

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

Zytokeratinexpressionsmuster in der Biologie und Prognose
des invasiven Mammakarzinoms

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt
von
Butrimovitch, Elisso
aus Kiew / Ukraine
2007

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

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

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. R. Lellé

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Bürger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2007

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

ZUSAMMENFASSUNG

Zytokeratinexpressionsmuster in der Biologie und Prognose
des invasiven Mammakarzinoms
Butrimovitch, Elisso

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Analyse des Krankheitsverlaufes von 222 Mammakarzinompatientinnen aus der Universitätsfrauenklinik Münster in Relation zu der Expression von 6 verschiedenen Zytokeratinen mit dem Ziel die prognostische Relevanz der Zytokeratinexpression (Ck 1, 5, 10, 14, 8/18 und 19) zu verifizieren.

Die mit Hilfe der Tissue Microarray-Methode gewonnenen Schnittpräparate wurden immunhistochemisch auf die Expression von 6 Zytokeratinen, sowie den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), Vimentin, MIB-1, p53, erbB2, bcl-2, CyclinD1, Epitheliales Membranantigen (EMA), sowie den Östrogen- (ER) und den Progesteronrezeptor (PR) untersucht. Die Ergebnisse wurden mittels Kaplan-Meier-Analysen auf die prognostische Relevanz bewertet. Zusätzlich wurde ein Bootstrap- und Permutationsverfahren (Resamplingverfahren) durchgeführt, um globale, mit bestimmten Zytokeratinen assoziierte Proteinexpressionsmuster zu verifizieren.

Die Überlebensanalysen zeigten nach ca. 6,5 Jahren Beobachtung keine signifikanten Unterschiede. Die Resultate der Resamplingverfahren zeigten ein gegenläufiges Verhalten der Proteinexpressionen für Ck 5 und Ck 8/18. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Wert der Zytokeratinexpression beim Mammakarzinom noch nicht abschliessend beurteilt werden kann. Die gefundenen Expressionsmuster lassen jedoch schon jetzt Einblicke in die Pathogenese des invasiven Mammakarzinoms zu, speziell unter Berücksichtigung eines kürzlich postulierten Progenitorzellkonzepts der weiblichen Brustdrüse.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2007

Meiner lieben Mutter

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. MAMMAKARZINOM	2
2.1. Epidemiologie.....	2
2.2. Risikofaktoren.....	2
2.2.1. Alter	3
2.2.2. Genetische Disposition	3
2.2.3. Vorläuferläsionen	4
2.2.4. Hormonelle Faktoren	5
2.2.5. Gravidität und Laktation	6
2.2.6. Adipositas.....	6
2.2.7. Ernährungsfaktoren.....	6
2.2.8. Umweltfaktoren, Lebensstilfaktoren	7
3. HISTOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS	9
3.1. In-situ Karzinome der Mamma (Carzinoma in situ).....	9
3.2. Invasive Mammakarzinome	11
3.3. Lokalisation.....	12
4. KLINISCHE MANIFESTATION UND PATHOLOGISCHE PARAMETER.....	13
4.1. Klinische Hinweise auf ein Mammakarzinom	13
4.2. Regionale Ausbreitung und Fernmetastasierung	13
4.3. Pathologische Anatomie des Mammakarzinoms (TNM-Klassifikation, Grading).....	15
5. GRUNDLAGEN.....	18
5.1. Molekulare / Genetische Grundlagen.....	18
5.1.1. Cancerogene Risikofaktoren	18
5.1.2. Cancerogenese	19
5.1.3. Spezifität molekularer Biologie der Karzinomzelle	21
5.2. Bedeutung von Zytokeratinen beim Mammakarzinom	22

6. MATERIAL UND METHODEN	25
6.1. Material	25
6.2. Methoden.....	25
6.2.1. Tissue Microarray (TMA).....	26
6.2.1.1. Das Prinzip der TMA-Methode.....	26
6.2.1.2. Die TMA-Herstellungstechnik	26
6.2.2. Immunhistochemische Analyse	27
6.2.2.1. Verwendete Reagenzien.....	27
6.2.2.2. Prozedur	29
6.2.3. Lichtmikroskopische Analyse	31
6.2.4. Statistische Verfahren	32
6.2.4.1. Bootstrap Verfahren.....	32
6.2.4.2. Permutationsverfahren	32
7. ERGEBNISSE	34
7.1. Überlebenskurven nach Kaplan-Meier.....	35
7.2. Ergebnisse der Bootstrap- und Permutationsverfahren.....	43
8. DISKUSSION	50
9. ZUSAMMENFASSUNG.....	60
10. LITERATURVERZEICHNIS.....	61
11. DANKSAGUNG	70
12. LEBENS LAUF	72
13. ANHANG.....	I
13.1. Tabellenverzeichnis.....	I
13.2. Abbildungsverzeichnis	II
13.3. Abkürzungsverzeichnis.....	IV

1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau mit einem Altersgipfel zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr. Die westliche Welt prävaliert eindeutig in der geografischen Häufigkeitsverteilung. Die jährliche Inzidenz beträgt ca. 600.000 Frauen weltweit, wobei der deutsche Anteil davon ca. bei 50.000 Frauen ist. Das bedeutet, dass in Deutschland etwa jede zehnte Frau an Mammakarzinom erkrankt. Die Inzidenz steigt seit Jahren kontinuierlich. Auch bezüglich der Mortalität ist das Mammakarzinom die häufigste Krebsart. Jedoch weist sie in der letzten Zeit Dank der verbesserten Therapiekonzepte einen Rückgang auf. Dennoch ist das Mammakarzinom eine nicht heilbare Erkrankung, die noch nach 10-20 Jahren in Form von Metastasen exazerbieren kann.

Aufgrund des individuellen Krankheitsverlaufes gewinnen zunehmend, zusätzlich zu den etablierten, neue, individualisierte Prognosefaktoren und Therapieverfahren des Mammakarzinoms an Bedeutung. So ergab sich für die folgende Arbeit die Fragestellung, ob das Zytokeratinexpressionsmuster der Ck 1, 5, 10, 14, 8/18 und 19 als Prognosefaktor beim invasiven Mammakarzinom sinnvoll eingesetzt werden kann.

2. Mammakarzinom

2.1. Epidemiologie

Weltweit erkranken jährlich etwa 600.000 Menschen neu an Brustkrebs, davon 200.000 in den Ländern der EU (67). In den westlichen Industrieländern ist dies heute die häufigste maligne Erkrankung der Frau (18-28%) (9,14,68), wo mehr als jede sechste Frau in ihrem Leben an einem Mammakarzinom erkrankt (10). Die Inzidenz ist hier mit 60-70/100.000 Frauen pro Jahr (10) um etwa das 5fache höher als in Asien (33) (in Japan ist sie besonders niedrig (67)) und zeigt seit 1940 eine kontinuierliche Erhöhung. In Europa ist ein ausgeprägter Nord-Süd-Gradient mit einer deutlich geringen Inzidenzrate im Mittelmeerraum erkennbar (14,33,68). Trotz aller diagnostischen und therapeutischen Anstrengungen wurde in den letzten 30 Jahren nur ein geringer Rückgang der Mortalität an Mammakarzinom erzielt, die zur Zeit bei 30/100.000 Frauen pro Jahr liegt und als häufigste Todesursache bei 35-55-Jährigen gilt (10,14,68). In der BRD ist das Mammakarzinom die häufigste Krebsart (jedes vierte Malignom) und Krebstodesursache bei Frauen. Die jährliche Inzidenz beträgt hier ca. 50.000 Frauen (7-10% der Frauen) mit den Erkrankungsgipfeln zwischen 45 und 50 sowie zwischen 60 und 65 Jahren (14,68). Die Mortalität liegt bei ca. 18.000 Frauen und 100 Männer pro Jahr (8).

2.2. Risikofaktoren

Beim Mammakarzinom sind bis heute viele Aspekte der Genese nicht bekannt. Es ist davon auszugehen, dass die Ätiologie multifaktoriell bedingt ist und jeder Krankheitsfall individuell ist. Welche Faktoren das aber spezifisch für jede einzelne Frau sind, lässt sich, sogar beim Auftreten des Malignoms, nicht identifizieren (14).

Die Inzidenz der Mammakarzinome wird beim Vorliegen folgender studienbelegten Risikofaktoren erhöht, wobei eine höhere Gefährdung keinesfalls unausweichlich zu einer Erkrankung führt (4):

2.2.1. Alter

Das Erkrankungsrisiko nimmt mit dem Lebensalter deutlich zu. Ungefähr $\frac{2}{3}$ der Betroffenen sind älter als 60 Jahre (14,68). Grundsätzlich können jedoch Frauen jedes Alters betroffen werden. Heute wird der Brusttumor aus noch unklaren Gründen immer häufiger bei jüngeren Frauen diagnostiziert (14,67).

Alter	Brustkrebsrisiko
25 Jahre	1:20.000
40 Jahre	1:217
50 Jahre	1:50
80 Jahre	1:10

Tab. 1: Brustkrebsrisiko in Abhängigkeit vom Alter (modifiziert nach (14))

2.2.2. Genetische Disposition

Nur 5-10% aller Mammakarzinome haben eine genetische Prädisposition. 90-95% treten sporadisch auf (33). Eine Frau mit Mammakarzinom bei Verwandten I. und II. Grades hat bei prämenopausalem unilateralem ein 3fach und bei bilateralem ein 9fach, bei postmenopausalem unilateralem ein 1,5fach und bei bilateralem ein 6fach erhöhtes Risiko selbst einen Brustkrebs zu entwickeln (10,33,68).

1990 wurde das erste Mammakarzinom-Gen (BRCA-1=Breast Cancer Gene 1) identifiziert (21). Es ist nur für einen Teil aller hereditären Brustkrebsformen verantwortlich. Seine Mutation ist typisch für Hereditary Early Onset Breast Cancer (HBC, Brustkarzinome vor dem 45. Lebensjahr) und für Hereditary-Breast-Ovarian-Cancer Syndrome (HBOC, gehäuftes Vorkommen von Brust- und Ovarialkarzinomen in der Familie) (33) und zeigt ein 80-90%iges Risiko an einem Mammakarzinom und ein 60-80%iges Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Innerhalb des Mutationsspektrums der HBC und HBOC fand man bisher keine Unterschiede, somit bleibt es offen, ob eine Frau an einem Mamma- und/oder Ovarialkarzinom erkrankt (33). Männer können eine BRCA-1 Mutation als Konduktoren übertragen ohne selbst zu erkranken (43). 1994 wurde das zweite Antionkogen BRCA-2 identifiziert. Die

BRCA-1 und -2 gekoppelten Familien unterscheiden sich phänotypisch: BRCA-2 männliche Mutationsträger haben auch ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko (73), Frauen zeigen keine gesteigerte Ovarialkarzinominzidenz. Bei BRCA-1 und -2 Mutationen liegt das Erkrankungsrisiko 6-8-mal höher als im Normalkollektiv und manifestiert sich oft schon in der Prämenopause. Die beiden Gene sind für über 90% aller hereditären Brustmalignome verantwortlich, wobei die BRCA-1 Mutation häufiger vorkommt (68), und sind somit die bedeutendsten für Mammakarzinomen prädisponierenden Gene. Die Mutationen in den anderen Genen (Onkogenen, Antionkogenen, DNA-Reparaturgenen, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsgenen etc.) sind deshalb zahlenmässig von untergeordneter Bedeutung (33). Die für die Genese des Mammakarzinoms wichtigsten Beispiele werden im Folgenden benannt:

Onkogene	Lokalisation
C-MYC = myelo-cyto-matosis	Chr.8
Cyclin D1	Chr.11
EGF-R = epidermal growth factor-Rezeptor	
ERB-B2 (Syn.: HER-2/NEU) = erythblastosis	Chr. 17
BCL 1 = B-cell-lymphoma	Chr. 11
INT 2 = fibroblast growth factor	Chr. 13
Antionkogene	
BRCA-1 /-2 = breast cancer	Chr. 17q21-22 / 13q 12-13
P53	Chr. 17p 17.3
RB1 = retinoblastoma	Chr. 13q
DCC = deleted in colon carcinoma	Chr. 18q
NM 23 = non-metastatic	Chr. 17qII

Tab. 2: Für die Entstehung des Mammakarzinoms bekannte Onkogene und Antionkogene (10).

2.2.3. Vorläuferläsionen

Eine Frau mit einem Mammakarzinom in der Eigenanamnese hat ein 5- bis 10fach erhöhtes Risiko an einem kontralateralen Mammakarzinom zu erkranken. Auch benigne Brustveränderungen sind oftmals mit einem erhöhtem, bilateralem Brustkrebsrisiko

verbunden (10). Die erschwerte Frühdiagnostik (Makromastie, knotige, schmerzhaft oder derbe Brust) steigert das Risiko, den Tumor zu übersehen (68).

2.2.4. Hormonelle Faktoren

Die Rolle der weiblichen Hormone in der Entstehung von Mammakarzinomen ist gegenwärtig eine der aktuellsten Themen der gynäko-onkologischen Debatten weltweit. Zurückzuführen ist dies v. a. auf die amerikanische „WHI = Women`s-Health-Initiative“- Studie (2002) und die britische „Million Women Study“ (2003) (13,51).

Eine Rolle bei der Entstehung von Mammakarzinomen spielen bekanntlich Östrogene. Eine frühe Menarche (< 12 Jahre), späte Menopause (> 52 Jahre), Nulliparität, späte Erstparität (> 30 Jahre) und Oligomenorrhoe (Zyklus > 31 Tage) verdoppeln jeweils das Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken. Den Grund dafür sieht man in der langen Östrogeneinwirkung ohne Unterbrechung durch progesterondominierende Phasen (14,68). Heftiges Diskussionsthema ist aktuell die Risikoerhöhung durch die exogen zugeführten weiblichen Hormone (37,68). Die These, die Pille erhöhe geringfügig das Brustkrebsrisiko (14,68), trifft auf die Antithese, dass die Pille keine Risikodeterminante darstelle (37). Die Ergebnisse der o. g. Studien lösten weltweit eine enorme Verunsicherung um die Hormonersatztherapie (HRT) aus. Sie ergaben eine Risikoerhöhung durch die HRT mit Östrogenen und Gestagenen über 5 Jahre. Die Monotherapie mit Östrogenen wies keine Risikoerhöhung auf, zeigte sogar in der WHI Studie eine überraschende Risikoreduktion von Brustkrebs, die mit Dauer der Studie zunahm und nur knapp die Signifikanz verfehlte (3,22). Diese Ergebnisse wurden kritisch analysiert und weisen für einige Wissenschaftler deutliche Schwachstellen auf. Das Risiko durch Östrogenzufuhr wurde als gering eingestuft, da nur in Kombination mit vielen negativen Faktoren das Brusttumorstadium provoziert werden kann (57). Somit sind die Östrogene bezüglich ihrer krebserzeugenden Potenz aktuell rehabilitiert. Überraschenderweise wurde in über zehn Studien nachgewiesen, dass sich das Mammakarzinomrisiko durch den Zusatz von Gestagenen (besonders synthetischen (28)) erhöht (57). Die dargestellten Daten zur Unterstützung der These halten einer kritischen Analyse durch Berliner Pathologen jedoch nicht stand: sie liessen nur den Schluss zu, dass die Hormone das Wachstum bereits vorhandener hormonsensitiver

Brusttumoren stimulieren, aber keinen Einfluss auf die primäre Neubildung von Mammakarzinomen haben. HRT habe dadurch eher einen Nutzen, da die Tumoren Dank des schnelleren Wachstums bei regelmässigen Vorsorgeuntersuchungen früher diagnostiziert und therapiert werden können (23,79). Einige Studien zeigen Ergebnisse, in denen die Karzinome der Frauen mit HRT aufgrund ihrer Struktur einen günstigeren Verlauf aufweisen und dadurch die Überlebenschancen verbessern (23). Grundsätzlich gilt, dass eine HRT nur bei einer strengen Indikation und mit mindestens jährlicher Nutzen/Risiko-Abwägung durchgeführt werden sollte (37,57).

2.2.5. Gravidität und Laktation

Gravidität und Laktation haben wahrscheinlich einen präventiven Effekt. Das Risiko verdoppelt sich bei den Nullipara und älteren Erstgravida (>30 J.). Studien belegen, dass das Mammakarzinomrisiko abnimmt, je früher und je mehr Kinder eine Frau bekommt und je länger sie stillt. Ältere Erstgebärende haben diesen „Laktationsschutz“ nur, wenn sie mindestens 24 Monate stillen. Dies kann zum Teil die geografische Häufigkeitsverteilung der Mammakarzinominzidenz erklären: In den Ländern der 3. Welt und in Südeuropa ist die mittlere Stillzeit ca. 1,5 bis 2 Jahre, während sie in Nordeuropa nur 1 bis 8 Monate beträgt (67). Erklären lassen sich diese Zusammenhänge durch endokrine Einflussfaktoren.

