beiden berichteten Korrelationen zwischen p16 und p21 sowie zwischen p16 und p53 waren ebenfalls nicht signifikant. p16, p27 und Cyklin D wiesen gar keine signifikanten Korrelationen mit anderen Antikörpern und mit dem Faktor Malignität auf. Bei p21 ergaben sich signifikante Korrelationen mit MIB1, p53 und c-Kit.

In der Literatur fehlen Untersuchungsergebnisse zu Immunreaktionen von p27 in phylloiden Tumoren gänzlich. Es liegen jedoch Berichte über andere Tumoren der Brust vor, bei denen die p27-Expression untersucht wurde. In der Studie von Moriya et al. (2000), die 43 apokrine Tumoren untersuchten, stellten die Autoren keine Korrelationen zwischen p21 oder p27 mit den histologischen Parametern fest [62].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der erwähnten Studie zeigten sich in unseren Untersuchungen ebenfalls keine signifikanten Korrelationen zwischen den Immunreaktionen von p21 und p27 mit dem Faktor Malignität. Weiterhin bestanden keine signifikanten Korrelationen zwischen p27 und den anderen untersuchten Expressionen.

Auch ergab die Expression von c-Myc In unserer Studie ein anderes Ergebnis als bei Sawyer et al. [79]. Diese Autoren wiesen eine c-Myc-Positivität in 90% der untersuchten malignen phylloiden Tumoren nach und nahmen an, dass die erhöhte Expression von c-Myc zur Proliferation der Stromazellen in malignen phylloiden Tumoren führen kann. In unserer Studie lag die Expression von c-Myc im Stroma der benignen, borderline und malignen Tumoren bei 35%, 40% und 25%, wobei in allen Fällen nur eine schwache Reaktion nachgewiesen

werden konnte. In nur einem malignen Tumor fiel die Reaktion mäßig aus. Eine stark erhöhte stromale c-Myc-Reaktion war in keinem Fall festzustellen. Dieses Ergebnis bedeutet, dass ein Zusammenhang zwischen der c-Myc-Expression und der Proliferation der Stromazellen in malignen phylloiden Tumoren weniger wahrscheinlich sein könnte. Die Anzahl der benignen und borderline Tumoren, deren Epithelzellen für c-Myc positiv reagierten, war deutlich höher als die Anzahl der benignen und borderline Tumoren, die eine positive stromale Immunreaktion zeigten. Dementsprechend kann vermutet werden, dass bei phylloiden Tumoren die Expression von c-Myc in Epithelzellen eine größere Rolle als in Stromazellen spielen könnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung der oben genannten Antikörper (S100, SMA, Desmin, EMA, p16, p21, p27, c-Myc und Cyklin D) bei phylloiden Tumoren keine wichtige Rolle im Hinblick auf Diagnose und Prognose spielen können.

Die anderen untersuchten Antikörper zeigten hingegen signifikante Korrelationen mit dem Faktor Malignität und in bestimmten Fällen auch untereinander. Hinsichtlich der Malignität stellte sich p53 mit dem höchsten Korrelationswert als der wichtigste Marker heraus. Je nach Korrelationskoeffizient folgen c-Kit, EGFR, MIB1, Cyklin E und Cyklin A.

Obwohl Cyklin A in unserer Studie zu den Proteinen gehört, deren stromale Expression mit der Malignität des Tumors korreliert, ordnet sich die von uns errechnete Korrelation von Cyklin A mit dem Faktor Malignität unter den korrelierenden Expressionen an letzter Stelle ein. Mit diesem Ergebnis konnte Cyklin A nicht als bester Marker zur Unterscheidung des Tumorgades phylloider Tumoren bestätigt werden wie von Kuijper et al. [44] angenommen wurde. Trotzdem kann jedoch eine gewisse diagnostische Bedeutung von Cyklin A in Betracht gezogen werden. Unter den korrelierenden Expressionen zeigte Cyklin A die höchste Korrelation mit p53 und signifikante Korrelationen mit c-Kit, MIB1 und EGFR.

Für Cyklin E zeigte sich in der vorliegenden Studie eine signifikante Korrelation mit dem Faktor Malignität, die im Vergleich mit Cyklin A noch höher ausfiel. Cyklin E korrelierte ebenfalls mit p53 und EGFR. In diesen beiden Fällen lagen jedoch die Korrelationskoeffizienten niedriger als die der Korrelationen von Cyklin A mit p53 und EGFR. Folglich kann Cyklin E unter den Cyklinen als Unterscheidungsmarker der beste Korrelationskoeffizient zugeordnet werden. In

der Literatur konnten keine Studien gefunden werden, die Ergebnisse über die Cyklin E-Expression in phylloiden Tumoren beschreiben.

Bei allen untersuchten Fällen konnten wir eine mehr oder weniger starke positive Reaktion auf MIB1 beobachten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Catalica et al. (2001) nicht überein [32]. Diese konnten keine MIB1-Positivität bei den benignen phylloiden Tumoren feststellen. Das Verteilungsmuster bei der Immunreaktivität - starke MIB1-Expression in 75% der malignen, 50% der borderline und 17,5% der benignen phylloiden Tumoren - bestätigt die bereits veröffentlichten Ergebnisse hinsichtlich der positiven Korrelation zwischen erhöhter MIB1-Expression und Malignität des Tumors.

Eine ausgeprägte MIB1-Expression wurde nicht nur in den malignen, sondern auch in einigen Fällen der benignen und borderline Tumoren beobachtet. Eine deutliche p53-Expression hingegen fehlte in den benignen und malignen phylloiden Tumoren gänzlich. Diese Tatsache zeigt, dass die MIB1-Expression trotz ihrer signifikanten Korrelation mit der Malignität ( $P = 0,008$ ) bei der Unterscheidung maligner phylloider Tumoren nicht so hilfreich ist wie p53 ( $P < 0.0001$ ).