2.2.6. Adipositas

Übergewichtige haben ein 3fach erhöhtes Mammakarzinomrisiko (10,68). Sie haben in der Regel eine frühe Menarche und eine späte Menopause. Auch nach der Menopause weisen sie aufgrund einer Aromatisierung des Testosterons im Fettgewebe weiterhin einen höheren Östrogenspiegel auf. Postmenopausale adipöse Patientinnen haben eine schlechtere Prognose eines Mammakarzinoms als gleichaltrige Normalgewichtige (37).

2.2.7. Ernährungsfaktoren

Die epidemiologische Forschung hat einen Zusammenhang zwischen Ernährung und

einzelnen Krebsarten herausgefunden. Eine Ernährung mit hohem Anteil an Fleisch und Fett und mit niedrigem Anteil an Ballaststoffen, Obst und Gemüse scheint ein Grund für die erhöhte Mammakarzinominzidenz in den westlichen Industrieländern zu sein. Allerdings ist die These der Entstehung von Brustkrebs durch zu hohe Fettaufnahme in der Wissenschaft umstritten (33). Mediterranes Essen (fettarm, gemüserich) scheint durch den hohen Gehalt an Vitaminen, Mineral- und Ballaststoffen, sekundären Pflanzenstoffen und antioxidativen Inhaltstoffen protektiv zu wirken (37,68). Antioxidantien können das Mammakarzinomrisiko senken, indem sie die für die DNA schädlichen hochreaktiven freien Radikalen abfangen, die sowohl regulär im körpereigenen Stoffwechsel als auch im Zuge der Fremdstoffumwandlung bei der Umsetzung von Karzinogenen entstehen. Zu den kanzerogenen Lebensmittelsubstanzen gehören u. a. Nitrate, Aflatoxine, und Benzpyrene (37). Auch der Fleischverzehr fördert die Sauerstoffradikalbildung. Zu den bekanntesten Radikalfängern zählen Vitamin C, Vitamin E, die Carotinoide und das Spurenelement Selen. Selen- und Vitamin C-Mangel scheinen das Mammakarzinomrisiko zu erhöhen (38). Einige Studien zeigen nicht nur die protektive Wirkung von Vitamin C, sondern auch eine Umkehr des Entartungsprozesses (20).

Die schützende Wirkung asiatischer Ernährungsformen wird durch einen hohen Anteil an Phytoöstrogenen erklärt, die u. a. in Sojaprodukten enthalten sind. Sie beruht direkt auf der kompetitiven Bindung dieser nicht-steroidalen Substanzen an den Östradiolrezeptor und dem daraus folgenden Tamoxifen-ähnlichen Effekt und indirekt auf der Aromatasehemmung (33). Die Ergebnisse der EPIC-Studie (European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition cohort study) zeigen dagegen keine signifikante Assoziation zwischen der Aufnahme von Obst oder Gemüse und dem Mammakarzinomrisiko (33,78).

Ein regelmässiger und starker Alkoholkonsum von mehr als 30 g/d erhöht linear das Mammakarzinomrisiko, in Kombination mit dem Rauchen steigt es weiter (67).

2.2.8. Umweltfaktoren, Lebensstilfaktoren

Der überwiegende Teil der Mammakarzinome ist wahrscheinlich durch generelle Umwelt- und Lebensstilfaktoren bedingt, da nur ca. 5-10% eine genetische

Prädisposition haben. Es besteht aber ein fließender Übergang zwischen den beiden Faktoren (33). Migrantenstudien beweisen, dass der Faktor des Lebensstils (Ernährungsgewohnheiten, Reproduktionsverhalten, hoher sozioökonomischer Status) eine entscheidende Rolle in der Ätiologie des Mammakarzinoms spielt. Die in die USA immigrierten Japanerinnen und Chinesinnen zeigen eine deutliche Zunahme der Brustkrebsinzidenz, die zweite Generation erreicht etwa die gleiche Inzidenzrate wie die heimische Bevölkerung (33,45).

Es gibt deutliche Hinweise, dass ionisierende Strahlung auf das Brustdrüsenepithel mutagen wirkt. So fand man eine erhöhte Mammakarzinominzidenz bei den Überlebenden der Atombombenangriffe auf Hiroshima und Nagasaki und bei mit Röntgenstrahlen behandelten Mastitis- und Tuberkulosepatientinnen (33,37,68). Das Rauchen in der erhöhten Proliferationsphase des Brustdrüsenepithels (14,37) und in der Postmenopause bei der genetisch bedingten Polymorphismen der N-Acetyltransferase 2 erhöht besonders stark das Risiko (33). Die erkrankten Raucherinnen bilden häufiger Lungenmetastasen (14).

3. Histologie des Mammakarzinoms

Die aktuell gültige histologische Klassifikation von Mammakarzinomen (WHO 2003) unterscheidet zwischen invasiven und nicht-invasiven Formen, die noch weiter nach den Entstehungsorten und den speziellen Differenzierungsformen histologisch klassifiziert werden. Die histologische Typisierung invasiver Karzinome hat einen prognostischen Wert. Bei Vorhandensein mehrerer phänotypischer Tumorkomponenten (30-50% der Fälle) wird der prädominierende Anteil diagnostisch in den Vordergrund gestellt (52,68).

3.1. In-situ Karzinome der Mamma (Carzinoma in situ)

Das In-situ Karzinom ist morphologisch eine typische maligne Proliferation, die jedoch die Basalmembran respektiert. Es gilt daher als noch nicht metastasierungsfähige Vorstufe invasiver Karzinome und macht 5-30% aller Mammakarzinome aus. Nach dem morphologischen Erscheinungsbild unterscheidet man zwei Formen, die ein völlig verschiedenes tumorbiologisches Potential aufweisen:

- das sehr häufige (95%) **ductale Carcinoma in situ (DCIS)**

Das DCIS beträgt 5-30% aller Mammakarzinome und zeigt einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr. Die malignen Zellen entstehen primär aus dem Drüsenepithel kleiner Milchgänge, überwiegend in den peripheren terminalen Gangabschnitten, und breiten sich segmental im ductalen System aus. Im Verlauf können sie die Lobuli (lobuläre Kanzerisierung) oder die terminalen Milchgänge der Mamillenregion (M. Paget) miteinbeziehen. Das DCIS stellt eine sehr heterogene Gruppe von Läsionen in Bezug auf die Histopathologie, die Klinik und die Prognose dar. Klinisch fehlt meist ein palpabler Knoten, eine einseitige, blutige Galaktorrhoe ist selten, so dass die Patientinnen oft asymptomatisch sind. So sind bei etwa 50-60% der DCIS gruppierte, strahlenförmige und unregelmässig begrenzte Mikroverkalkungen bei der Mammographie die ersten, und oft die einzigen Hinweise auf eine maligne Zellproliferation (10,33,64,68). Die Veränderungen sind oft multizentrisch, so dass es

technisch häufig nicht möglich ist, eventuelle invasive Veränderungen zu erfassen. Daher findet man bei subtiler histopathologischer Aufarbeitung in als „präinvasiv“ beschriebenen Präparaten dennoch bei 10-20% Mikroinvasionen und bei 2% eine axilläre LK-Metastasierung (33,68). Bei DCIS >5 cm muss man zu 60% mit invasiven Bereichen rechnen, wobei bei Grössen <2,5 cm sie noch nicht zu erwarten sind. Diese Tatsache zwingt zur Vorsicht bei der Therapieplanung. Die Therapie des DCIS orientiert sich an der 3er-Klassifikation:

1. “non high nuclear grade“ Fälle ohne Nekrose
2. “non high nuclear grade“ Fälle mit Nekrose
3. “high nuclear grade“ Fälle ohne/mit Nekrose

und an dem darauf aufgebauten Van Nuys Prognostic Index (VNPI), einem Scorewert, der ausser der o. g. pathologischen Klassifikation, noch Tumorgrosse und tumorfreien Resektionsrand berücksichtigt. Anhand der erreichten Punktzahl werden unterschiedliche Therapievorschläge gemacht (33,68). Bei adäquater Therapie beträgt die Überlebenswahrscheinlichkeit 94-96%. Bei unvollständiger Entfernung entsteht in 10-50% ein lokales Rezidiv oder ein invasives Karzinom (10,68). Ohne Therapie entwickelt sich bei 30% nach 3-10 Jahren ein invasives Mammakarzinom (17,18,33,37).

- das seltenere (5%) **lobuläre Carcinoma in situ (LCIS)**

Der Hufigkeitsgipfel des LCIS liegt bei 45 Jahren. Eine neoplastische Proliferation von monomorphen Tumorzellen entsteht in den Lobuli und führt zur Auftreibung von Azini, oft werden die terminalen Gänge mit einbezogen. Charakteristisch ist die fehlende Tumorzelladhasion aufgrund der E-Cadherin-Gen-Mutationen. LCIS ist weder klinisch, noch makroskopisch pathologisch-anatomisch zu entdecken. Da es auch bei der Mammographie schwer zu sehen ist, wird es fast immer nur zufällig bei aus anderen Gründen durchgeführten Biopsien diagnostiziert. In 20-40% erfasst man mammographisch die lobulären Mikroverkalkungen (10,33,68). Unter günstigen Bedingungen ist es möglich, mit einer hochauflösenden Sonographie die verdickten Milchgänge und mit der MRT oder mit dem Farbdoppler eine eventuelleverstarkte Durchblutung eines LCIS oder eines DCIS zu erkennen (64). Die Multizentrität ist mit 60-80% häufiger als bei DCIS, weniger häufig ist ein bilaterales Auftreten (im Mittel 30%) (33,68). Das Mammakarzinomrisiko ist etwa 10fach gegenüber der

Normalbevölkerung erhöht (10,33). Studien belegen, dass sich aus LCIS nach 10-15 Jahren zu 10-30% ipsilaterale und zu 9-20% kontralaterale invasive Karzinome entwickeln (10,33,68). Wegen der geringeren malignen Potenz des LCIS definieren es einige Autoren im Gegensatz zu DCIS als keine Präkanzerose, sondern nur als einen Risikofaktor (33,64). Die Therapie des LCIS sehen viele Autoren in der Exzision im Gesunden, die aber eine erhöhte Multizentrität nahezu unmöglich macht, oder in einer subkutanen Mastektomie bei erschwerenden individuellen Faktoren (schwere Abgrenzbarkeit, starke Multizentrität, familiäres Risiko) (68). Andere Autoren halten eine regelmässige Nachkontrolle beider Mammae in der Regel als ausreichend (33,37).

3.2. Invasive Mammakarzinome

Das invasive Mammakarzinom ist ein infiltrativ wachsender, maligner, epithelialer Tumor, der seinen Ausgang von In-situ-Karzinomen nimmt. Histomorphologisch unterscheidet man zwei wichtige Hauptformen (90%): das invasiv-duktales und das invasiv-lobuläre Karzinom. Daneben gibt es weitere Sonderformen (10%).

- Das Invasiv-duktales Karzinom ist mit 65-80% der häufigste Tumortyp. 70-80% davon gehören einer „not otherwise specified“-Tumorgruppe an, bei der sich keine speziellen histologischen Merkmale der anderen typischen Formen des Mammakarzinoms nachweisen lassen (52). Die Histologie des invasiv-duktales Karzinoms ist durch ein buntes Bild aus unregelmässigen, unterschiedlich breiten, kohäsiv wachsenden Tumorzellen mit teils glandulären, teils soliden Abschnitten geprägt (10,64). Duktale Karzinome sind in $\frac{1}{3}$ aller Fälle multizentrisch und oft von einem DCIS umgeben. In 3% ist die kontralaterale Mamma betroffen (64). Unter therapeutischen Aspekten spielt das Verhältnis vom intraduktalen zum invasiven Anteil eine wichtige Rolle, wobei eine dominierende intraduktale Komponente durch ein erhöhtes Lokalrezidivrisiko charakterisiert ist (52).

- Das Invasiv-lobuläre Karzinom ist mit 10-15% die zweithäufigste Tumorart. Die Histologie zeigt ein dissoziiertes Wachstum der kleinzelligen Tumorzellen, das durch den E-Cadherin-Mangel bedingt ist (10). Das lobuläre Karzinom ist typischerweise multizentrisch und oft auch in der kontralateralen Mamma zu finden (64). Von dem klassischen Erscheinungsbild werden Varianten mit unterschiedlichem prognostischen

Verhalten abgegrenzt: solide, alveoläre, siegelringzellige, tubulo-lobuläre, pleomorphe sowie Mischtypen (52).

- Sonderformen kommen in etwa 10% der Fälle vor. In der Häufigkeit folgen das medulläre (ca.3%), das tubuläre (1-15%), das muzinöse (1-2%) und das papilläre Karzinom (1-7%). Die weiteren Karzinomformen treten in einer Häufigkeit von weniger als 1% auf (52,68). Der Morbus Paget der Mamille ist eine weitere Sonderform, die klinisch durch eine ekzematös aussehende Rötung der Mamille und Areole und histologisch durch ein dort lokalisiertes DCIS oder duktales Karzinom mit typischen Paget-Zellen gekennzeichnet ist. Die Genese des M. Paget wird durch eine intraepidermale Ausbreitung des DCIS in die Mamillenepidermis erklärt (10,64,68).

3.3. Lokalisation

Das Mammakarzinom entsteht zu ca. 55% im oberen lateralen Quadranten, zu jeweils 15% im oberen medialen Quadranten und im Mamillenzentrum, zu 10% im unteren lateralen und zu 5% im unteren medialen Quadranten. Eine Besonderheit des Mammakarzinoms ist die häufige Multifokalität und Multizentrität, die durch eine primär disseminierte Entstehung und eine dis- und eine kontinuierliche Ausbreitung innerhalb der Brust erklärt wird. Ausser dem erfassten Knoten rechnet man mit momentan noch klinisch okkulten, weiteren Herden (13-70%) in der ipsi- und kontralateralen Brust (64,69). Die genannten Zahlen lassen eine hohe Frequenz doppelseitig manifester Karzinome erwarten. Klinisch manifestieren sich aber kontralateral nur etwa 3-4% der duktales und 10% der lobulären Karzinome. Diese Eigenart wird durch das schubweise Wachstum der meisten multizentrischen Herde mit den dominierenden Phasen des Stillstandes gedeutet. Die Anzahl der histologisch diagnostizierten und der zu erwarteten klinischen Karzinome darf man anscheinend nicht gleich setzen. Die Multizentrität hängt ausser vom Durchmesser des Primärtumors auch noch von seinem Typus (z.B. muzinöse und medulläre Karzinome sind oft solitär) und dem Grading ab.

4. Klinische Manifestation und pathologische Parameter

4.1. Klinische Hinweise auf ein Mammakarzinom

Mammakarzinomsymptome hängen von der Lokalisation des Tumors und seinen Wachstumseigenschaften ab. Im typischen Fall ist in der Brust ein derber, unscharf begrenzter, meist nicht druckdolenter und nicht verschieblicher Knoten zu tasten, der in einem frühen Stadium nicht symptomatisch ist. Je nach Grösse der Brust ist ein Knoten erst ab 2 cm zu palpieren. Besonders karzinomverdächtig ist jeder tastbare Tumor in der Brust einer postmenopausalen Frau, der solange als Karzinom angesehen wird, bis das Gegenteil bewiesen ist. Ein Knoten bei einer Frau im gebärfähigen Alter ist meist eine Zyste oder ein Fibroadenom. Neu aufgetretene visuelle und palpable Gröszen-, Form- und Hautveränderungen der Brüste, eine einseitige blutige Galaktorrhoe, eine einseitige Armschwellung, Knoten in der Axilla und supraklavikulär weisen auf einen fortgeschrittenen malignen Prozess in der Brust hin (14,30,64,68,69).