Weiterhin stellte sich heraus, dass die Expression von MIB1 am stärksten mit der von p53 korreliert ( $P < 0,0001$ ). Dieses Ergebnis stimmt mit den Literaturergebnissen überein, welche eine signifikante Assoziation zwischen diesen beiden Antikörpern bei malignen phylloiden Tumoren beschreiben [32]. MIB1 zeigt außerdem signifikante Korrelationen mit Cyklin A ( $P = 0,001$ ), c-Kit ( $P = 0,001$ ), EGFR ( $P = 0,002$ ), p21 ( $P = 0,007$ ) und EMA ( $P = 0,031$ ). Zu diesen Ergebnissen liegen in der Literatur keine Informationen vor, die einen Vergleich mit den erhobenen Daten erlauben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bezüglich c-Kit stimmen grundsätzlich mit den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen überein [16, 19, 79, 92]. Eine erhöhte c-Kit-Expression konnte in malignen Tumoren deutlich häufiger nachgewiesen werden als in benignen Tumoren (50% bzw. 10%). Diese Ergebnisse weisen auf eine signifikante Korrelation zwischen der c-Kit-Expression und der Malignität ( $P = 0,001$ ) hin. Nach p53 hat die c-Kit-Expression den höchsten Korrelationswert mit dem Malignitätsgrad. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich hierbei um einen Nachweis für die Beteiligung der c-Kit-Rezeptor-Tyrosinkinase in der Pathogenese phylloider

Tumoren bzw. an deren Wachstum handelt wie von Tse et al. (2004) und Sawyer et al. (2003) bereits angenommen wurde [79, 92].

Ebenfalls gelang in der vorliegenden Untersuchung der Nachweis signifikanter Korrelationen zwischen c-Kit und den folgenden Antikörpern: p53 ( $P < 0,0001$ ), Cyklin A ( $P < 0,0001$ ), EMA ( $P < 0,0001$ ), MIB1 ( $P = 0,001$ ), EGFR ( $P = 0,007$ ) und p21 ( $P = 0,033$ ). Bemerkenswert hierbei ist, dass unter diesen korrelierenden Antikörpern EMA und p21 selbst keine signifikanten Korrelationen mit dem Faktor Malignität aufweisen. In der Literatur konnten zu diesen Korrelationen keine vergleichbaren Ergebnisse gefunden werden.

Wie bei fast allen anderen Studien [30, 39, 43, 59, 94] sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Studie ebenfalls dafür, dass eine sehr signifikante positive Korrelation zwischen der p53-Expression und der Malignität besteht (In unserer Studie:  $P < 0,0001$ ). Das vollständige Fehlen einer starken p53-Expression (Score 3) bei den untersuchten benignen und borderline Tumoren und die starke Expression von p53 in 50% der malignen Tumoren zeigen, dass eine starke p53-Expression mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen phylloiden Tumor mit einem hohen Malignitätsgrad schließen lässt. Eine negative, schwache oder mäßige Expression von p53 kann Malignität aber nicht ausschließen, da sich in der anderen Hälfte der malignen Tumoren eine negative, teils mäßige p53-Expression zeigte. Diese Ergebnisse bestätigen die Schlussfolgerung von Tse et al. (2002), dass im Gegensatz zu einer diffusen, starken Expression von p53, die als „mildes Zeichen“ für einen malignen phylloiden Tumor verwendet werden kann, eine negative oder schwache Expression für die Bewertung der Differenzierung des Tumors wenig wertvoll ist [90]. Da in unserer Studie kein benigner oder borderline Tumor eine starke p53-Expression zeigte, lässt sich jedoch vermuten, dass eine starke p53-Expression eine durchaus gewichtige Rolle spielt und nicht nur als „mildes Zeichen“ für einen malignen phylloiden Tumor gewertet werden kann. Große Beachtung sollte der Tatsache geschenkt werden, dass p53 im Vergleich zu den anderen untersuchten Antikörpern die höchste Korrelation mit der Malignität des phylloiden Tumors aufwies.

Hinsichtlich einer signifikanten Korrelation zwischen der p53- und MIB1-Expression stimmt das Ergebnis dieser Untersuchungen ( $P < 0,0001$ ) grundsätzlich mit den Literaturergebnissen überein [32]. Weiterhin wurden signifikante Korrelationen der p53-Expression mit Cyklin A ( $P < 0,0001$ ), c-Kit ( $P$

< 0,0001), EGFR (P < 0,001) und p21 (P = 0,033) nachgewiesen. Über diese Korrelationen sind bisher keine Ergebnisse in der Literatur veröffentlicht worden. Die in der Studie von Kuijper et al. [44] als signifikant beschriebene Korrelation von p53 mit p16 konnte in der vorliegenden Studie nicht als signifikant bestätigt werden.