4.2. Regionale Ausbreitung und Fernmetastasierung

Die frühzeitige Metastasierung des Mammakarzinoms kann lymphogen und hämatogen erfolgen. Die intraduktale und lymphogene Ausbreitung innerhalb der Mamma erklärt u. a. die Multifokalität und Multizentrität (68,69). Für die lymphogene Tumorausbreitung sind die drei folgenden regionalen Lymphknotengruppen wichtig:

1. ipsilaterale axilläre Lymphknoten (Level I-III)	<ul style="list-style-type: none"> - interpektorale (Rotter-Lymphknoten) - Lymphknoten entlang der V.axillaris und ihrer Äste - Die intramammären Lymphknoten werden als axilläre Lymphknoten klassifiziert
2. ipsilaterale Lymphknoten an der A. mammaria interna	<ul style="list-style-type: none"> - Lymphknoten, die dem Rand des Brustbeins entlang in der endothorakalen Fascie der ipsilateralen Interkostalräume lokalisiert sind

3. andere Lymphknoten	<ul style="list-style-type: none"> - supraclaviculäre - zervikale - kontralaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
------------------------------	---

Tab. 3: Regionäre Lymphknoten (modifiziert nach (5))

Die kanzerogene Ausbreitung in die axillären LK erfolgt meist aus einem Tumor im oberen oder unteren äusseren Quadranten, während ein Tumor in den inneren Quadranten oft in die retrosternalen Lymphknoten streut (30). Bei der regionalen lymphogenen Ausbreitung sind vor allem die axillären LK-Stationen entlang der V. axillaris und ihrer Äste betroffen. Der axilläre LK-Status ist entscheidend für die Therapiewahl und der wichtigste Prognoseparameter, der direkt mit der Grösse des Primärtumors, den Rezidiv- und Überlebensraten korreliert (33). Zu einer genauen Bestimmung der Karzinomausbreitung werden die ipsilateralen axillären LK in drei Etagen unterteilt, wobei der Befall des Level III prognostisch besonders ungünstig ist:

Level I (untere Axilla)	Lymphknoten lateral des lateralen Randes des M. pectoralis minor
Level II (mittlere Axilla)	Lymphknoten zwischen medialem und lateralem Rand des M. pectoralis minor und interpektoralen (Rotter) Lymphknoten
Level III (apicale Axilla)	Lymphknoten medial des medialen Randes des M. pectoralis minor, einschliesslich als infraklavikulär und/oder apical bezeichneten Lymphknoten

Tab. 4: Aufteilung der axillären Lymphknoten auf Level I-III (modifiziert nach (5,10))

Tumordurchmesser	Axillärer LK-Befall	Multizentrität intramammär
< 5 mm	0%; bis 15 % Mikrometastasen (< 2 mm Ø)	5-10%
6-10 mm	10-30%	} 15-25% (-40%)
11-15 mm	20-35%	
16-20 mm	40-60%	
> 20 mm	≥ 60%	

Tab. 5: Tumordurchmesser, axilläre Metastasierung und Multizentrität (68)

Eine hämatogene Metastasierung findet man zu 77% in Knochen, 55% in Lunge und Pleura, 35% in Thoraxwand, Leber und weniger häufig in ZNS, Ovarien und Uterus. Thoraxwand, Pleurahöhle und Lunge können ausserdem noch per continuitatem befallen werden. Mit Krankheitsprogression werden immer mehr Organe erfasst, wobei der viszerale Befall prognostisch besonders schlecht ist. Der Tod am Mammakarzinom ist fast immer eine direkte oder indirekte Folge der Metastasierung (64,68,69).

4.3. Pathologische Anatomie des Mammakarzinoms (TNM-Klassifikation, Grading)

Die Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt in Deutschland nach der TNM-Klassifikation. TNM-Präfix „p“ bedeutet Klassifizierung anhand des postoperativen histopathologischen Befundes, „y“ Klassifikation nach erfolgter Chemotherapie und „r“ Rezidivtumor (38).

pT – Primärtumor

pTX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

pT 0 kein Anhalt für Primärtumor

Tis Carcinoma in situ

Tis (DCIS) duktales Carcinoma in situ

Tis (LCIS) lobuläres Carcinoma in situ

Tis (Paget) Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne nachweisbaren Tumor

Anmerkung: Die Paget-Erkrankung, kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor, wird entsprechend der Grösse des Tumors klassifiziert.

pT 1 Tumor 2 cm oder weniger in grösster Ausdehnung

pT 1mic Mikroinvasion von 0,1 cm oder weniger in grösster Ausdehnung

pT 1a 0,5 cm oder weniger in grösster Ausdehnung

pT 1b mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in grösster Ausdehnung

pT 1c mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in grösster Ausdehnung

pT 2 Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in grösster Ausdehnung

pT 3 Tumor mehr als 5 cm in grösster Ausdehnung

pT 4 Tumor jeder Grösse mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut

Anmerkung: Die Brustwand schliesst die Rippen, die interkostalen Muskeln und den vorderen Serratusmuskel mit ein, nicht aber die Pectoralis-Muskulatur.

pT 4a Mit Ausdehnung auf die Brustwand

pT 4b	Mit Ödem (einschliesslich Apfelsinenhaut), Ulzerationen der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT 4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT 4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pN – Regionäre Lymphknoten	
pN X	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
pN 0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen ¹
	Anmerkung: ¹ Fälle, bei denen nur isolierte Tumorzellen in regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden, werden als pN0 klassifiziert. Isolierte Tumorzellen sind einzelne Tumorzellen oder kleine Ansammlungen von Zellen, die in ihrer grössten Ausdehnung 0,2 mm nicht überschreiten und gewöhnlich mittels Immunhistochemie oder molekularen Methoden entdeckt werden. Allerdings können sie ggf. mittels HE-Färbung verifiziert werden. Isolierte Tumorzellen zeigen typischerweise keine Hinweise auf eine metastatische Aktivität, d.h. Proliferation oder Stromareaktion.
pN 1mi	Mikrometastasen (grösser als 0,2 mm, aber nicht grösser als 2 mm in max. Ausdehnung).
pN 1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig ² waren.
pN 1a	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine grösser als 2 mm in max. Ausdehnung.
pN 1b	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.
pN 1c	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.
pN 2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch auffälligen ³ ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Fehlen axillärer Lymphknotenmetastasen.
pN 2a	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine grösser als 2 mm in max. Ausdehnung.
pN 2b	Metastasen in klinisch auffälligen ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Fehlen axillärer Lymphknotenmetastasen.
Anmerkungen:	
²	Nicht klinisch auffällig = nicht entdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie).
³	Klinisch auffällig = mitentdeckt im Rahmen der klinischen Untersuchung oder mit bildgebenden

Untersuchungsverfahren (ausgenommen Lymphszintigraphie) oder makroskopisch pathologisch-anatomisch sichtbar.	
pN 3	Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einem positiven axillären Lymphknoten; oder in mehr als 3 axillären Lymphknoten mit klinisch negativen mikroskopischen Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten.
pN 3a	Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine grösser als 2 mm in max. Ausdehnung) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten.
pN 3b	Metastasen in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einem positiven axillären Lymphknoten; oder Metastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die durch Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren.
pN 3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten.
pM – Fernmetastasen	
pM X	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM 0	Keine Fernmetastasen
pM 1	Fernmetastasen

Tab. 6: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (2002) (37)

Neben dem pTNM-Status ist das Grading das wichtigste Prognosemerkmal, in dem histologische Merkmale des Tumors zusammengefasst werden. Zur besseren zellulären Differenzierung des invasiven Mammakarzinoms ist das zelluläre Grading (G1-G3) nach den Vorschlägen von Elston und Ellis unter Erfassung der Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate zu empfehlen (10,33).

Das histologische Grading korreliert eng mit dem Differenzierungsgrad des Karzinoms, dem Lymphknotenstatus, der Rezidiv- und Überlebensrate, so dass man hierdurch prospektiv die Wahrscheinlichkeit einer Progression abschätzen kann (10,52).

5. Grundlagen

5. 1. Molekulare / Genetische Grundlagen

Eine Tumorzelle entsteht aus einer genetisch transformierten somatischen Zelle und zeichnet sich durch ein abnormes zelluläres Verhalten aus, das nicht mehr der physiologischen Regulation durch extrazelluläre Signale unterliegt und sich vor allem durch autonomes, unkontrolliertes, progressives Wachstum, Invasion und Metastasierung manifestiert. Tumorzellen bilden eine abnorme Gewebsmasse (Tumor), die als Wachstumsfolge zu den klinischen Symptomen führt (lokale Gewebedestruktion mit Verlust der organspezifischen Eigenschaften, Wirkung von Tumorzell-Stoffwechselprodukten, progressive Tumorzell-Verschleppung mit Ausbildung von Metastasen). Eine nicht therapierte Tumorerkrankung führt schliesslich zum Tod des Gesamtorganismus (9).

5.1.1. Cancerogene Risikofaktoren (9,62)

Gegenwärtig sind viele endogene und exogene Faktoren bekannt, die komplexe Aberrationen im Genom einer Zelle verursachen können. Eine Exposition gegenüber mehreren mutagenen Faktoren gleichzeitig, kann zu einem überproportionalen Risikoanstieg führen. Das zeitliche Intervall zwischen der Exposition und dem Auftreten einer Neoplasie kann bis zu 40 Jahren betragen.

Cancerogene Risikofaktoren	Beispiele
Infektionen	Helicobacter pylori (Karzinome und maligne Lymphome des Magens) Hepatitis B- und -C-Virus (Leberzellkarzinom) Humane Papillom-Viren (Cervixcarcinom) Epstein-Barr-Virus (u. a. Burkitt- Lymphom) Chronische Entzündungen ohne definierten Erreger (Colitis ulcerosa)
Physikalische Cancerogene	Ultraviolettes Licht (z.B. starke und langdauernde Sonnenexposition) Ionisierende Strahlung: Röntgen-, α -, β -, γ -Strahlen

Chemische Cancerogene	Polyzyklische Kohlenwasserstoffe (z.B. 3,4- Benzpyren, Teer, Russ) Aromatische Amine (z.B. 2-Naphtylamin) Nitrosamine (z.B. Dimethyl-, Diäthylnitrosamin) Biologische Substanzen (z.B. Aflatoxin, Diethylstilböstrol) Organische Substanzen (z.B. Vinylchlorid, Benzol) Anorganische Substanzen (z.B. Asbest, Arsen, Chrom, Cadmium, Nickel) Azofarbstoffe (z.B. 2-Acetylaminofluoren) Alkylierende Substanzen (z.B. Zyklophosphamid)
Genetische Faktoren	verschiedene Mutationen in unterschiedlichen Genen sind für die Entstehung und Progression der einzelnen Tumorerkrankungen verantwortlich
Ungesunde Ernährung	Ballaststoffarme, kalorienreiche Ernährung + mangelnde Bewegung

Tab. 7: Cancerogene Risikofaktoren (modifiziert nach (9,62))

5.1.2. Cancerogenese (2,9,36,44,46,48,62)

Eine normale Zelle nimmt extrazelluläre Informationen über die zahlreichen Oberflächenmoleküle (Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Hormone, extrazelluläre Matrix- und Zelladhäsionsmoleküle) auf, die in einem komplexen Netzwerk von sich gegenseitig beeinflussenden Signalvermittlungswegen intrazellulär verarbeitet werden und anschliessend eine Zielgenaktivierung mit folgender biologischer Zellreaktion, wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose, auslöst. Dieser Vorgang ist sehr umfassend und kompliziert und hängt stark von der präzisen extrazellulären Stimulation der Zelle ab. Die cancerogenen Faktoren bewirken eine molekulare Veränderung des Wirtsgenoms, die durch einen Strukturwechsel von Genprodukten eine Dysregulation in der zellulären Signalvermittlungskaskade bewirken und schliesslich einen malignen Phänotyp der Zelle provozieren (2,9,62).

Es wurden zwei wichtigste Krebsgene gefunden, die die Cancerogenese fördern bzw. supprimieren (36,46,62):

1) Onkogene

Zelluläre Onkogene (c-Onkogene) sind wachstumsstimulierende dominante Gene, die durch Mutation von Protoonkogenen, normalen zellulären Genen, entstehen, deren Produkte u. a. Proliferation, Differenzierung und Mobilität von Zellen regulieren.

Wachstumsfaktoren - PDGF - FGF	sis-Onkogen int 2-Onkogen
Transmembranäre Wachstumsfaktorrezeptoren - EGF-Rezeptor - M-CSF- Rezeptor	erbB-Onkogen fms-Onkogen
Membranassoziierte Tyrosinkinasen - Abl- Tyrosinkinase	abl-Onkogen
Membranassoziierte Guaninnukleotid-bindende Proteine - Ras-Protein	ras-Onkogen
Cytosolische Serin/threoninkinasen	raf-mil- Onkogen mos-Onkogen
Cytosolische Hormonrezeptoren - Schilddrüsenhormonrezeptor	erbA-Onkogen
Transkriptionsfaktoren	fos-, jun-, myc-, myb-, rel-Onkogene
Apoptosefaktoren	Bcl2-Onkogen

Tab. 8: Protoonkogene und verwandte Onkogene (62)

Eine Sequenzhomologie zu den Protoonkogenen weisen auch retrovirale Onkogene (v-Onkogene) auf, was durch eine Transduktion aus diesen in der Evolution erklärt wird. Die Umwandlung der nicht-aktivierten Protoonkogene in aktive c-Onkogene kann auf verschiedenen Wegen erfolgen (70). Sie führt zur Bildung von qualitativ veränderten Onkoproteinen, die eine unphysiologische, autonome Daueraktivierung der zur Proliferation benötigten Signalwege mit der abschliessenden malignen Transformation der Zelle bewirken. Diese Aktivierung kann ligandenunabhängig (kein exogenes Wachstumssignal notwendig) oder -abhängig (die durch das Onkogen kodierte Tumorzelle produziert konstitutiv und übermässig einen normalen, strukturell nicht veränderten Wachstumsfaktor, für den sie selbst einen Rezeptor besitzt und dadurch autokrin stimuliert wird) sein (9,46,62).

2) Antionkogene (Tumorsuppressorgene)

Antionkogene sind normale zelluläre Gene, deren Produkte eine supprimierende Wirkung auf das Wachstum der mit dem nicht beseitigten DNS-Defekt behafteten Zelle haben. Der Defekt wird entweder erfolgreich repariert oder die Zelle wird apoptotisch (48). Es sind heute über 70 verschiedenen Antionkogene bekannt, dazu gehören z. B.:

Gen	Locus	Tumor
Rb	13q14	Retinoblastom, Osteosarkom u.a.
TP53	17q13	Mamma-, Kolonkarzinom u.a.
NM23	17q11	Mammakarzinom u.a.
BRCA1	17q21	Mamma-, Ovarialkarzinom u.a.
BRCA2	16q12-13	Mamma-, Ovarialkarzinom u.a.

Tab. 9: Antionkogene (modifiziert nach (9,62))

Antionkogene wirken rezessiv und können über die gleichen Mechanismen wie die Onkogene inaktiviert werden. Die Analyse von über 30 Tumorerkrankungen (inkl. Mammakarzinom) des Menschen hat gezeigt, dass die meisten p53-Mutationen aufweisen (62). p53 verhindert den Übergang einer Zelle mit dem DNS-Fehler in die S-Phase des Zellzyklus und hemmt dadurch das Mutationsrisiko. Bei der p53-Mutation werden sowohl die DNS-Reparatursysteme als auch die Apoptosemechanismen nicht aktiviert, wodurch die Zelle mit dem DNS-Defekt ungehindert weiter wächst.

Es besteht ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen den Onko- und Antionkoproteinen, wobei Störungen die Cancerogenese fördern.

5.1.3. Spezifität molekularer Biologie der Karzinomzelle (9,62)

Eine Karzinomzelle besitzt folgende Eigenschaften:

- 1) gestörte Proliferationskontrolle,
- 2) gestörten Zell-Zell-Kontakt, bedingt u. a. durch veränderte Oberflächenantigene (z.B. Präsentation fetaler Antigene), -enzyme, -glycoproteine, -lipide (fehlendes Fibronectin); dichteres und autonomes Wachstum; leichtere Agglutinierbarkeit durch Lectine,
- 3) Vaskulo- und Angiogenesefähigkeit,
- 4) Invasionsfähigkeit durch Zellkontaktauflösung (fehlende Expression von Cadherinen, autonome Wachstumsfaktoren, die Cadherine phosphorylieren); fermentative Lyse der Gewebematrix durch Matrix-Metalloproteinasen; aktive Migration der Tumorzelle (wird durch membranständige Rezeptoren der Integrin- und Nichtintegrin-Familien

ermöglicht, deren Liganden Glykoproteine des umliegenden Gewebes sind, z.B. Kollagene, Laminin, Fibronectin, Vitronectin),

5) Metastasierungsfähigkeit durch Intravasation in die Blut-, Lymphbahn oder Körperhöhle; Verschleppung mit Schutzmechanismen gegen das tumorizide Blut; Extravasation durch die Anhaftung an das Gefässendothel.

Auch eine gesunde Zelle sezerniert die für Invasion und Metastasierung wichtigen Proteine, sie werden aber durch Antagonisten in ihrer Wirkung blockiert. Infolge von zusätzlichen Mutationen kann dieses Gleichgewicht gestört werden und die Zelle erlangt Invasions- und Metastasierungsfähigkeit.

Zahlreiche klinische Erfahrungen zeigen, dass zwischen den Lokalisationen der primären und sekundären Tumoren eine Gesetzmässigkeit besteht. Dies wird durch Unterschiede zwischen den Membranrezeptoren der Karzinomzellen und den Gewebsliganden der verschiedenen Organe erklärt, die nur in einer bestimmten Kombination miteinander reagieren können (9).

Alle Mutationen in der Karzinomzelle können unabhängig oder abhängig voneinander entstehen.

5.2. Bedeutung von Zytokeratinen beim Mammakarzinom

Das Zytoskelett besteht aus drei unterschiedlichen Fasersystemen, die entsprechend ihrem Durchmesser in die Aktin enthaltenen Mikrofilamente (5-6 nm), die Intermediärfilamente (7-11 nm) und in die Mikrotubuli (20-26 nm) eingeteilt werden. Die Intermediärfilamente zeigen grosse Unterschiede in ihrer Proteinzusammensetzung, so dass heute 6 Klassen (Aminosäuresequenztypen) unterschieden werden können. Demnach bilden die Zytokeratine (Ck) die Sequenztypen I und II (55,56,66).

Intermediärfilament - Protein	Sequenztyp	Gewebsspezifität
Zytokeratine sauer	Typ I	Epithelzellen
Zytokeratine neutral / basisch	Typ II	Epithelzellen
Vimentin	Typ III	Mesenchymale Zellen
Desmin		Muskelzellen
Gliafilamentprotein (GFP)		Astrozyten
Peripherin		Periphere Neuronen

Neurofilament-Protein (L, M, H) Alpha-Internexin	Typ IV	Neuronen Neuronen
Zellkern-Laminin	Typ V	Zellkerne
Nestin	Typ VI	Neuroepitheliale Stammzellen

Tab. 10: Klassifizierung der Intermediärfilamente (56)

Den Katalog der menschlichen Zytokeratine repräsentieren insgesamt 20 individuelle alpha-Keratin-verwandte Proteine (Ck). Zu diesen epithelialen Ck treten noch 10 harte (trichozytische) alpha-Keratine („low-sulfur-Proteine“) der haar- und nagelbildenden Zellen hinzu (55,56).

Alle Ck-Polypeptide lassen sich aufgrund ihrer molekularen Charakteristika zwei Subfamilien zuordnen:

- Typ I: die saure Subfamilie (Ck 9-20)
- Typ II: die neutral/basische Subfamilie (Ck 1-8)

Innerhalb einer Subfamilie zeigen sich relativ grosse Homologien, wobei sie zwischen den Subfamilien relativ gering sind. Typ I- und Typ II-Ck werden koordiniert und paarweise exprimiert, da sich jeweils ein Typ I-Ck mit einem Typ II-Ck zu einem Heterodimer verbinden muss, um dann mit dem zweiten Heterodimer einen für den obligaten Ck-Filament-Aufbau wichtigen Tetramer-Komplex herzustellen. Deshalb enthält eine Epithelzelle mindestens ein Typ-I- und ein Typ-II-Ck-Polypeptid (55,56).

Entsprechend der hauptsächlichen Ck-Gewebsverteilung und dem Differenzierungsgrad werden zwei weitere Ck-Gruppen unterschieden (55,56):

- die höhermolekularen plattenepitheltypischen Ck (Typ I: Ck 9-17, Typ II: Ck 1-6)
- die niedrigermolekularen zylinderepitheltypischen Ck (Typ I: 18-20, Typ II: Ck 7,8)

Eine normale, ruhende weibliche Brustdrüse zeigt ein komplexes, aus zylinder- und plattenepitheltypischen Elementen aufgebautes Ck-Muster, wobei zylinderepitheltypische Ck (ausser Ck 20) selektiv in den luminalen Epithelzellen und die plattenepitheltypischen Ck v. a. in den Myoepithelzellen exprimiert werden. Bei den invasiven Mammakarzinomen dominieren die zylinderepitheltypischen Ck 7 (variabel), 8, 18 und 19, wobei bei dem invasiven duktalem Mammakarzinom fokal auch noch bestimmte plattenepitheltypische Ck nachweisbar sind, von denen Ck 4, 14 und 17 mit höherem Malignitätsgrad korreliert zu sein scheinen (56). Bei benignen oder malignen

Epithelzellalteration bleiben die Ck meist stabil und können so als histogenetische Marker wertvolle diagnostische Hinweise auf Art, Ausgang und Subtypisierung eines epithelialen Tumors geben, die potentiell relevant im Hinblick auf das biologische Verhalten und die Prognose sind (55,56,66).

6. Material und Methoden

6.1. Material

Für diese Arbeit wurden 222 Patientinnen die wegen eines primären Mammakarzinoms an der Universitätsfrauenklinik Münster im Zeitraum von 1988 bis 1993 behandelt wurden unter Zuhilfenahme des archivierten Krankenblattmaterials der Universität Münster retrospektiv erfasst. Das Follow-up von Probandinnen betrug ein bis zehn Jahre.

Von diesem Frauenkollektiv lagen 250 Tumorproben zur Analyse vor, die vom Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Universitätsklinik Münster zur Verfügung gestellt wurden.

Aus diesen in die Paraffinblöcke eingebetteten Gewebeproben wurden die Schnittpräparate angefertigt. Sie dienten dem lichtmikroskopischen Aufdecken der pathologischen Bereiche, die dann als Stanze aus den Paraffinblöcken zur Tissue-Microarray Herstellung entnommen wurden.

6.2. Methoden

Die Patientendaten aus dem Archiv der Universitätsklinik Münster wurden im Hinblick auf die histologischen Diagnosen, Therapieverfahren, Krankheitsentwicklung und archivierten Pathologiedaten (Journalnummer, Journaljahr) durchstudiert. Anhand der Journalangaben wurden im Archiv des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Münster die Paraffinblöcke mit den eingebetteten Mammabiopsien und die Schnittpräparate gefunden. Sie wurden anschliessend mit Hilfe der Tissue Microarray-Methode, immunhistochemischen und lichtmikroskopischen Analysen im Labor des Institutes für Pathologie wie folgt erforscht.

6.2.1. Tissue Microarray (TMA)

6.2.1.1. Das Prinzip der TMA-Methode

Die TMA-Methode ist seit 1998 bekannt und wurde zuerst durch J. Kononen et al. beschrieben (39). Das ist eine Methode, bei der die zu untersuchenden Gewebeareale aus dem Donorblock entnommen und geordnet in einen Empfängerblock „eingepflanzt“ werden. So entsteht ein TMA-Block mit bis zu 1000 Stanzbiopsien (35). Diese Methode hat sich als kostengünstiger, zeitsparender und schonender für das Gewebe im Donorblock (53) im Vergleich zu der früher angewandten, sog. „Sausage-Methode“, erwiesen (7). Bei diesem alten Verfahren wurden grössere Gewebeproben aus dem Donorblock, weniger geordnet als dies die neue Methode ermöglicht, auf dem Empfängerblock positioniert. Dies schränkte die Menge der verschiedenen Gewebeproben in einem Block stark ein und erschwerte ausserdem das Abgrenzen der Proben gegeneinander deutlich (63).

Die TMA-Methode wird für die Untersuchung von molekularen Veränderungen, v. a. bei immunhistochemischen und molekularbiologischen (z. B. bei der In-situ-Hybridisierung) Analysen, angewendet und findet zurzeit breite Anwendung in der Krebsforschung (15,16,25,60).

6.2.1.2. Die TMA-Herstellungstechnik

Zuerst wurden in den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten lichtmikroskopisch die für die Arbeit interessanten malignen Areale gesucht. Die Lokalisation jedes Areals wurde danach auf dem zugehörigen Paraffinblock mit Mammagewebe identifiziert. Mit Hilfe eines TMA-Stanzgerätes (Beecher Instruments, Microarray Technology, Maryland, USA) wurde aus dieser Region eine zylinderförmige Gewebebiopsie von 0,6 mm Durchmesser entnommen. Anschliessend wurde dieser Gewebszylinder in einen vorbereiteten passenden Hohlraum des Empfängerblocks (= TMA-Block) positioniert. Alle Ausstanzungen nahmen die für sie genau bestimmten Plätze auf dem TMA-Block ein, so dass man die entstehenden Achsenkoordinaten¹ mit den zugehörigen Patientendaten (Patientennamen, Journaljahr, Journalnummer) in einer Excel-Tabelle

(Microsoft Office 2000) erfassen konnte. Die Gewebszylinder wurden in einem Abstand von 0,8 mm voneinander in dem TMA-Block platziert. Um eine bessere statistische Auswertbarkeit zu erreichen wurden drei Blöcke mit den gleichen Biopsien angefertigt. Jeder TMA-Block enthielt 500 Biopsien.

¹ Auf einem TMA-Block befinden sich fünf Quadrate (I-V). Jedes Quadrat enthält zehn horizontale (x-Achse: A-J) und zehn vertikale (y-Achse: 1-10) Reihen mit insgesamt hundert Biopsien. Die Koordinaten jeder Biopsie können somit genau angegeben werden.

6.2.2. Immunhistochemische Analyse

Die Immunhistochemie benutzt die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen zur präzisen Lokalisation von Epitopen gesuchter Antigene. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden konnten daher antigene Strukturen in Schnittpräparaten präzise lokalisiert werden.

6.2.2.1. Verwendete Reagenzien

- ChemMate™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) (LSAB K 5005)

Biotinylierte Anti-Maus und Anti-Kaninchen Ziegen-Immunglobuline in gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Natriumazid (DakoChemMate™).

- ChemMate™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) (LSAB K 5005)

An alkalische Phosphatase (AP) konjugiertes Streptavidin in gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Konservierungsmittel (DakoChemMate™).

- ChemMate™ AP Substrate Buffer (LSAB K 5005)

Gepufferte Lösung, welche Konservierungsmittel enthält

- ChemMate™ Cromogen Red 1/ Red 2/ Red 3 (LSAB K 5005)

Jeweils 28-fach konzentriert

- ChemMate™ Levamisole (LSAB K 5005)

501-fach konzentriert

Gepufferte Lösung, welche Levamisol enthält

- Substrate Working Solution (CHROM)

Chromogen Red-containing Substrate Working Solution (CHROM) wird angesetzt durch sorgfältiges Mischen von 25 Teilen ChemMate™ AP Substrate Buffer mit 1 Teil des ChemMate™ Chromogen Red 1, 1 Teil des ChemMate™ Chromogen Red 2 und 1 Teil des ChemMate™ Chromogen Red 3, genau in dieser Reihenfolge und unter gründlichem Mischen nach der Zugabe jedes Chromogens. Das erforderliche Chromogen-Lösungsvolumen ist abhängig von der Anzahl der Objektträger und Grösse anzufärbender Gewebeschnitte. Die Zusammensetzung der Komponenten wird nach der Dako-Tabelle „Chromogen Ansatz bei der AP-Methode ChemMate K 5005“ berechnet. Um eine falsch positive Anfärbung durch die endogene alkalische Phosphatase zu vermeiden, wird die Blockierung der AP durch die Zugabe von 1 Tropfen ChemMate™ Levamisole pro 10 ml ChemMate™ AP Substrate Buffer nach dem ChemMate™ Chromogen Red 2 bewirkt. Nach dem gründlichen Mischen wird der ChemMate™ Chromogen Red 3 zugegeben.

- DakoCytomation Wash Buffer (Code S 3006)

Der Waschpuffer besteht aus 500ml 20fach konzentrierter Tris-Pufferlösung mit 0,05% TWEEN 20. Zum Gebrauch wurde dieses Waschpuffervolumen mit 9,5 l deionisiertem Wasser verdünnt.

- Citratlösung

10,5g Citronensäuremonohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) wurden auf 500ml Aqua dest. aufgefüllt, um eine 0,1M Citronensäure zu gewinnen (Stammlösung A). 29,41g Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$) wurden auf 1000ml Aqua dest. aufgefüllt, um 0,1M Natriumcitrat zu erreichen (Stammlösung B). 18 ml der Stammlösung A wurden mit 82 ml der Stammlösung B gemischt. Die entstandenen 100 ml wurden mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt, um die notwendigen 10mM Citratpuffer zu erreichen. Anschliessend wurde ein pH-Wert von 6,0 eingestellt.

6.2.2.2. Prozedur

Aus dem TMA-Block wurden am Rotationsmikrotom (Serien-Nr. 6288, Typ-Nr. HM 360) 3-4 µm dicke Schnitte hergestellt. Sie wurden dann auf gebrauchsfertig beschichtete Objektträger („Superfrost plus“ von Firma Menzel) aufgezogen.

Um gutes Haften zu gewährleisten, wurden die Objektträger über Nacht bei 56 °C im Brutschrank getrocknet.

Anschliessend wurde die Entparaffinierung der Schnitte durchgeführt. Die Schnitte wurden:

- auf Raumtemperatur abgekühlt
- 2 X 20 Min. in Xylol entparaffiniert
- 2 X in 99%igem, 1 X in 96%igem, 1 X in 80%igem, 1 X in 70%igem Alkohol und anschliessend in Aqua dest. rehydriert (genau in dieser Reihenfolge).

Um eine eventuelle Antigenmaskierung durch die Formalinfixierung und die Paraffineinbettung zu entfernen, wurden die Schnitte mittels Hitze vorbehandelt. Sie wurden in die mit 10mM Citratlösung gefüllten Küvetten platziert, die dann in einem Steamer (Dampfgarer der Firma Braun) 30 Min. auf 100°C erhitzt und danach im kalten Leitungswasser abgekühlt wurden.

Für die Färbung der vorbehandelten Schnitte wurde die Labelled-Strept-Avidin-Methode (LSAB) im DakoAutostainer-Gerät (Code S 3400) angewendet, die auf der Reaktion von Streptavidin mit Biotin basiert. Die LSAB-Methode ist ein dreistufiges Verfahren, bei dem der erste Schritt in der Inkubation des Gewebes mit einem optimal verdünnten primären Antikörper besteht. Der zweite Schritt beinhaltet die Inkubation mit ChemMate™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und der dritte die Inkubation mit ChemMate™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP). Die Reaktion wird schliesslich mit Hilfe von RED Chromogen durch die Rotfärbung des Komplexes visualisiert. Im ersten Schritt wurde der DakoAutostainer auf die Anzahl der Objektträger und die Reagenzien mit Inkubationszeiten in den Protokollvorlagen programmiert. Die schon 5 Min. in DakoCytomation Wash Buffer angefeuchteten Schnitte wurden nach dem programmierten Objektträgeranordnungsplan in dem Autostainer positioniert und mit (je nach Schnittgrösse 100-300 µl) der verdünnten Primäantikörper (Ck 1, Ck 5, Ck 8/18, Ck 10 und Ck 19) 25 Min. inkubiert.

Antikörper	Firma	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung	+ Kontrolle
Ck 1	Novocastra	34βB4	1:150	30' Steamer	Haut
Ck 5	Zytomed	D5/16B4	1:100	30' Steamer	Mamma, Haut, Prostata
Ck 8/18	Dianova	5D3	1:40	30' Steamer	Mamma
Ck 10	Dako	DE-K10	1:400	30' Steamer	Haut
Ck 14	Dianova	LL002	1:50	30' Steamer	Mamma
Ck 19	Quartett	KS19.1	1:500	30' Steamer	Mamma

Tab. 11: Verwendete Antikörper

Im zweiten Schritt wurden die Schnitte mit Waschpuffer abgespült und mit dem Biotin-Antikörper (je nach Schnittgrösse 100-300 µl) für 20 Min. inkubiert. Im dritten Schritt wurden diese mit enzymmarkiertem Streptavidin für 20 Min. (je nach Schnittgrösse 100-300 µl) inkubiert. Nach dem gründlichen Abspülen mit dem Waschpuffer erfolgte die Färbung des Komplexes durch die Inkubation mit Chromogen für 2 mal 8 Min. Anschliessend wurden die Schnitte aus dem Autostainer in die mit Aqua dest. gefüllten Küvetten gestellt. Um die Zellkerne deutlich darzustellen wurde die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin für 3 Min. und Bläuvorgang unter fliessendem Wasser für 5 Min. vorgenommen.

Die Konservierung der Schnitte wurde durch:

- Aqua dest.
 - die aufsteigende Alkoholreihe (1X 70%, 1 X 80%, 1 X 96%, 2 X 99%)
 - Xylol
 - Vitro Clud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik der Firma R. Langenbrinck)
 - Deckglas (schützt das Gewebe vor äusseren Einflüssen, z.B. Kratzer)
- genau in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt.

6.2.3. Lichtmikroskopische Analyse

Die lichtmikroskopische Auswertung wurde semiquantitativ bewertet, wobei sowohl der Prozentsatz positiver Zellen als auch die Anfärbeintensität in die Wertung eingingen.