In unserer Studie wiesen wir eine EGFR-Expression sowohl in den epithelialen als auch in den Stromazellen aller drei Malignitätsgrade phylloider Tumoren nach. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Witte et al (1999), die keine EGFR-Expression in den Epithel- und Stromazellen phylloider Tumoren fanden [98]. Sie sind jedoch im Einklang mit den Ergebnissen von Suo et al. (2000), die EGFR-Expression nicht nur in Epithelzellen, sondern auch in Mesenchymzellen benigner, borderline sowie maligner phylloider Tumoren nachwies und darüber hinaus eine signifikante Korrelation (P = 0,009) zwischen einer erhöhten Expression von EGFR und der Malignität des phylloiden Tumors feststellten [87]. Die Korrelation von EGFR mit der Malignität fiel bei unserer Studie noch höher aus (P = 0,001). Damit konnte EGFR hinsichtlich der Korrelation mit dem Faktor Malignität an dritter Stelle nach p53 (P < 0,0001) und c-Kit (P < 0,001) eingeordnet werden. Obwohl dieses Ergebnis die Verwendung der EGFR-Expression als einen relativ aussagekräftigen Parameter für die Unterscheidung von malignen phylloiden Tumoren bestätigt, bedeutet es jedoch nicht, dass alle malignen Tumoren eine erhöhte EGFR-Expression aufweisen oder alle Tumoren mit einer erhöhten EGFR-Expression maligne sind. Jeweils 5 von 8 der malignen phylloiden Tumoren zeigten in den Epithel- und Stromazellen eine erhöhte Expression von EGFR wobei diese nur in 3 Fällen gleichzeitig in Epithel und Stroma erhöht war. Bei sechs weiteren Tumoren unter den 50 benignen und borderline Tumoren konnte ebenfalls eine erhöhte EGFR-Expression in den Stromazellen ermittelt werden. Hinsichtlich der Epithelzellen zeigten insgesamt 16 Tumoren, davon 5 von 8 der malignen, eine erhöhte Expression von EGFR. Dieses bedeutet, dass die epitheliale EGFR-Überexpression bei benignen und borderline Tumoren im Vergleich zur Stromazellen-Überexpression fast doppelt so häufig vorkommt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Stromazellen-Überexpression von EGFR deutlich aussagekräftiger ist als die epitheliale.

Bemerkenswert ist, dass es unter den elf benignen und borderline Tumoren mit erhöhter epithelialer EGFR-Expression keinen Tumor gibt, der gleichzeitig eine

stromale Expression von EGFR zeigt. Alle drei Tumoren bei denen die Expression von EGFR sowohl im Stroma als auch im Epithel erhöht war, gehörten zu den malignen Tumoren. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die gleichzeitige Überexpression von EGFR im Stroma und im Epithel diagnostisch aussagekräftiger sein könnte als die alleinige Überexpression im Stroma.

Folgender weiterer Zusammenhang ist bei der stark erhöhten epithelialen EGFR-Expression zu erkennen: nicht nur bei den malignen, sondern bei allen phylloiden Tumoren, die eine sehr starke epitheliale Überexpression von EGFR (= n) zeigen, fallen die Gesamtgenamplifikationen (FISH) des EGFR-Gens im Stroma negativ aus. Dieses Ergebnis ist unabhängig davon, ob diese Tumoren im Stroma erhöhte EGFR-Expressionen zeigen oder nicht.

Ein weiterer Diskussionsaspekt ist die Analyse von Proteinexpressionsmustern, die mit der EGFR-Expression assoziiert sind. Hierbei geht es um die Frage, ob Aussagen über mögliche EGFR-abhängige Pathways in phylloiden Tumoren gemacht werden können.

Die Expressionen von EGFR in phylloiden Tumoren zeigen signifikante Korrelationen mit den Expressionen einiger anderer Antikörper. Am stärksten korreliert EGFR unter den untersuchten Antikörpern mit p53. Unter den elf Tumoren mit erhöhter stromaler EGFR-Expression (davon fünf maligne) zeigten fünf Tumoren eine erhöhte p53-Expression, wobei es sich hier in vier Fällen um maligne phylloide Tumoren handelt. In den sechs übrigen Fällen zeigt sich eine erhöhte EGFR-Expression, jedoch keine oder schwache p53-Expression, wobei hier nur ein Tumor zu den malignen zählte. Obwohl diese Ergebnisse eine signifikante Korrelation beider Antikörper miteinander und mit dem Faktor Malignität bestätigen, ist eine kausale Beziehung zwischen den beiden Expressionen nicht erkennbar.

Die EGFR-Expression korrelierte an zweiter Stelle mit MIB1 ( $P = 0.002$ ). Unter den elf Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression zeigte sich in neun Fällen eine erhöhte MIB1-Expression. Es konnte nachgewiesen werden, dass die malignen Tumoren eine deutlich stärkere MIB1-Expression als die benignen aufweisen. Obwohl neun von elf Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression gleichzeitig eine erhöhte MIB1-Expression zeigten, konnten unter 22 Tumoren mit erhöhter MIB1-Expression nur neun Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist auf eine mögliche kausale

Beziehung hin: die Überexpression von MIB1 könnte z.B. durch eine Überexpression von EGFR entstanden sein, wobei hier die Gesamtgenamplifikation von EGFR (FISH) keine bedeutende Rolle spielt.

Unter 58 untersuchten Tumoren zeigten vier eine erhöhte Expression von Cyklin A, von denen drei Tumoren gleichzeitig eine erhöhte Expression von EGFR aufwiesen. Zwei von diesen drei Tumoren sind maligne Tumoren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Überexpressionen von EGFR und Cyklin A miteinander ( $P = 0,003$ ) und mit dem Faktor Malignität besteht. Obwohl die Überexpression von Cyklin A in 75% der Fälle mit einer Überexpression von EGFR einhergeht, tritt die EGFR-Überexpression nur in 27% der Fälle gleichzeitig mit der Überexpression von Cyklin A auf. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Überexpression von Cyklin A unter dem Einfluss der EGFR-Überexpression bzw. in Wechselwirkung mit dieser entstanden sein könnte, wobei im Falle nicht aufgetretener Cyklin A-Überexpressionen der Zeit-Faktor oder andere Ko-Faktoren eine Rolle gespielt haben müssen.

Trotz der signifikanten Korrelation zwischen der EGFR- und c-Kit-Expression ( $p = 0,007$ ) tritt die Ko-Expression dieser beiden Antigene deutlich geringer auf als diejenige von EGFR und Cyklin A. Unter 58 untersuchten Tumoren zeigte sich in acht Fällen eine erhöhte Expression von c-Kit. Dabei waren 50% der malignen und 8% der nicht-malignen betroffen. Vier dieser Tumoren (50%) gehören zu den elf Tumoren, die eine erhöhte EGFR-Expression aufweisen, wobei diese Ko-Expression in drei Fällen die malignen Tumoren betrifft. Obwohl diese Ergebnisse signifikante Korrelationen zwischen EGFR- und c-Kit-Überexpressionen miteinander und mit dem Faktor Malignität bestätigen, reichen sie nicht aus, eine kausale Beziehung zwischen diesen beiden Überexpressionen herleiten zu können. Denkbar wäre jedoch, dass diese beiden Expressionen in einer bestimmten Wechselwirkung zueinander stehen.

Ein ähnliches Verhältnis kann man zwischen den Expressionen von EGFR und Cyklin E beobachten. Nach unseren Berechnungen existiert eine signifikante Korrelation zwischen der EGFR-Überexpression und der Positivität von Cyklin E ( $P = 0,014$ ). Es gibt jeweils elf Tumoren mit EGFR-Überexpression und einer Positivität für Cyklin E von denen fünf Tumoren, davon zwei maligne für Cyklin E positiv sind und gleichzeitig EGFR in erhöhtem Maße exprimieren. Hierbei spielt die Gesamtgenamplifikation von EGFR (FISH) keine Rolle. Es ist jedoch

bemerkenswert, dass vier dieser Ko-Expressionen in Tumoren stattfindet, in denen die Gendosis amplifiziert ist. Trotz der signifikanten Korrelation zwischen diesen beiden Expressionen kann hier eine eindeutige kausale Beziehung im Sinne eines EGFR-Pathways nicht festgestellt werden.

Im Hinblick auf die Untersuchung von Kersting et. al [38] hinsichtlich der vollständigen Abwesenheit der EGFR-Expression bei Fibroadenomen im Vergleich zu phylloiden Tumoren kann man annehmen, dass die EGFR-Überexpression eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese, dem Wachstum und der Malignität dieser Tumorart spielt. Diese Rolle genau zu finden und definieren ist jedoch durch eine alleinige Analyse der mit der EGFR-Expression assoziierten Proteinexpressionsmuster nicht möglich. Trotz der oben erwähnten signifikanten Korrelationen der Proteinexpressionen wird eine direkte Abhängigkeit zwischen der EGFR-Überexpression und anderen Expressionen nicht erkennbar. Es kann also nicht eindeutig bewiesen werden, dass die genannten Antigen-Expressionen in einer eindeutigen kausalen Beziehung zur EGFR-Expression stehen, so dass mögliche EGFR-Pathways hieraus hergeleitet werden könnten. Im Falle von MIB1 und Cyklin A kann nur vermutet werden, dass EGFR-Pathways existieren könnten. Um diese Zusammenhänge genauer zu analysieren und mögliche EGFR-abhängige Pathways nachzuweisen, bedarf es weitergehender Untersuchungen, die sich nicht nur mit den Proteinexpressionen, sondern auch mit den verschiedenen Gesamtgenamplifikationen und Gendosen befassen.

## 5. Anhang

### 5.1. Geräte

- Array-Instrument: (Beecher Instrument, Silver Spring, Maryland, USA)
- Mikrotom
- UV-Licht-Lampe
- Mikroskop
- Kühlschrank
- Brutschrank
- Spülmaschine mit Aqua dest.-Aufbereitung
- Tiefkühlschrank
- ph-Meter
- Magnetrührer
- Abzug
- Autoklav
- Dampfgarer (steamer) (Firma Braun)
- Autostainer-Gerät (DakoCytomation-Autostainer)

### 5.2. Zubehör

- Paraffin
- Beschichtete Objektträger (superfrost plus, Firma R. Langenbrinck)
- Plastikblockhalter
- Feuchte Kammer
- Kolbenhubpipetten (Eppendorfer Reference)
- Reaktionsgefäße
- Reaktionsgefäßständer
- Reagenzröhrchen 5 und 10 ml
- Objektträgerschalen
- PAP-Pen
- Glasküvetten
- Messzylinder
- Waagschalen
- Spritzflasche

- Spezielles Klebeband (zum Übertragen der Nadelbiopsien auf den TMA-Schnitt)
- Zange (zur Entfernung des Klebebands von den TMA-Schnitten)
- Alufolie
- Plastikküvetten

### **5.3. Reagenzien**

- NaCl
- Ethylalkohol
- Diethylether
- Methanol
- Aqua dest.
- Hydrogenperoxidase
- Zitronensäuremonohydrat
- Natronlauge (zur pH-Einstellung)
- Wasserstoffperoxid
- Antikörperverdünnungsmedium
- Silan
- Tris(-hydroxymethyl)amino-methan (TRIS)
- TRIS-HCl
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
- TPC-Lösungsmittel
- Wasserstoffperoxid
- Xylol
- Primärantikörper
- biotinylierte Kaninchen-Antimäus-Antikörper als Brückenantikörper bzw. Sekundärantikörper (DAKO)
- Avidin-Biotin-Komplex (DAKO)
- Streptavidin-Enzymkonjugat (DAKO)
- Diaminobenzidin
- DAKO Red
- Levamisol (Levamisolhydrochlorid)
- ChemMate™-Detection Kit (DAKO)
- Hämatoxylin (als Gegenfärbung)