Viele Antikörper weisen eine artspezifische, intrazelluläre Lokalisation auf, so dass man je nach dem zu untersuchenden Antikörper eine zytoplasmatische, nukleäre oder membranöse Expression primär beurteilt. Bei den Cytokeratinen (Ck 1, Ck 5, Ck 8/18, Ck 10, Ck 14, Ck 19) wurde die zytoplasmatische Anfärbung begutachtet. Die Anzahl der Zellen mit den jeweiligen Ck-Expressionen wurde für jede TMA-Stanzbiopsie prozentuell erfasst und dann in gleich grosse Fraktionen (1-4) nach den erreichten Prozentsätzen aufgeteilt. Die Kategorisierungskriterien sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Kategorisierungskriterien nach Prozentsatz positiver Zellen				
	1	2	3	4
Ck 1	Positiv, sobald mindestens eine Zelle positiv ist			
Ck 5	Negativ	0-10%	11-50%	51-100%
Ck 8/18	Negativ	0-30%	31-70%	71-100%
Ck 10	Positiv, sobald mindestens eine Zelle positiv ist			
Ck 14	Negativ	0-10%	11-40%	41-100%
Ck19	Negativ	0-30%	31-70%	71-100%

Tab. 12: Kategorisierung der untersuchten Ck-Antikörper

Die weiteren Tumormarker (ER, PR, c-erbB-2, p 53, Ki-67, Bcl-2, Cyclin D1, EGFR, Vim, EMA) wurden freundlicherweise von Frau S. Farahani zur Verfügung gestellt.

6.2.4. Statistische Verfahren

Statistische Verfahren wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn E. Korsching durchgeführt und beschrieben.

6.2.4.1. Bootstrap Verfahren

Bei der statistischen Analyse wurde u. a. das Bootstrapverfahren, das zu den sogenannten Resampling Methoden gehört, angewendet. Das Bootstrap-Verfahren durchläuft in einer bestimmten Weise den Raum der kombinatorischen Möglichkeiten der mit der real gemessenen Stichprobe festgelegt wurde, indem viele bzw. im Idealfall alle möglichen Stichproben "mit Zurücklegen" gezogen werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderer statistischer Verfahren liegt vor allem daran, dass in Bezug auf Stichprobe und Grundgesamtheit deutlich weniger a priori Annahmen gemacht werden müssen, die in ihrer Gültigkeit oft nicht überprüft werden können. Andererseits ist das Bootstrap-Verfahren stark von der Stichprobe abhängig, sodass man Qualität und Umfang der Stichprobe prüfen muss, bevor diese Methode eingesetzt werden kann (24,31).

Das praktische Prozedere bestand darin aus dem Kollektiv von 222 Patientinnen für die einzelnen Immunfärbungen zufällig 222 „Bootstrap-Stichproben“ zu ziehen. Nachdem dieser Vorgang 100 Mal (empirische Untergrenze bei dem Bootstrap-Verfahren) wiederholt wurde, wurden die gewonnenen 100 Bootstrap-Stichproben und die zu untersuchende Originalstichprobe, wie im folgenden Kapitel beschrieben, weiterverarbeitet. Am Ende dieses Verfahrens wurde der Mittelwert der Originalstichprobe mit den Werten der Bootstrap-Stichproben verglichen und das Konfidenzintervall um den geschätzten Wert der Originalstichprobe berechnet.

6.2.4.2. Permutationsverfahren

Neben dem Bootstrap wurde eine weitere Art einer Resampling-Technik, ein Permutationsverfahren, verwendet. Bei diesem Verfahren werden die gesuchten

Parameter anhand der Permutationsverteilung bestimmt, wobei die Zuordnung von Daten verändert wird, nicht aber die Datenwerte.

Die gemessenen Daten wurden in eine Test-Gruppe (EGFR, Vim, MIB-1, p 53, erbB2, bcl2, CyclinD1, PR, EMA, ER) und eine Referenz-Gruppe (Ck 1, 5, 8/18, 10, 14, 19) aufgeteilt. Das Prinzip dieser Aufteilung basierte auf der biologischen Modellvorstellung, die sich u. a. an Progenitor-Zell-Markern und möglichen Schaltstellen, verantwortlich für Kanzerogenese und Progression, orientiert. Somit wurde die Test-Gruppe aus den Molekülen gebildet, die für das Tumorgeschehen charakteristisch sind. Die Referenz-Gruppe enthielt Marker, die für den Typ und das Entwicklungsstadium typisch waren. Für jeden Referenzfaktor wurde eine 2D-Grafik gezeichnet, wobei auf der x-Achse alle Testfaktoren und auf der y-Achse die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Testfaktoren aufgetragen wurden. Dadurch konnte man die Anordnungskonstellation der Testfaktoren gegen je einen der Referenzfaktoren als Punktwolke visualisieren. Anschliessend wurde die lineare Regression und die Summe der quadratischen Abweichungen berechnet. Die Summe dieser Abweichungen repräsentiert die Qualität der Konstellation der Situation. Sie ergibt sich aus dem Einfluss der Störgrösse. Diese Grösse musste minimiert werden, um die optimalen regulativen Zusammenhänge zu erfassen. Dafür wurden die Permutationsschritte vorgenommen. Die Anordnung der x-Achse wurde so lange permutiert bis in diesem konkreten Fall alle Permutationen durchgelaufen wurden. Als Ergebnis ergab sich eine Konstellation von verbundenen Referenzsituationen, die durch die kleinste Summe der Fehlerquadrate bezüglich aller Referenzsituationen charakterisiert war. Diese beschrieb die Regulationszusammenhänge der betrachteten Faktoren am besten. Drei qualitative Ergebnisse waren zu erwarten: gleichsinniger, gegensinniger und kein regulativer Zusammenhang der Faktoren.

Die Resampling-Verfahren wurden in der Statistiksoftware SPlus 6.2 implementiert.

Die Graphik „Einteilung der Patientinnen in verschiedene Alterstufen“ und die Überlebensfunktionen wurden mit SPSS Version 11.5 erstellt.

Die Resultate wurden bei p-Werten $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

7. Ergebnisse

Für diese Arbeit standen 222 Mammabiopsien zur Verfügung. Dieses Material wurde an der Universitätsfrauenklinik Münster den an einem Mammakarzinom operierten Patientinnen entnommen. pTNM-Stadium und Grading waren postoperativ bekannt. Das Beobachtungsintervall erstreckte sich zwischen 0 und 76 Monaten (mediane Beobachtungszeit - 3 Jahre). Von allen Frauen war das Alter bei der Erstdiagnose bekannt: die jüngste Patientin war 13 und die Älteste 84 Jahre alt. Das Durchschnittsalter der Patientinnen lag bei ca. 55 Jahren.

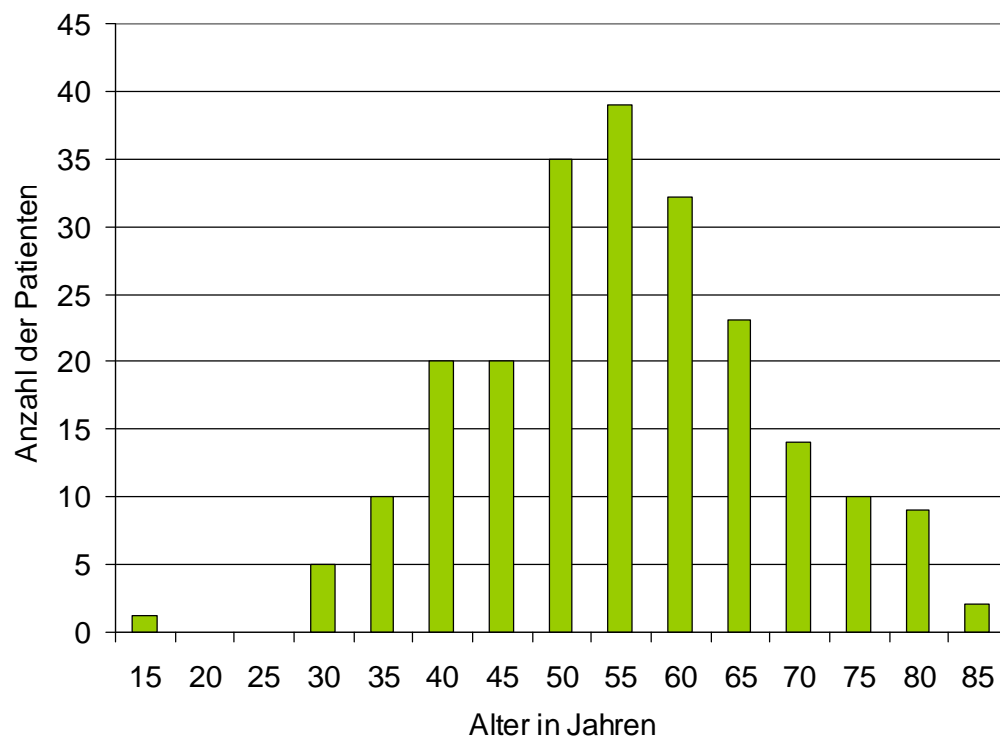


Abb. 1: Einteilung der Patientinnen in verschiedene Alterstufen

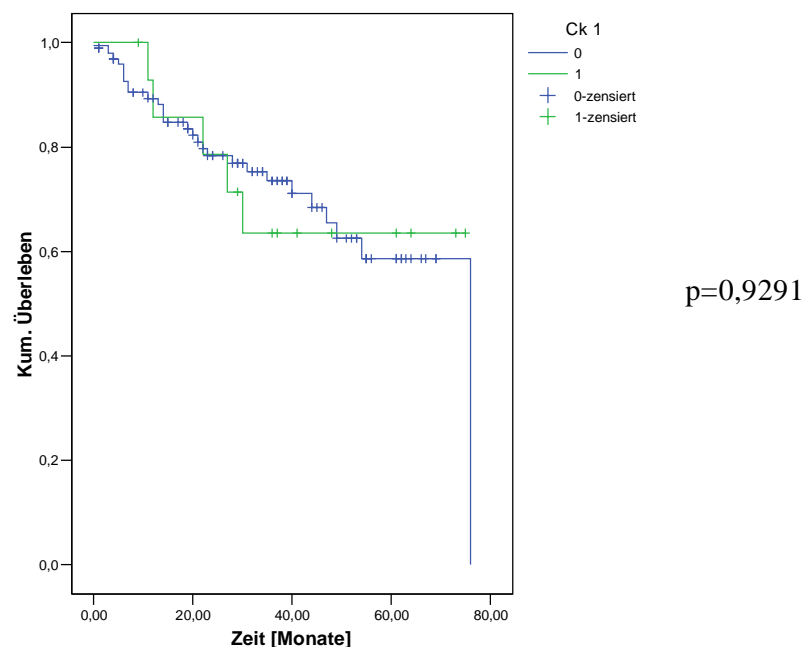
Von den 222 Mammabiopsien waren 121 Tumore für alle Tumormarker auswertbar.

7.1. Überlebenskurven nach Kaplan-Meier

Die folgenden Überlebensfunktionen in Abhängigkeit von untersuchten Cytokeratinen differenzieren die positiven Fälle der einzelnen Prognosefaktoren nach der Stärke ihrer immunhistochemischen Farbintensität (0 = negativ, 1-3 = schwach-stark positiv).

Um die Analyse der Ergebnisse zu vertiefen wurde zu jedem Marker mit mehr als zwei verschiedenen Farbintensitäten eine zusätzliche dichotome Auswertung durchgeführt. Dabei wurden alle positiven Fälle als eine Gruppe dargestellt und mit den negativen Fällen verglichen (0 = negativ, 1 = positiv).

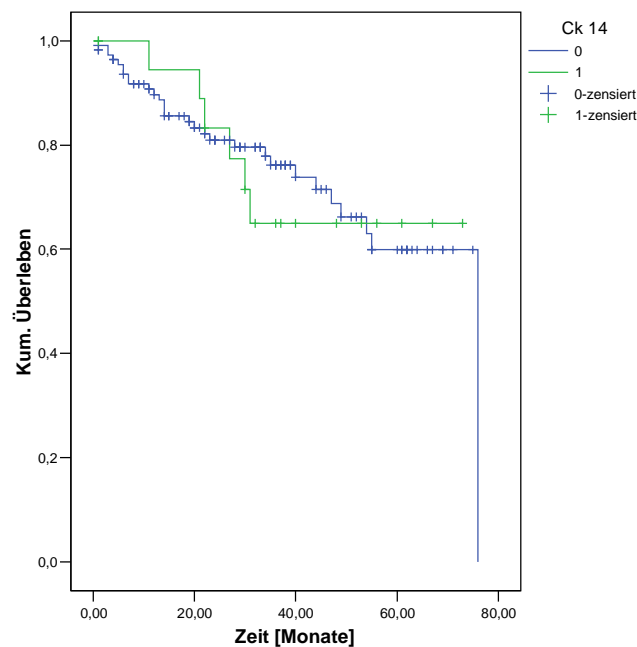
Überleben in Abhängigkeit von Ck 1



Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für Ck 1 keinen Unterschied in den Überlebensraten der Ck 1 (+)- und (-)-Patientinnen. Die Überlebenskurven ergeben, dass die Überlebensrate bei den Ck 1 (+)-Patientinnen nach ca. 3 Jahren etwa 62% und bei den Ck 1 (-)-Patientinnen etwa 73% beträgt. Bei der weiteren Betrachtung zeigt sich der Kurvenverlauf bei dem Ck 1 (+)-Kollektiv unverändert, d. h. diese liegt nach ca. 5

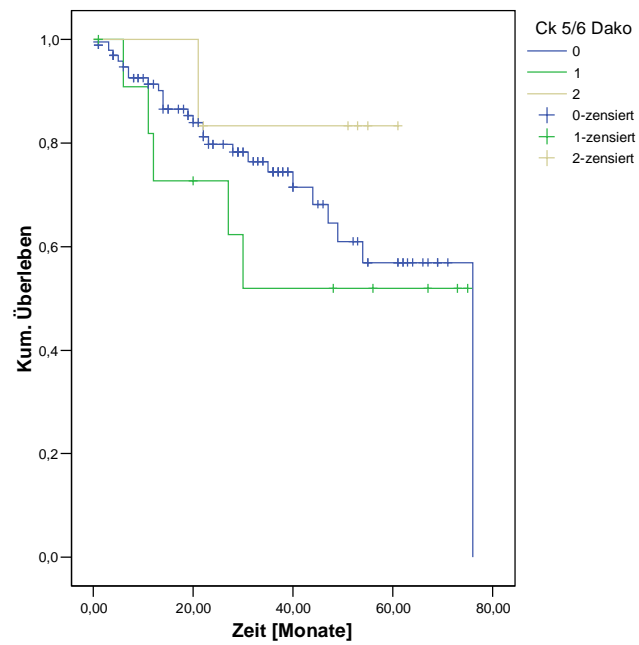
Jahren bei der gleichen Prozentzahl (62%), wobei die Ck 1 (-)-Gruppe auf etwa 58% sinkt. In dieser Arbeit kann kein Unterschied im Überleben zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Überleben in Abhängigkeit von Ck 14

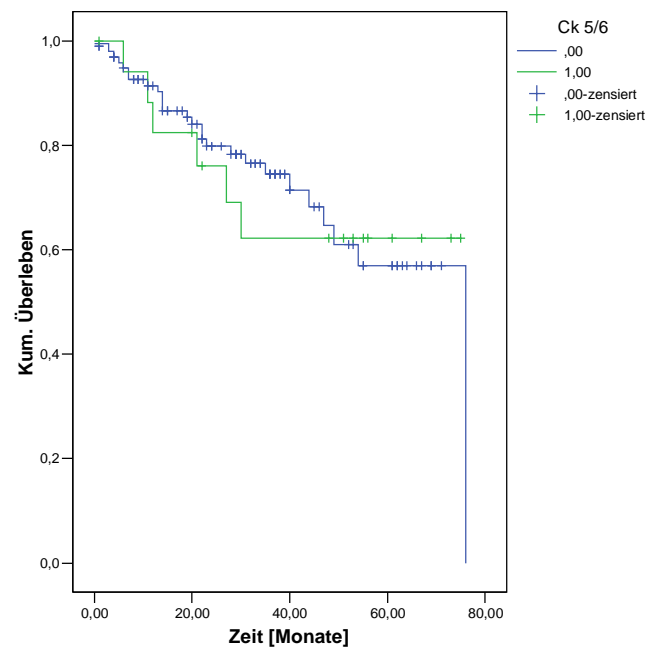


Die Ergebnisse dieser Arbeit für Ck 14 zeigen eine ähnliche Überlebenskurve wie bei dem Ck 1. Die Ck 14 (+)-Frauen zeigen ein Überleben von 65% und die Ck 14 (-) von 76% nach 3 Jahren Verlaufskontrolle. Bei der Ck 14 (+)-Gruppe verläuft die Überlebenskurve auch nach den zwei folgenden Beobachtungsjahren unverändert und bleibt nach 5 Jahren weiterhin bei 65%, wobei bei der Ck 14 (-)-Gruppe die Kurve fällt und nach 5 Jahren eine Überlebensrate von ca. 60% zeigt. Aufgrund der kleinen Anzahl Ereignisse (Ck 14 (+): 6 von 20; Ck 14 (-): 29 von 112), und der aus der zu kleinen Anzahl Patientinnen folgenden kurzen medianen Beobachtungszeit von 3 Jahren, kann auch bei dem Ck 14 kein Unterschied im Überleben nachgewiesen werden.