- Eosin
- ChemMate™-Antibody Diluent (Code-Nr. 2022, DAKO)
- Waschpuffer (DakoCytomation, Code-Nr. S 3006)
- Kaisers Glyceringelatine (Eindeckmittel)
- Vitro Clud (Eindeckmittel)

### 5.3.1. Rezepturen der verwendeten Lösungen

- **Citratpuffer (10 mM)**

Stammlösung A: 0,1 M Citronensäure

10,5 g Citronensäuremonohydrat auf 500 ml Aqua dest.  
aufgefüllt

Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat

29,41 g Natriumcitratdihydrat auf 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt

Gebrauchslösung (pH 6,0):

18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B angemischt, pH 6.0  
eingestellt, diese Lösung mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt

- **TRIS-Spülpuffer (0,5 M)**

Stammlösung: 9,0 g TRIS + 68,5 g TRIS-HCl + 87,8 g NaCl in 1000 ml  
Aqua dest. gelöst (pH 7,4 bis 7,6 eingestellt)

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

- **DAB (Diaminobenzidin)-Entwicklungslösung**

6 mg DAB + 10 ml Tris-puffer (0,5 M, pH 7,6) gelöst, 100 ml 3%  
Wasserstoffperoxid dazugegeben

- **Hämatoxylinlösung (MAYERS Hämatoxylin)**

Gebrauchslösung: 1,0 g Hämatoxylin in 1 l Aqua dest. gelöst

0,2 g Na-Jodat

50,0 g Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat)

50,0 g Chloralhydrat

1,0 g krist. Citronensäure

Bei Zugabe der Substanzen wird die Lösung erwärmt, nach dem Abkühlen ist die  
Lösung sofort gebrauchsfertig.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, 2004.
- [2] Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. 2004 Jan; 9 (1): 67-80.
- [3] Aranda FI, Laforga JB, Lopez JI. Phyllodes tumor of the breast. An immunohistochemical study of 28 cases with special attention to the role of myofibroblasts. 1994 May; 190 (5): 474-81.
- [4] Auger M, Hanna W, Kahn HJ. Cystosarcoma phylloides of the breast and its mimics. An immunohistochemical and ultrastructural study. 1989 Nov; 113 (11): 1231-5.
- [5] Barbosa ML, Ribeiro EM, Silva GF, Maciel ME, Lima RS, Cavalli LR, Cavalli IJ. Cytogenetic findings in phyllodes tumor and fibroadenomas of the breast. 2004 Oct 15; 154 (2): 156-9.
- [6] Barth PJ, Ebrahimsade S, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ and benign breast lesions. 2002 Mar; 440 (3): 298-303. Epub 2001 Nov 22.
- [7] Barth PJ, Schenck zu Scheinsberg, T, Ramaswamy A, Moll R. CD34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. 2004 Mar; 444 (3): 231-4.
- [8] Barwijek-Machala M, Reszec J, Baltaziak M, Musiatowicz B, Cylwik J. Proliferating activity in the epithelial and stromal component of fibroadenomas and phyllodes tumours of the breast. 2004; 49 Suppl. 1: 55-7.
- [9] Bergner S.C., Cytokeratin 5/6 als neuer Marker zur immunhistochemischen Differenzierung von atypischen-proliferativen Läsionen der Mamma, Inaugural-Dissertation, Institut für Pathologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2001.
- [10] Bernstein L, Deapan D, Ross RK. The descriptive epidemiology of malignant cystosarcoma phyllodes tumors of the breast. 1993 May 15; 71 (10): 3020-4.
- [11] Birdsall SH, MacLennan KA, Gusterson BA. t(6;12)(q23;q13) and t(10;16)(q22;p11) in a phyllodes tumor of breast. 1992 May; 60 (1): 74-7.

**[12]** Birdsall SH, Summersgill BM, Egan M, Fentiman IS, Gusterson BA, Shipley JM.

Additional copies of 1q in sequential samples from a phyllodes tumor of the breast. 1995 Sep; 83 (2): 111-4.

**[13]** Bogenrieder T, Landthaler M, Stolz W. p16(INK4A)/CDKN2 the „melanoma gene“? Status of research and outlook. 1998 Feb; 49 (2): 91-100.

**[14]** Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R. The function of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. 2000 Apr; 48 (3): 190-202.

**[15]** Böcker, Denk, Heitz, Pathologie. URBAN & FISCHER. München, Jena 2001.

**[16]** Carvalho S, e Silva AO, Milanezi F, Ricardo S, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. c-KIT and PDGFRA in breast phyllodes tumours: overexpression without mutations? 2004 Oct; 57 (10): 1075-9.

**[17]** Charles H. Spruck, Adrian P. L. Smith, Susanna Ekholm Reed, Olle Sangfelt, Jaimie Keck, Heimo Strohmaier, Juan Mendez, Martin Widschwendter, Bruce Stillman, Anders Zetterberg and Steven I. Reed. Regulation of cyclin E by ubiquitin-mediated proteolysis implications in carcinogenesis.

**[18]** Chauhan H, Abraham A, Phillips JRA, Pringle JH, Walker RA and Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. 2003 Apr; 56 (4): 271-6.

**[19]** Chen CM, Chen CJ, Chang CL, Shyu JS, Hsieh HF, Harn HJ. CD34, CD117 and actin expression in phyllodes tumor of the breast. 2000 Dec; 94 (2): 84-91.

**[20]** Chi V. Dang. C-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apophylloider Tumorousis, and Metabolism. 1999 Jan; 19 (1): 1-11.

**[21]** Chiarle R, Pagano M, and Inghirami G. The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer. 2001; 3 (2): 91-94.

**[22]**. Costa ML, Escalera R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. 2004 Dec; 37 (12): 1819 -30.

**[23]** Dacic S, Kounelis S, Kouri E, Jones MW. Immunohistochemical profile of cystosarcoma phyllodes of the breast: a study of 23 cases. 2002 Nov-Dec; 8 (6): 376-81.

**[24]** DakoCytomation, ChemMate™ Detection Kit, Alkaline Phosphatase/ Red, Rabbitt/ Mause, Code-Nr. K 5005. 2<sup>nd</sup> edition.

- [25]** Dunne B, Lee AH, Pinder SE, Bell JA, Ellis IO. An immunohistochemical study of metaplastic spindle cell carcinoma, phyllodes tumor and fibromatosis of the breast. 2003 Oct; 34 (10): 1009-15.
- [26]** Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 protein in the epidermis. 2004 Jul; 123 (1): 23-33.
- [27]** El-Naggar AK, Ro JY, McLemore D, Garnsy L. DNA content and proliferative activity of cystosarcoma phyllodes of the breast. Potential prognostic significance. 1990 Apr; 93 (4): 480-5.
- [28]** El- Rayes BF, Lo Russo PM. Targeting the epidermal growth factor receptor in phyllodes tumor. 2004 Aug 2; 91 (3): 418-24.
- [29]** Emberley ED, Murphy LC, Watson PH. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer. 2004 Aug; 82 (4): 508-15.
- [30]** Feakins RM, Mulcahy HE, Nikols CD, Wells CA. p53 expression in phyllodes tumours is associated with histological features of malignancy but does not predict outcome. 1999 Aug; 35 (2): 162-9.
- [31]** Folker E, Franke, Sigurd Kraus, Claus Eiermann, Katharina Pauls, El-Nasir Lalani and Martin Bergmann. MUK1 in normal and impaired spermatogenesis. 7 (6): 505.
- [32]** Gatalica Z, Finkelstein S, Lucio E, Tawfik O, Palazzo J, Hightower B, Eyzaguirre E. p53 protein expression and gene mutation in phyllodes tumors of the breast. 2001; 197 (3): 183-7.
- [33]** Jee KJ, Gong G, Ahn SH, Park JM, Knuutila S. Gain in 1q is a common abnormality in phyllodes tumours of the breast. 2003; 25 (2): 89-93.
- [34]** Kallioniemi Olli-P, Wagner Urs, Kononen Juha and Sauter Guido. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. Human Molecular Genetics, 2001. Vol. 10, No. 7.
- [35]** Kappeler Andreas, Handout zur Blockveranstaltung "Immunhistochemie", Pathologie-Block WS 2004. Institut für Pathologie der Universität Bern.
- [36]** Karen I Zeller, Anil G Jegga, Bruce J Aronow, Kathryn A O'Donnell and Chi V Dang. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. 2003; 4 (10): R 69.
- [37]** Kausch et al. Ki-67 as a target for anticancer strategies: Bioportfolio; HEALTH AND BIODEVICES PUBLICATIONS, Int J Cancer 2003 Jul 10; 105 (5): 710-6.

- [38] Kersting C, Kuijper A, Schmidt H, Packeisen J, Liedtke C, Tidow N, Gustmann C, Hinrichs B, Wulfing P, Tio J, Boecker W, Diest PV, Brandt B, Buerger H. Amplifications of the epidermal growth factor receptor gene (egfr) are common in phyllodes tumors of the breast and are associated with tumor progression. 2005 Oct 24.
- [39] Kim CJ, Kim WH. Patterns of p53 expression in phyllodes tumors of the breast - an immunohistochemical study. 1993 Oct; 8 (5): 325-8.
- [40] Kleer CG, Giordano TJ, Braun T, Obermann HA. Pathologic, immunohistochemical and molecular features of benign and malignant phyllodes tumors of the breast. 2001 Mar; 14 (3): 185-90.
- [41] Kocova L, Skalova A, Fakan F, Rousarova M. Phyllodes tumour of the breast: immunohistochemical study of 37 tumours using MIB1 antibody. 1998; 194 (2): 97-104.
- [42].Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. 2005 Feb; 41 (2): 105-16.
- [43] Kuenen-Boumeester V, Henzen-Logmans SC, Timmermans MM, van Staveren IL, van Geel A, Peeters HJ, Bonnema J, Berns EM. Altered expression of p53 and its regulated proteins in phyllodes tumours of the breast. 1999 Oct; 189 (2): 169-75.
- [44] Kuijper A, Rob A.I. de Vos, Jaap H. Lagendijk, Elsken van der Wall, Paul J. van Diest. Progressive deregulation of the cell cycle with higher tumor grade in the stroma of breast phyllodes tumors. 2005 May; 123 (5): 690-8.
- [45] Kuroda N, Sugimoto T, Ueda S, Takahashi T, Moriki T, Sonobe H, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, Enzan H. Malignant phyllodes tumor of the breast with expression of osteonectin and vinculin. 2001 Apr; 51 (4): 277-82. PMID: 11350610.
- [46] Lager RL, Charette LA und Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma 2000, 80: 1943-1949.
- [47] Lang BA, Vermousek I, Simickova M, Cernoch M, Nekulova M, Pacovsky Z, Rejthar A. Phylloid breast tumors and three steroid hormone receptors. 1997; 44 (1): 53-7.
- [48] Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Expression of MUK1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases. 2004 Feb; 17 (2): 180-8.