Überleben in Abhängigkeit von Ck 5



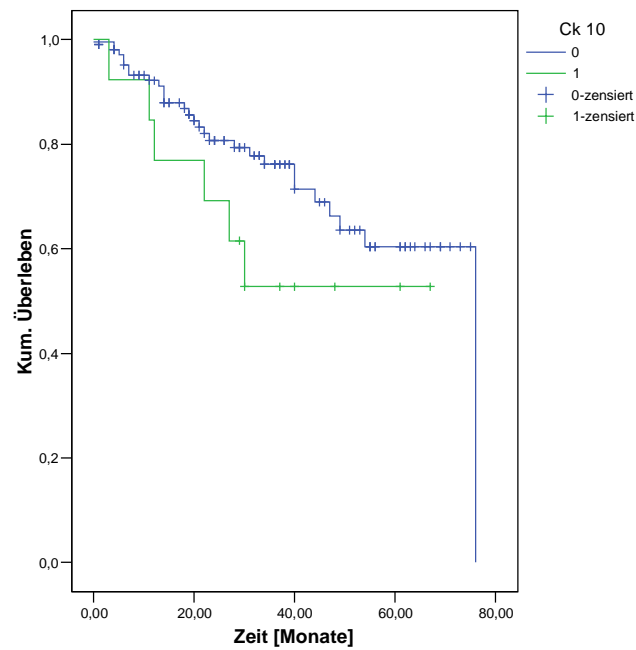
Dichotome Auswertung



Bei den Ck 5 (+)-Patientinnen liegen die Überlebensraten bei der Gruppe 1 nach 3 Jahren bei etwa 53% und bei der Gruppe 2 bei etwa 83%. Innerhalb von weiteren zwei Jahren zeigen diese beiden Kurven keine Veränderung, somit bleiben die Überlebensraten nach 5 Jahren Beobachtungszeit unverändert. Die dichotome Auswertung zeigt, dass die Ck 5 (+)-Patientinnen nach ca. 3 Jahren ein Überleben von etwa 63% und die Ck 5 (-)-Frauen von etwa 75% aufweisen. Nach 5 Beobachtungsjahren sind es unveränderte 63% für die Ck 5 (+)-, aber nur 57% für die Ck 5 (-)-Gruppe.

Bei den Ergebnissen der Ck 5 zeigt sich, dass auf dem Signifikanzniveau von 5% kein Unterschied zwischen den differenzierten positiven Gruppen 1, 2 der Ck 5 wie auch zwischen den Ck 5 (+)- und Ck 5 (-)-Patientinnen nachgewiesen werden kann. Auch hier gibt es mit 6 Ereignissen (von 18 Patientinnen) bei den Ck 5 (+)- und 26 Ereignissen (von 98 Patientinnen) bei den Ck 5 (-)-Patientinnen nicht genügend Ereignisse. Die Gruppe 1 hat ein besseres und die Gruppe 2 ein schlechteres Überleben als die Ck 5 (-) Gruppe.

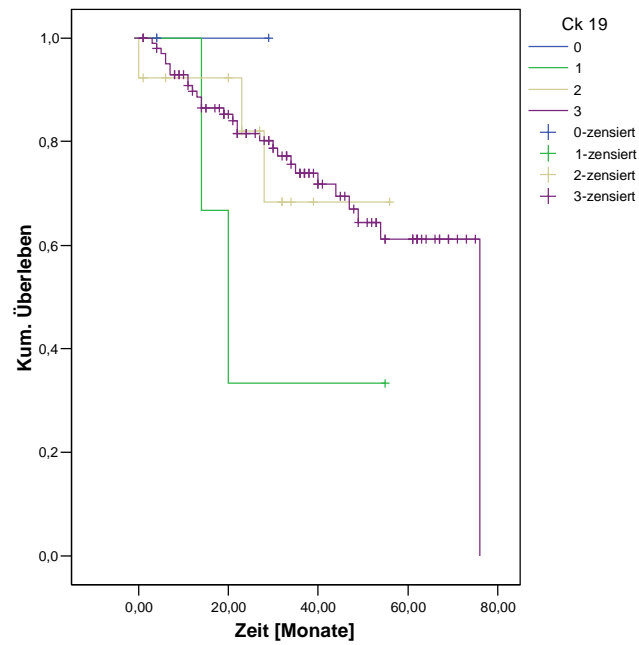
Überleben in Abhängigkeit von Ck 10



$p=0,1860$

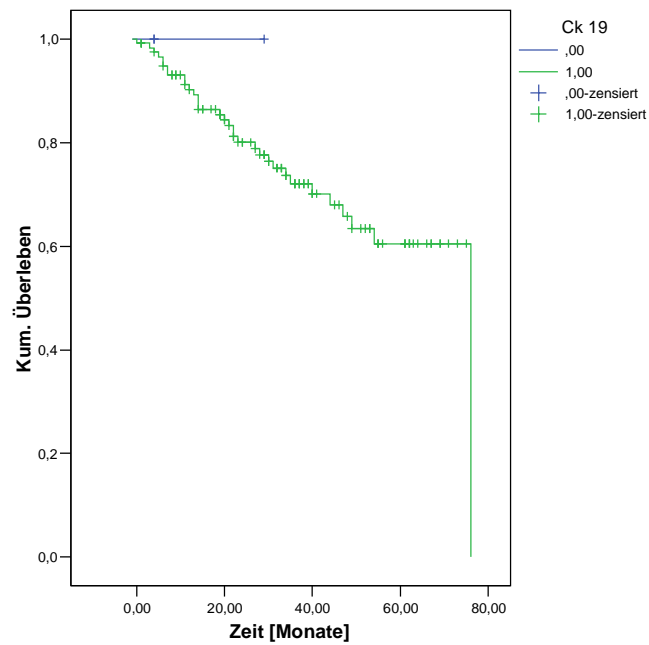
Die Untersuchung der Ck 10 zeigt einen Unterschied in den Überlebensraten der Ck 10 (+)- und Ck 10 (-)-Patientinnen, der zu einem prognostisch günstigeren Verlauf der Ck 10 (-)-Patientinnen führt. Nach 3 Jahren Beobachtungszeit sind in der Ck 10 (+)-Gruppe 52%, in der Ck 10 (-)-Gruppe 76% Überlebende. Nach 5 Jahren liegt die Überlebensrate in der Ck 10 (+)-Gruppe unverändert bei 52% und in der Ck 10 (-)-Gruppe bei ca. 60% der Frauen.

Überleben in Abhängigkeit von Ck 19



$p=0,5414$

Dichotome Auswertung

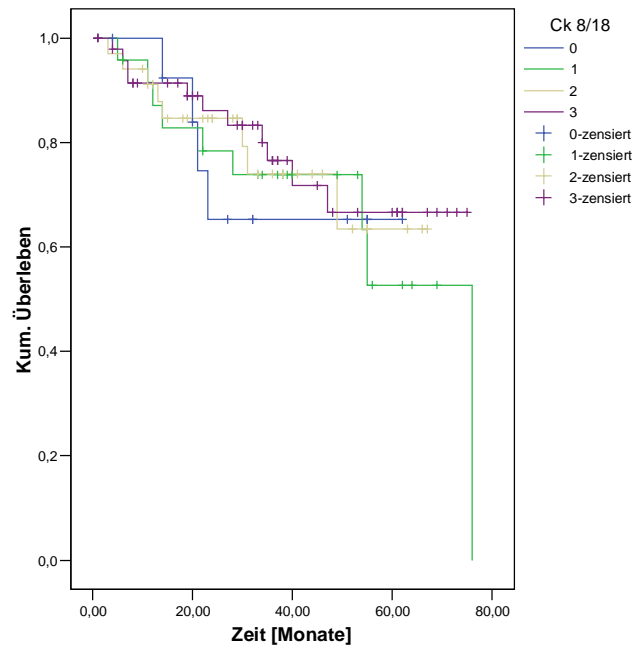


$p=0,58$

Nach 3 Jahren betragen die Überlebensraten der Ck 19 (+) Frauen in der Gruppe 1 ca. 35%, in der Gruppe 2 ca. 69% und in der Gruppe 3 ca. 75%. Nach etwa 4,5 Jahren endet die Beobachtung der Gruppen 1 und 2. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich ein Überleben in der Gruppe 1 von ca. 35%, in der Gruppe 2 von ca. 69% und in der Gruppe 3 von ca. 61%. Die Überlebenskurven der Gruppen 1-3 zeigen Unterschiede in den Überlebensraten, sie können aber auch hier wegen der kleinen Anzahl Ereignisse (1. Gruppe: 2 von 3; 2. Gruppe: 3 von 13; 3. Gruppe: 28 von 103) auf 5%-Niveau nicht nachgewiesen werden.

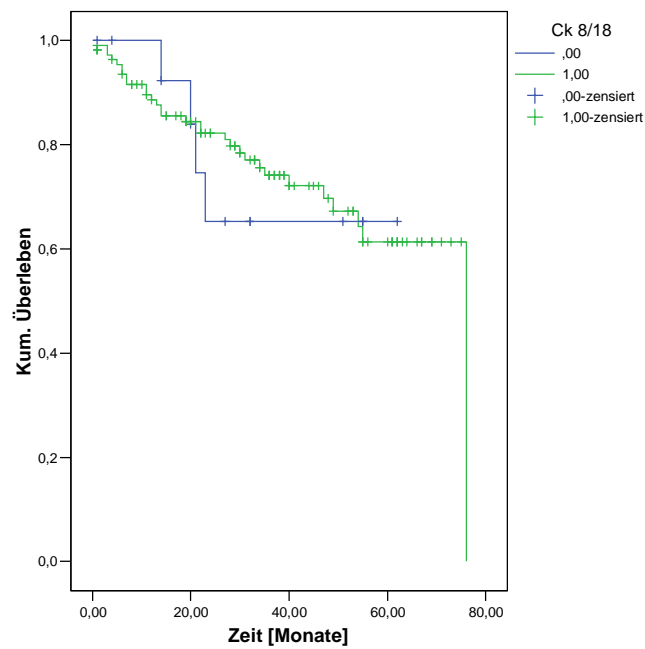
Da bis auf drei Tumore alle das Ck 19 exprimieren, ist der Vergleich der Ck 19 (+)- und Ck 19 (-)-Gruppen erschwert. Beim Ausscheiden der letzten Ck 19 (-) Patientin nach 2,5 Jahren betragen die Überlebensraten der Ck 19 (+)-Frauen ca. 78% und der Ck 19 (-)-Frauen 100% ($p=0.58$).

Überleben in Abhängigkeit von Ck 8/18



$p=0,9386$

Dichotome Auswertung



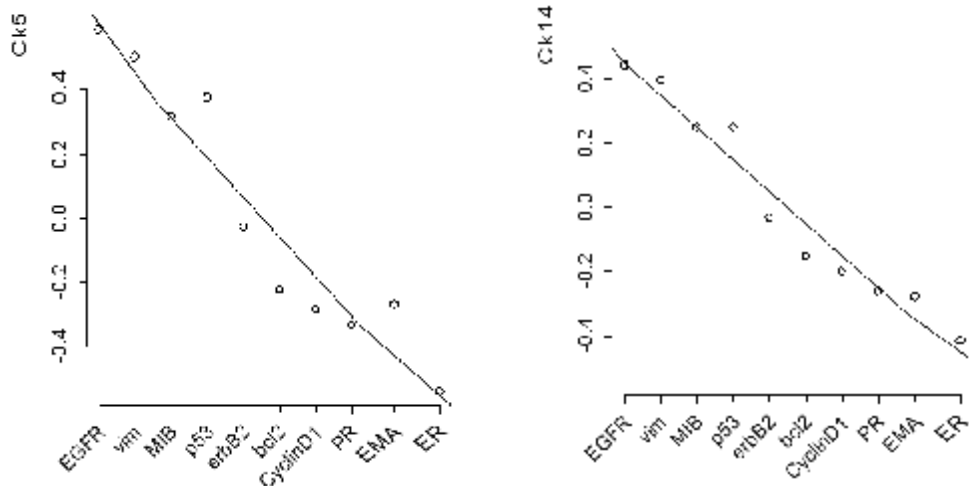
$p=0,86$

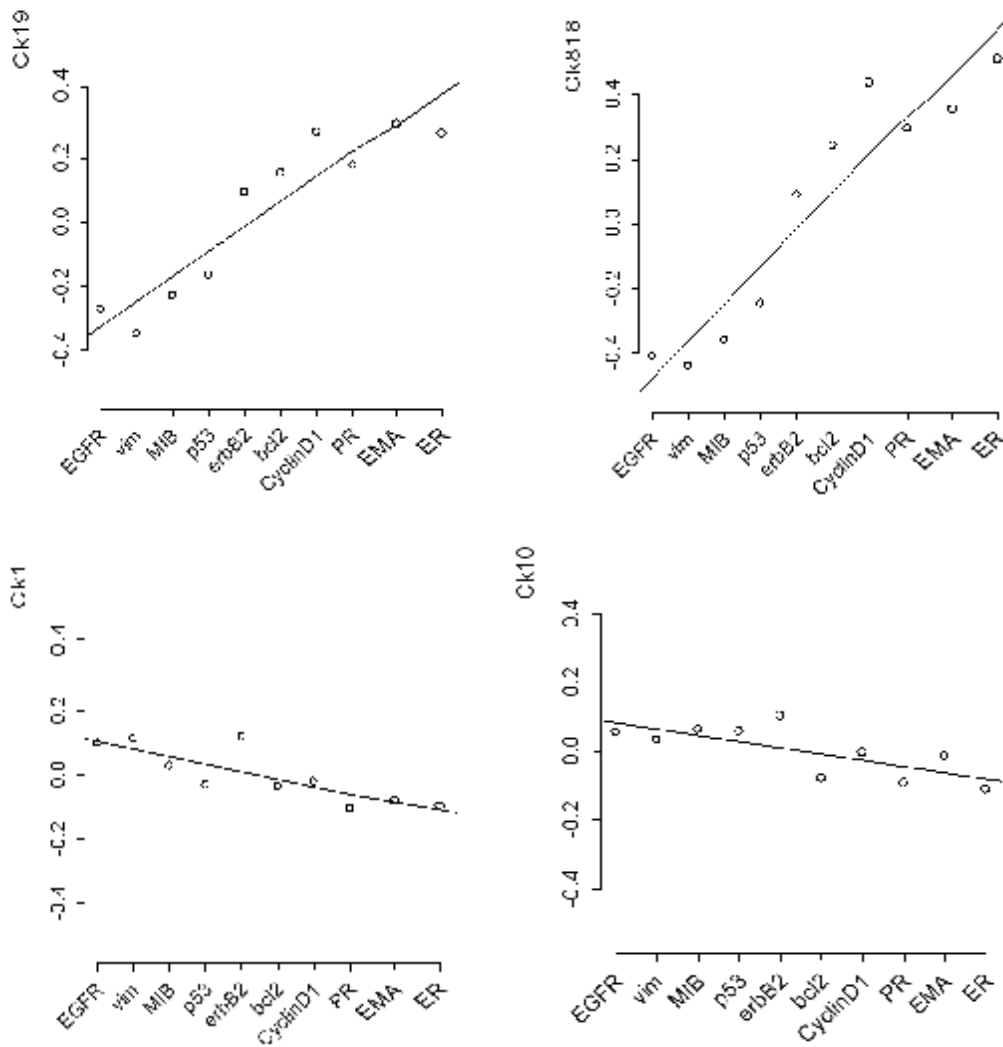
Bei den Gruppen 1 und 2 der Ck 8/18 betragen die 3 Jahre-Überlebensraten jeweils 75%, bei der Gruppe 3 ist sie etwa 77%. Nach 5 Jahren betragen die Überlebensraten ca. 52% bei der Gruppe 1, ca. 63% bei der Gruppe 2 und ca. 66% bei der Gruppe 3. Die Ck 8/18 (-)-Gruppe zeigt sowohl nach 3 wie auch nach 5 Jahren eine Überlebensrate von etwa 65%.

Bei der durch die kleine Anzahl Patientinnen gegebenen medianen Beobachtungszeit von etwa 3 Jahren und aufgrund der wenigen Ereignisse (1 Gruppe: 9 von 24; 2 Gruppe: 8 von 34; 3 Gruppe: 11 von 50; Ck 8/18 (-): 4 von 15) kann kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen 1-3 bezüglich des Überlebens nachgewiesen werden. Auch die dichotome Auswertung zeigt keinen Unterschied zwischen den Ck 8/18 (-)- und Ck 8/18 (+)-Fällen.