- [49]** Laura Koumas, Terry J. Smith, Steven Feldon, Neil Blumberg and Richard p. Phipps. Thy-1 Expression in Human Fibroblast Subsets Defines Myofibroblastic or Lipofibroblastic Phenotypes. 2003 Oct; 163 (4): 1291-300.
- [50]** Layfield LJ, Hart J, Neuwirth H, Bohman R, Trumbull WE, Giuliano AE. Relation between DNA ploidy and the clinical behavior of phyllodes tumors. 1989 Oct 1; 64 (7): 1486-9.
- [51]** Leong CF, Raudhawati O, Cheong SK, Sivagengi K, Noor Hamidah H. Epithelial membrane antigen (EMA) or MUK1 expression in monocytes and monoblasts. 2003 Oct; 35 (5): 422-7.
- [52]** Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenetic forms of the rezeptor tyrosine kinase kit. 2005; 23 (1): 16-43.
- [53]** Lu YJ, Birdsall S, Osin P, Gusterson B, Shipley J. Phyllodes tumors of the breast analyzed by comparative genomic hybridization and association of increased 1q copy number with stromal overgrowth and recurrence. 1997 Nov; 20 (3): 275-81.
- [54]** Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature), 2004 Oct 1; 322 (4): 1111-22.
- [55]** Mechttersheimer G, Kruger KH, Born IA, Moller P. Antigenic profile of mammary fibroadenoma and cystosarcoma phyllodes. A study using antibodies to estrogen- and progesterone receptors and to a panel of cell surface molecules. 1990 Aug; 186 (4): 427-38.
- [56]** MEDIKAL-Portal: Ki-67-Antigen erlaubt Prognose; Quelle: Journal of Clinical Oncology 2004, Vol. 22, S. 2133.
- [57]** Medinger M, Dreves J. Receptor tyrosine kinase and anticancer therapy. 2005; 11 (9): 1139-49.
- [58]** Merseburger A.S, Horstmann M, Hennenlotter J, Stenzl A, Kuczyk M. Die Tissue Mikroarray-Technik als neues „high throughput-tool“ für den Nachweis differentieller Proteinexpression. J. UROL. UROGYNÄKOL. 3/2003,10 (3): 7-11.
- [59]** Millar EK, Beretov J, Marr P., Sarris M, Clarke RA, Kearsley JH, Lee CS. Malignant phyllodes tumours of the breast display increased stromal p53 protein expression. 1999 Jun; 34 (6): 49-6.
- [60]** Moore T, Lee AH. Expression of CD34 and bcl-2 in phyllodes tumours, fibroadenomas and spindle cell lesions of breast. 2001 Jan; 38 (1): 62-7.

- [61]** Moritani S, Kushima R, Sugihara H, Bamba M, Kobayashi TK, Hattori T. Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. 2002 Apr; 15 (4): 397-405.
- [62]** Moriya T, Sakamoto K, Sasano H, Kawanaka M, Sonoo H, Manabe T, Ito J. Immunohistochemical analysis of Ki-67, p53, p21 and p27 in benign and malignant apocrine lesions of the breast: its correlation to histologic finding in 43 cases. 2000 Jan; 13 (1): 13-8.
- [63]** Moroy T, Geisen C. Cyclin E. 2004 Aug; 36 (8): 1424-39.
- [64]** Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. 1993 Feb; 3 (1): 5-10.
- [65]** Niezabitowski A, Lackowska B, Rys J, Kruczek A, Kowalska T, Mitus J, Reinfuss M, Markiewicz D. Prognostic evaluation of proliferative activity and DNA content in the phyllodes tumor of the breast: immunohistochemical and flow cytometric study of 118 cases. 2001 Jan; 65 (1): 77-85.
- [66]** Noll Sabine, Scaub-Kuhnen Susanne. Praxis der Immunhistochemie. URBAN& FISCHER, 2000.
- [67]** O'Connell BC, Cheung AF, Simkevich CP, Tam W, Ren X, Mateyak MK, Sedivy JM. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. 2003 Apr 4; 278 (14):12563-73.
- [68]** Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16 INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. 2004 Aug; 51 (3-4): 146-53.
- [69]** Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinase, INK4 inhibitors and cancer. 2002 Mar 14; 1602 (1): 73-87.
- [70]** Packesien J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified... Tissue microarray technology, Mol Pathol 2003, 56: 198-204.
- [71]** Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. 2004 Nov 15; 301 (1): 1-7.
- [72]** Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. 2001 Mar 10; 264 (1): 148.
- [73]** Pisick E, Jagadeesh S, and Salgia R. Receptor tyrosine kinases and inhibitors in lung cancer. The Scientific World Journal (2004) 4, 589-604.
- [74]** Polito P, Cin PD, Pauwels P, Christiaens M, Van den Berghe I, Moerman P, Vrints L, Van den Berghe H. An important subgroup of phyllodes tumors of

the breast is characterized by rearrangements of chromosomes 1q and 10q. 1998 Sep-Oct; 5 (5): 1099-102.

**[75]** Reddick RL, Shin TK, Sawhney D, Siegal Gp. Stromal proliferations of the breast: an ultrastructural and immunohistochemical evaluation of cystosarcoma phyllodes, juvenile fibroadenoma, and fibroadenoma. 1987 Jan; 18 (1): 45-9.

**[76]** Roninson IB. Oncogenetic function of tumour suppressor p21 (waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. 2002 May 8; 179 (1): 1-14.