7.2. Ergebnisse der Bootstrap- und Permutationsverfahren

Implementierung eines Bootstrap-Algorithmus zur Evaluation Cytokeratin-abhängiger Regulationsmuster von 16 immunohistochemisch erfassbaren Markern im invasiven Mammakarzinom, zeigt bei den vorliegenden 222 Patientinnenfällen folgende Ergebnisse:





EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor

vim = Vimentin

MIB-1 = monoklonal Anti-Ki-67-AK

p53 = Antionkogen

erbB2 = Her2-neu = Human Epithelial growth factor Receptor, Onkogen

bcl 2 = B-Cell-Lymphoma, Onkogen

Cyclin D1 = Onkogen

PR = Progesteron Receptor

EMA = Epitheliales Membranantigen

ER = Estrogen Receptor

Abb. 2: Regulationsverhältnis der beobachteten Test- und Referenzfaktoren

Diese Ergebnisse (siehe bitte auch Tab. 13 mit p-Werten auf der nächsten Seite) zeigen deutlich, dass die Cytokeratine in folgende Gruppen aufgeteilt werden können:

- I: Ck 5 und 14 verhalten sich gleichsinnig bzgl. der betrachteten Testfaktoren
- II: Ck 8/18 und 19 verhalten sich gleichsinnig bzgl. der betrachteten Testfaktoren
- III: Ck 1 und 10 spielen keine Rolle bzgl. der betrachteten Testfaktoren
- IV: Ck 5, 14 und Ck 8/18, 19 verhalten sich gegensinnig bzgl. der betrachteten Testfaktoren

Die Testfaktoren zeigen auch die gleiche Dreiteilung: die Testfaktoren EGFR, Vimentin, MIB-1, p53 zeigen eine gegensinnige Regulation bzgl. der hier untersuchten Zytokeratine, wobei die Testfaktoren erbB2 und bcl2 keine Rolle bzgl. der Referenzfaktoren spielen.

	Ck5	Ck8/18	Vimentin	EGFR	erbB2	ER	PR	Ck14	Ck19	Cyclin D1	Mib1	p53	bcl-2	Ck1	Ck10	EMA
Ck5		0,0005	0,0005	0,0001	0,9535	0,0001	0,0008	0,0479	0,1354	0,0009	0,0001	0,059	0,0209	0,6271	0,8887	0,16
Ck8/18	0,0005		0,0016	0,0012	0,1971	0,0001	0,0002	0,0403	0,0001	0,0005	0,0002	0,0027	0,209	0,2852	0,5393	0,005
Vimentin	0,0005	0,0016		0,0177	0,1874	0,0001	0,0063	0,6689	0,0001	0,0261	0,2149	0,0189	0,1506	0,6245	0,9414	0,02
EGFR	0,0001	0,0012	0,0177		0,0282	0,2787	0,1084	0,0171	0,0823	0,1393	0,0001	0,094	0,2814	0,5254	0,1596	0,17
erbB2	0,9535	0,1971	0,1874	0,0282		0,0126	0,0004	0,004	0,7402	0,2637	0,0001	0,3535	0,0557	0,0005	0,0005	0,12
ER	0,0001	0,0001	0,0001	0,2787	0,0126		0,0001	0,3768	0,0012	0,0005	0,0165	0,0001	0,0001	0,6055	0,2115	0,15
PR	0,0008	0,0002	0,0063	0,1084	0,0004	0,0001		0,6042	0,0805	0,0005	0,0001	0,0106	0,0001	0,8909	0,7089	0,23
Ck14	0,0479	0,0403	0,6689	0,0171	0,004	0,3768	0,6042		0,5807	0,9917	0,01	0,1473	0,0281	0,0005	0,0001	0,69
Ck19	0,1354	0,0001	0,0001	0,0823	0,7402	0,0012	0,0805	0,5807		0,0005	0,0606	0,0783	0,0677	0,6057	0,5795	0,0001
Cyclin D1	0,0009	0,0005	0,0261	0,1393	0,2637	0,0005	0,0005	0,9917	0,0005		0,0301	0,01	0,0064	0,1188	0,4778	0,013
Mib1	0,0001	0,0002	0,2149	0,0001	0,0001	0,0165	0,0001	0,01	0,0606	0,0301		0,0001	0,3311	0,0128	0,0231	0,016
p53	0,059	0,0027	0,0189	0,094	0,3535	0,0001	0,0106	0,1473	0,0783	0,01	0,0001		0,2803	0,004	0,1938	0,49
bcl-2	0,0209	0,209	0,1506	0,2814	0,0557	0,0001	0,0001	0,0281	0,0677	0,0064	0,3311	0,2803		0,701	0,1656	0,9
Ck1	0,6271	0,2852	0,6245	0,5254	0,0005	0,6055	0,8909	0,0005	0,6057	0,1188	0,0128	0,004	0,701		0,0001	0,4
Ck10	0,8887	0,5393	0,9414	0,1596	0,0005	0,2115	0,7089	0,0001	0,5795	0,4778	0,0231	0,1938	0,1656	0,0001		0,4
EMA	0,16	0,005	0,02	0,17	0,12	0,15	0,23	0,69	0,0001	0,013	0,016	0,49	0,9	0,4	0,4	

Tab. 13: Korrelationen (p-Werte) der beobachteten Test- und Referenzfaktoren

Signifikanzniveau - 5%

Gelb markiert – signifikant negative Korrelation

Grün markiert – signifikant positive Korrelation

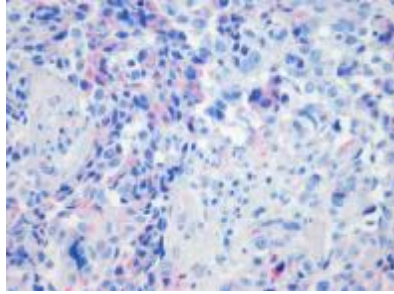


Abb. 1: Fokal schwache immunhistochemische Färbung für Ck 1 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)

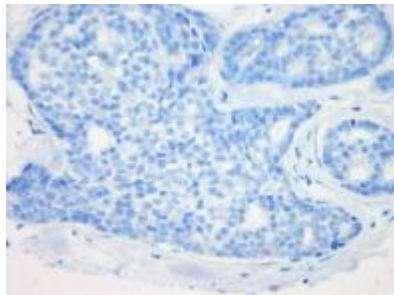


Abb. 2: Fehlender immunhistochemischer Nachweis von Ck 1 in einem gut differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)

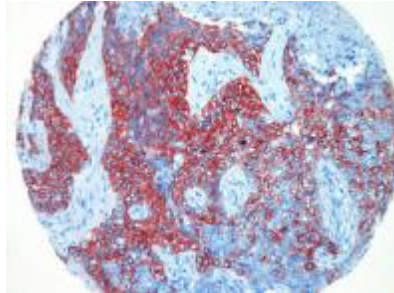


Abb. 3: Starke Expression von Ck 5 in einem schlecht differenzierten, mit Nekrosen versehenem, invasiv duktalem Mammakarzinom (10x)

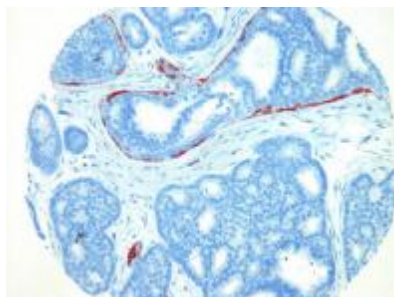


Abb. 4: Negativer Nachweis von Ck5 in einem gut differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom. Deutliche Positivität für Ck 5 in den Myoepithelien des assoziierten in-situ Karzinoms (10x)

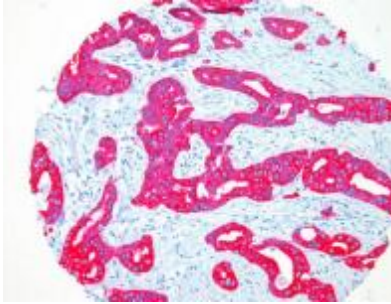


Abb. 5: Starke Expression von Ck 8/18 in einem mittelgradig differenzierten invasiv dukalen Mammakarzinom (10x).

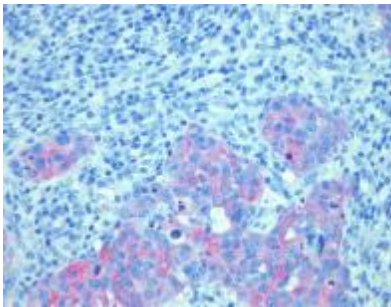


Abb. 6: Mässiggradige Expression von Ck 8/18 in einem mittelgradig differenzierten, stark lymphoplasmazellulär durchsetzten invasiv dukalen Mammakarzinom (20x)

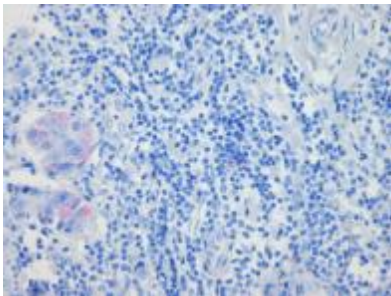


Abb. 7: Schwache Expression von Ck 10 in einem schlecht differenzierten invasiv dukalen Mammakarzinom (20x)

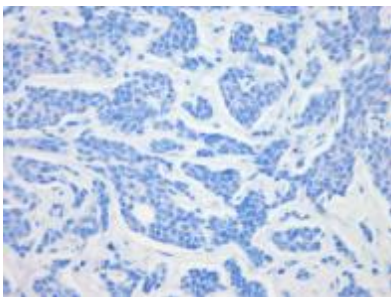


Abb. 8: Fehlende Expression von Ck 10 in einem mittelgradig differenzierten invasiv dukalen Mammakarzinom (20x)

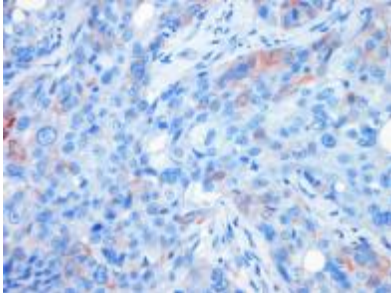


Abb. 9: Beispiel einer fokalen, überwiegend schwachen Expression von Ck 14 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)

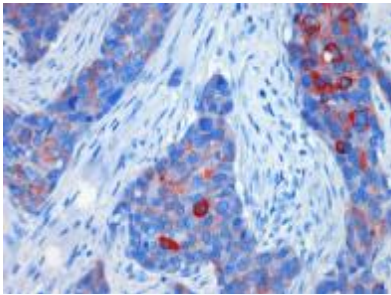


Abb. 10: Beispiel einer fokalen, teils starken Expression von Ck 14 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)

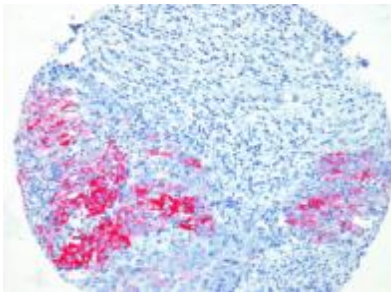


Abb. 11: Beispiel einer heterogenen, fokal starken, teilweise fehlenden Expression von Ck 19 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (10x)

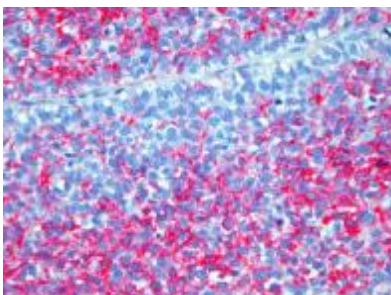


Abb. 12: Starke Expression von Ck 19 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)

8. Diskussion

Die vorliegende Arbeit entstand aufgrund von Analysen des individuellen Krankheitsverlaufes von Mammakarzinompatientinnen unter der Hypothese, dass die Expression spezifischer Zytokeratine oder von Zytokeratinexpressionsmustern der Ck 1, 5, 10, 14, 8/18 und 19 eine potentielle klinische Relevanz als neue Prognosefaktoren beim invasiven Mammakarzinom haben könnten.

Trotz Fortschritte in der Behandlung von Mammakarzinomen, bleibt das invasive Mammakarzinom eine der häufigsten Todesursachen der weiblichen Bevölkerung in den westlichen Ländern. Aktuell sind verschiedene genetische, hormonelle, sozioökonomische Faktoren und benigne Brusterkrankungen bekannt, die an der Erhöhung des Mammakarzinomsrisikos beteiligt sind.

Dank verbesserter Screening-Programme und besserer, speziell anti-hormoneller Therapien konnte trotz steigender Inzidenz die Mortalität gesenkt werden. Die Behandlung des primären Mammakarzinoms erfolgt hauptsächlich chirurgisch und/oder mit Hilfe der Strahlentherapie. Im Anschluss an die chirurgische Intervention werden in den meisten Fällen adjuvante Therapieschemata eingesetzt. Die wichtigsten Therapien sind derzeit die Chemotherapie, die antihormonelle und die Strahlentherapie. Trotz all dieser Maßnahmen erleiden etwa 30-50% aller Mammakarzinompatientinnen innerhalb der ersten zehn Jahre nach Erstdiagnose ein Rezidiv.

Im letzten Jahrzehnt zeigten verschiedene Therapiekonzepte mit systemischer Behandlung nach dem primären operativen Eingriff eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate. Um solche systemischen Therapien bei Patientinnen mit lokalen Erkrankungen effektiv einsetzen zu können, ist es wichtig, herauszufinden, bei welchen Patientinnen das Risiko eines Rezidivs besteht und welche übertherapiert werden. Die etablierten Hauptprognosefaktoren für die krankheitsfreie Überlebenszeit und die Gesamtüberlebenszeit sind Tumorgrosse, Lymphknotenbefall, lymphatische und vaskuläre Metastasierung, Grading und Hormonrezeptorstatus. Anhand dieser Faktoren werden Patientinnen mit aggressiver Erkrankung identifiziert, die von einer adjuvanten Therapie profitieren werden und Patientinnen mit indolenter Erkrankung, denen eine, in ihrem Fall unnötige, Überbehandlung erspart werden kann (54).

Aufgrund des stark differenzierten individuellen Krankheitsverlaufes gewinnen zunehmend, zusätzlich zu den etablierten, neue individualisierte Prognosefaktoren und Therapieverfahren des Mammakarzinoms an Bedeutung.

In den vergangenen Jahren wurde insbesondere die Expression von Intermediärfilamenten erneut als prognostisch relevant beschrieben. Zytokeratine gehören zu der Gruppe der Intermediärfilamente (10 nm), die neben den Aktin enthaltenen Mikrofilamenten (5-6 nm) und den Mikrotubuli (20-26 nm) zu den ubiquitären cytoplasmatischen Zytoskelett-Strukturen zählen. Intermediärfilamente bilden eine grosse Multi-Gen-Familie von etwa 40 verschiedenen Proteinen, die sich in der Evolution durch Genduplikation und anschliessende Diversifikation entwickelt haben und die sich in 6 zelltypabhängig exprimierte Klassen untergliedern lassen. Die wichtigsten sind Ck-Filamente (Epithelzellen), Vimentinfilamente (mesenchymale Zellen), Desminfilamente (Muskelzellen), Gliafilamente (Astrozyten) und Neurofilamente (Nervenzellen). Der Katalog der menschlichen Zytokeratine umfasst 20 verwandte Polypeptide. Aufgrund der großen Vielfalt ihrer Proteinzusammensetzung und der differenzierungsspezifischen Expression innerhalb der Epithelien lassen sich die Ck in zwei Typen abgrenzen. Zum Typ I gehören die Ck der sauren Subfamilie (Ck 9-20), der Typ II beinhaltet die Ck der neutral/basischen Subfamilie (Ck 1-8). Innerhalb einer Subfamilie zeigen sich relativ grosse Homologien, wobei sie zwischen den Subfamilien relativ gering sind. Typ I- und Typ II-Ck werden koordiniert und paarweise exprimiert, da sich jeweils ein Typ I-Ck mit einem Typ II-Ck zu einem Heterodimer verbinden muss, um dann mit dem zweiten Heterodimer einen für den obligaten Ck-Filament-Aufbau wichtigen Tetramer-Komplex zu bilden. Deshalb liegen Typ I- und Typ II-Ck-Polypeptide stets in stöchiometrischen Mengen in den Epithelzellen vor. Gemäss der hauptsächlichlichen Ck-Gewebsverteilung und dem Differenzierungsgrad werden die höhermolekularen plattenepitheltypischen Ck (Typ I: Ck 9-17, Typ II: Ck 1-6) und die niedermolekularen zylinderepitheltypischen Ck (Typ I: 18-20, Typ II: Ck 7,8) gegeneinander abgegrenzt (55,56).