**[77]** Rosen Paul Peter, Rosen's Breast Pathology. New York 1996.

**[78]** Samaratunga H, Clarke B, Owen L, Bryson G, Swanson C. Phyllodes tumors of the breast: correlation of nucleolar organizer regions with histopathological malignancy grading, flow cytometric DNA analysis and clinical outcome. 2001 Nov; 51 (11): 866-73.

**[79]** Sawyer EJ, Poulson R, Hunt FT, Jeffery R, Elia G, Ellis IO, Ellis P, Tomlinson IP, Hanby AM. Malignant phyllodes tumours show stromal overexpression of c-myc and c-kit. 2003 May; 200 (1): 59-64.

**[80]** Sawyer EJ, Hanby AM, Rowan AJ, Gillett CE, Thomas RE, Poulson R, Lakhani SR, Ellis IO, Ellis P, Tomlinson IP. The Wnt pathway, epithelial-stromal interactions and malignant progression in phyllodes tumours. 2002 Apr; 196 (4): 437-44.

**[81]** Sawyer EJ, Hanby AM, Poulson R, Jeffery R, Gillett CE, Ellis IO, Ellis P, Tomlinson IP. Beta-catenin abnormalities and associated insulin-like growth factor overexpression are important in phyllodes tumours and fibroadenomas of the breast. Aug; 2003 (5): 627-32.

**[82]** Sawyer EJ, Hanby AM, Ellis P, Lakhani SR, Ellis IO, Boyle S, Tomlinson IP. Molecular analysis of phyllodes tumors reveals distinct changes in the epithelial and stromal components. 2000 Mar; 156 (3): 1093-8.

**[83]** Scholzen T, Gerdes J, The Ki-67 Protein: from the known and unknown. 2000 Mar; 182 (3): 311-22.

**[84]** Semczuk A, Jakowicki JA. Alterations of pRb1-cyclin D1-cdk4/6 (INK4A) pathway in endometrial carcinogenesis. 2004 Jan 8; 203(1): 1-2.

**[85]** Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ. The physiology of p16(INK4A)-mediated G1 proliferative arrest. 2000; 33 (2): 189-97.

**[86]** Shpitz B, Bomstein Y, Sternberg A, Klein E, Tiomkin V, Kaufman A, Groisman G, Bernheim J. Immunoreactivity of p53, Ki-67 and c-erbB-2 in

phyllodes tumors of the breast in correlation with clinical and morphologic features. 2002 Feb; 79 (2): 86-92.

**[87]** Suo Z, Jahn, Nesland. Phyllodes Tumor of the Breast: EGFR Family Expression and Relation to Clinicopathological Features. 2000 Nov-Dec; 24 (6): 371-81.

**[88]** Tavassoli FA, Devilee P (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press: Lyon 2003.

**[89]** Tedesco KI, Lockhart AC, Berlin JD. The epidermal growth factor receptor as a target for gastrointestinal cancer therapy. 2004 Oct; 5 (5): 393-403.

**[90]** Tse GM, Putti TC, Kung FY, Scolyer RA, Law BK, Lau TS, Lee CS. Increased p53 protein expression in malignant mammary phyllodes tumors. 2002 Jul; 15 (7): 734-40.

**[91]** Tse GM, Lui PC, Putti TC, Kung FY, Scolyer RA, Law BK, Lau TS, Lee CS. Tumour angiogenesis and p53 protein expression in mammary phyllodes tumors. 2003 Oct; 16 (10): 1007-13.

**[92]** Tse GM, Putti TC, Lui PC, Lo AW, Scolyer RA, Law BK, Karim R, Lee CS. Increased c-kit (CD117) expression in malignant mammary phyllodes tumors. 2004 Jul; 17 (7): 827-31.

**[93]** Tse GM, Tsang AK, Putti TC, Scolyer RA, Lui PC, Law BK, Karim RZ, Lee CS. Stromal CD10 expression in mammary fibroadenomas and phyllodes tumours. 2005 Feb; 58 (2):185-9.

**[94]** Tse GM, Lee CS, Kung FY, Scolyer RA, Law BK, Lau TS, Putti TC. Hormonal receptors expression in epithelial cells of mammary phyllodes tumors correlates with pathologic grade of the tumor: a multicenter study of 143 cases. 2002 Oct; 118 (4): 522-6.

**[95]** Umekita Y, Yoshida H. Immunohistochemical study of MIB1 expression in phyllodes tumor and fibroadenoma. Sep; 49 (9): 807-10.

**[96]** Umekita Y, Yoshida H. Immunohistochemical study of hormone receptor and hormone-regulated protein expression in phyllodes tumour: comparison with fibroadenoma. 1998 Oct; 433 (4): 311-4.

**[97]** Weinberg WC, Denning MF. p21 Waf1 control of epithelial cell and cell fate. 2002; 13 (6): 453-64.

**[98]** Witte F, Honig A, Mirecka J, Schauer A. Cystosarcoma phyllodes of the breast: prognostic significance of proliferation and apoptosis associated genes. 1999 Jul-Aug; 19 (4B): 3355-9.

**[99]** Ximena Montano, p53 associates with trk tyrosine kinase. University of Newcastle, Oncogene (1997) 15, 245-256.



## **8. Danksagung**

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Werner Böcker, Direktor des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der WWU Münster, für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Horst Bürger, der mir die Arbeit an diesem Thema ermöglicht hat und diese unmittelbar betreut hat.

Den Herren Dr. med. Christian Kersting und Dr. med. Bernd Schulte sei an dieser Stelle für Ihre stets freundliche Unterstützung gedankt.

Schließlich möchte ich meiner Frau und meinen Kindern dafür danken, dass Sie mich während dieser Arbeit stets unterstützt und motiviert haben.