Eine normale, ruhende weibliche Brustdrüse zeigt ein komplexes, aus zylinder- und plattenepitheltypischen Elementen aufgebautes Ck-Muster, wobei die zylinderepitheltypischen Ck (ausser Ck 20) selektiv in den luminalen Epithelzellen und die plattenepitheltypischen, sog. basale Ck's, v. a. in den Myoepithelzellen exprimiert

werden. Bei den invasiven Mammakarzinomen dominieren die zylinderepitheltypischen Ck 7 (variabel), 8, 18 und 19, wobei bei den invasiven duktalem Mammakarzinomen fokal auch noch bestimmte plattenepitheltypische Ck nachweisbar sind, von denen Ck 4, 14 und 17 mit höherem Malignitätsgrad korreliert zu sein scheinen (56). Da die Expressionsspezifität der Ck in malignen Tumoren erhalten bleibt, können sie als histologische Differenzierungsmarker wertvolle diagnostische Hinweise auf Art, Ausgang und Subtypisierung eines epithelialen Tumors geben, die potentiell relevant im Hinblick auf das biologische Verhalten, die Prognose und das individuelle Ansprechen auf therapeutische Massnahmen sind (29,50,55,56,66).

So ergab sich für diese Arbeit die Fragestellung, ob Zytokeratinexpressionsmuster der Ck 1, 5, 10, 14, 8/18 und 19 als Prognosefaktor beim invasiven Mammakarzinom eingesetzt werden können.

Mechanismen, die die Metastasierung und die Überlebensrate beeinflussen, werden weltweit von vielen Arbeitsgruppen erforscht (26,49,58,65). Als Untersuchungsmethoden werden dabei verschiedene Techniken eingesetzt. Auch für die Untersuchung von Expressionsmustern der immunhistochemischen Marker sind unterschiedliche Techniken beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die 1998 erstmals beschriebene Tissue Microarray Methode angewandt. Sie etablierte sich als eine zeitsparende und kosteneffiziente Methode und als eine Technik, die schonender für das Gewebe im Donorblock (53) im Vergleich zu der früher angewandten, sog. „Sausage-Methode“, ist (7). Die mit Hilfe der Tissue Microarray-Methode gewonnenen Schnittpräparate wurden immunohistochemisch untersucht und anhand der Anfärbbarkeit der Zytokeratine in vier Gruppen aufgeteilt, die anschliessend mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven analysiert wurden. Die Korrelationen der einzelnen Zytokeratine und der Testfaktoren EGFR, Vimentin, MIB-1, p53, erbB2, bcl2, CyclinD1, EMA, Progesteron- und Östrogenrezeptor wurden zusätzlich anhand von Bootstrap- und Permutationsverfahren evaluiert. Die Resultate wurden bei p-Werten < 0,05 als statistisch signifikant bewertet.

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Unterschiede im Überleben festgestellt werden. So lagen die Überlebensraten nach ca. 3 Jahren Beobachtungszeit von Ck 5 (+)-Patientinnen der Gruppe 1 bei etwa 53% und der Gruppe 2 bei etwa 83%

und blieben im weiteren Verlauf bis zum Beobachtungsstopp (bei der Gruppe 1 mit ca. 5 Jahren und bei der Gruppe 2 mit ca. 6 Jahren) unverändert. Die Ck 5 (-)-Gruppe lag zwischen der Gruppe 1 und der Gruppe 2, sie wies nach 3 Jahren eine Überlebensrate von etwa 75% der Patientinnen und nach 5 Beobachtungsjahren von 57% auf ($p=0,4689$).

Bei dem Ck 10 (+)-Kollektiv lebten nach 3 Jahren Beobachtung 52% und beim Ck 10 (-)-Kollektiv 76% der Patientinnen. Auch nach zwei Jahren bestand ein Unterschied in den Überlebensraten, wobei sie in der positiven Gruppe unverändert bei 52% und in der negativen Gruppe bei ca. 60% der Frauen lag. Es war ein Trend zu erkennen, dass die Prognose bei dem Ck 10 (-)-Kollektiv besser war ($p=0,1860$).

Die Überlebenskurven der positiven Ck 19-Gruppen zeigten erkennbare Unterschiede im Verlauf untereinander, wobei nach 3-Jahren-Überlebenszeit in der Gruppe 1 ca. 35%, in der Gruppe 2 ca. 69% und in der Gruppe 3 ca. 75% der Frauen blieben. Nach etwa 4,5 Jahren endete die Beobachtung der Gruppen 1 und 2, wobei diese Gruppen sich prozentual nicht veränderten und die Gruppe 3 ca. 61% aufwies ($p=0,5414$). Die Analyse der Ck 19 (+)- und Ck 19 (-)-Gruppen war aufgrund des kleinen Anteils an Ck 19 (-)-Tumoren ($N=3$) erschwert. Beim Ausscheiden der letzten Ck 19 (-)- Patientin nach 2,5 Jahren betrug die Überlebensraten der Ck 19 (+)-Frauen ca. 78% und der Ck 19 (-)-Frauen 100% ($p=0,58$).

Die Überlebenskurven für Ck 1, Ck 8/18 und Ck 14 liessen nach etwa 6,5 Jahren Beobachtung keine klaren Unterschiede im Überleben erkennen.

Nach ca. 3-Jahren-Überlebenszeit blieben etwa 62% der Ck 1 (+)- und etwa 73% der Ck 1 (-)-Patientinnen. Nach ca. 5 Jahren änderten sich die Überlebensraten, so dass das Ck 1 (-)-Kollektiv weniger Frauen (58%) als das prozentual gleich gebliebene Ck 1 (+)-Kollektiv (62%) auswies ($p=0,9291$).

Die Überlebenskurven für Ck 14 und Ck 1 zeigten einen ähnlichen Verlauf. Nach 3 Jahren Beobachtung zeigten die Ck 14 (+)-Frauen ein Überleben von 65% und die Ck 14 (-) von 76%. Nach 5 Jahren blieb die Überlebensrate der Ck 14 (+)-Gruppe weiterhin bei 65% und bei der Ck 14 (-)-Gruppe fiel sie auf ca. 60% ab ($p=0,8747$).

Auch bei den Ck 8/18-Überlebenskurven liessen sich keine Tendenzen nachweisen. Bei den Gruppen 1 und 2 betrug die 3 Jahre-Überlebensraten jeweils 75%, bei der Gruppe 3 war sie etwa 77%. Nach 5 Jahren betrug die Überlebensraten ca. 52% bei der

Gruppe 1, ca. 63% bei der Gruppe 2 und ca. 66% bei der Gruppe 3. Die Ck 8/18 (-)-Gruppe zeigte sowohl nach 3 wie auch nach 5 Jahren eine Überlebensrate von etwa 65% ($p=0,9386$). Auch die dichotome Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ck 8/18 (-)- und Ck 8/18 (+)-Fällen ($p=0,86$).

In dieser Arbeit waren die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Überlebensanalysen der Ck 1-, Ck 5-, Ck 10-, Ck 14-, Ck 8/18- und Ck 19-Immunhistochemie nicht signifikant. Diese Ergebnisse stehen somit in einem gewissen Gegensatz zu bislang publizierten Arbeiten verschiedener internationaler Arbeitsgruppen, wobei inzwischen aber die Wertigkeit der ursprünglich gesehenen prognostischen Relevanz speziell der Expression basaler Zytokeratine kritisch zu betrachten ist. So konnten Jones et al. (34) zeigen, dass speziell in der Gruppe der G3 Karzinome der Expression hochmolekularer Zytokeratine keine prognostische Relevanz zukommt. In einer weiteren Studie von Laakso et al. konnte an einem finnischen Mammakarzinom-Hochrisikokollektiv, welche ebenfalls mit der Expression von Ck 5, 14 assoziiert war, keine prognostische Relevanz getroffen werden (42).

Diese Gründe mögen auch in dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientinnenkollektiv eine wichtige Rolle gespielt zu haben und die fehlende prognostische Relevanz begründen. Bei kritischer Betrachtung des Kollektivs handelte es sich um meist relativ fortgeschrittene Erkrankungsstadien. Weitere Gründe mögen die vergleichsweise geringe Anzahl der untersuchten Patientinnen in dem Kollektiv und eine vergleichsweise kurze Beobachtungsdauer gewesen sein. Für diese Arbeit wurde ein Kollektiv bestehend aus 222 Frauen untersucht, von dem 121 Tumorbiopsien für alle Tumormarker auswertbar waren. Die verglichenen Biopsien zeigten unterschiedlich fortgeschrittene Tumorstadien mit vorwiegend schlechter Differenzierung (G3). Dieser Anteil war höher als in vielen anderen Studien (z.B. (32,47)); somit konnte diese Verteilung als nicht repräsentativ bezüglich Grading und Tumorstadium betrachtet werden. Eine Erklärung für die hohe Anzahl von G3-Karzinomen war in erster Linie, dass die Universitätsklinik Münster als Universitätszentrum mehr Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung behandelte. Da es sich bei dem untersuchten Patientenkollektiv zudem um Erkrankungen aus dem Beginn der neunziger Jahre handelt, wurden zudem fast ausschliesslich klinisch symptomatische, und nicht im

Rahmen von Mammographie-Screeninguntersuchungen detektierte Mammakarzinome untersucht. Letztere sind durch niedrigere Tumorstadien und einen geringeren Tumorgrad charakterisiert und haben somit per se eine signifikant bessere Prognose. Es ist ferner zu diskutieren ob die untersuchten Faktoren, die Erkrankung möglicherweise in einem frühen Stadium beeinflussen können, in einem sehr späten Stadium wegen der schweren, und vielleicht schon metastasierten Erkrankung praktisch keinen Überlebenseinfluss mehr haben. Dieser Arbeit lag zudem eine relativ kurze mediane Beobachtungszeit von 3 Jahren zugrunde. Dies war ebenfalls auf die kleine Anzahl an Patientinnen pro Gruppe zurückzuführen. So sind in dieser Arbeit nach ca. 7 Jahren alle Patientinnen ausgeschieden oder verstorben. Zytokeratine mit einem kleinen Unterschied im Überleben (z. B. Ck 1) müsste man über diese Zeit hinaus beobachten, um einen Unterschied sicher festzustellen.

Trotz dieser Einschränkungen geben die Ergebnisse dieser Arbeit hoch interessante Einblicke in biologische Zusammenhänge in der Coexpression von Zytokeratinen und molekularen Faktoren in der Progression und Prognose des invasiven Mammakarzinoms. Die hierfür gewählte Methode ist neu und ermöglicht die simultane Betrachtung von verschiedenen Zytokeratinen und assoziierten Expressionsmustern in einem multivariaten Ansatz. Die Ergebnisse der Bootstrap- und Permutationsverfahren zeigten hochsignifikant positive Korrelationen der beobachteten Zytokeratine mit den zehn ausgewählten Testproteinen EGFR, Vimentin, MIB-1, p53, erbB2, bcl2, CyclinD1, EMA, Progesteron- und Östrogenrezeptor. Ck 5 positive Tumore korrelieren durch die Coexpression von EGFR ($p=0,0001$), Vimentin ($p=0,0005$), MIB-1 ($p=0,0001$) und korrelieren invers mit der Expression von bcl2 ($p=0,0209$), Cyclin D1 ($p=0,0009$), Progesteron- ($p=0,0008$) und Östrogenrezeptor ($p=0,0001$). Die Ergebnisse stützen somit die bislang bekannten Korrelationen von Ck 5 mit den entsprechenden Faktoren. Die Regressionsgerade für Ck 14 verhielt sich gleichsinnig zu der Geraden für Ck 5, enthielt aber weniger signifikante Ergebnisse, so dass folgendes Korrelationsmuster mit EGFR (+) ($p=0,0171$), MIB-1 (+) ($p=0,01$), erbB2 (-) ($p=0,004$) und bcl-2 (-) ($p=0,0281$) entstand. Die beschriebenen Faktoren sind generell in schlecht differenzierten G3-Karzinomen zu sehen und die Ergebnisse dieser Studie sind somit im Einklang mit bisherigen Studien (34,56).

Die luminalen Ck 19 und Ck 8/18 verhielten sich gleichsinnig bezüglich der Testfaktoren. Bei den Ck 19 (+)-Tumoren konnte eine positive Korrelation mit Cyclin D1 ($p=0,0005$), EMA ($p=0,0001$), Östrogenrezeptor ($p=0,0012$) und eine negative mit Vimentin ($p=0,0001$) festgestellt werden. Das Expressionsmuster der Ck 8/18 (+)-Tumoren ergänzte sich zusätzlich mit Progesteronrezeptor (+) ($p=0,0002$), p53 (-) ($p=0,0027$), MIB-1 (-) ($p=0,0002$) und EGFR (-) ($p=0,0012$). Die Ergebnisse sind im Einklang mit bislang publizierten Studien und können als indirekter Hinweis auf die Hypothese genommen werden, dass das luminale Ck 8/18 das dominante Zytokeratin für eine gute Prognose ist, im Gegensatz zu dem basalen Ck 5, das das dominante Zytokeratin für eine schlechte Überlebenswahrscheinlichkeit repräsentiert (1, 11,61,72,77). Die Korrelationen der Ck 19 mit den Testfaktoren scheinen durch die wenigen signifikanten Ergebnisse nicht aussagekräftig zu sein. Die Zytokeratine 1 und 10 schienen hierbei in der weiblichen Brust keinerlei Relevanz zu haben. Das Regulationsverhältnis der beobachteten Zytokeratine mit den zehn Testproteinen wies grosse Ähnlichkeit von Ck 14 mit Ck 5 und Ck 19 mit Ck 8/18 auf.

Frühere Arbeiten hatten den Dualismus zwischen hoch- und niedermolekularen Zytokeratinen in der Vergangenheit mehrfach auch mit anderen molekularen Methoden beschrieben. Sorlie et al. identifizierten mittels DNA-Microarray an Mammakarzinomen (47,72) fünf klar getrennte Subtypen von invasiven Mammakarzinomen, die mit unterschiedlichen klinischen Prognosen assoziiert sind: luminale A, luminale B, HER2+/ER-, basale und „normale brustähnliche“.

Die sog. basalen Mammakarzinome wurden von der selben Arbeitsgruppe (61) als Karzinome mit ähnlichen Genexpressionsmustern wie basale/myoepitheliale Zellen des normalen Brustgewebes charakterisiert, die zudem immunoreaktiv für Integrin- β 4, Laminin und Östrogenrezeptor waren. Jacquemier et al. (32) schlugen ein Set mit 21 Proteinen als unabhängiger Prognosefaktor vor, das die Patientinnen in zwei Klassen mit guter und schlechter Prognose mit signifikanten Überlebensunterschieden unterteilte. Aus der Kombination der vier Gruppen aus den coexprimierten Proteinen (Proliferations- mit u. a. Ck 5, Mitose-, Differenzierungs- mit u. a. Ck 8/18 und mit ER assoziierte Gruppe) wurden drei Tumorguppen (A1, A2, B) gebildet. Gruppe A1 bestand meistens aus den sog. luminalen Tumoren und war stark ER (+) und Ck 8/18 (+). Gruppe B enthielt meistens die sog. basalen/Stammzell-Tumoren, die deutlich

ER (-) und positiv für Ck 5, CDH3 und Proliferationsmarker waren. Die intermediäre A2-Gruppe zeigte einen basoluminalen Charakter mit ER (-). Die Tumorguppen korrelieren gut mit den histopathologischen Daten, ER- und ERBB2-Expressionsprofilen und zeigen signifikante Differenzen in den Überlebensraten entsprechend diesem Modell (A1-Gruppe: 5-Jahres-Überlebensrate 86%, A2: 62%, B: 64%). In dieser Studie wurden keine Korrelationen von Alter, Tumorgrosse, axillärem Lymphknotenstatus festgestellt.

Durch die Analyse von 31 Brustzelllinien wurde durch E. Charafe-Jauffret et al. (19) die Richtigkeit der aktuell gebräuchlichen molekularen Definition der „Basalität“ durch u. a. Expression von Ck 4, Ck 5, Ck 13 - Ck 17 und Östrogenrezeptor (-) erneut bestätigt. Im Vergleich dazu war die luminal Gruppe u. a. Ck 8/18 (+), Ck 19 (+), Östrogenrezeptor (+) und ERBB2 (+). Es wurden auch neue Marker isoliert, die jedoch noch weiter in Bezug auf die prognostische Relevanz getestet werden müssen.

Auch die Studie von Abd El-Rehim et al. (1) zeigte das gleiche Ergebnis anhand von 1944 untersuchten Mammakarzinomen von denen 18% positiv für die basalen Zytokeratine waren. Die sog. basalen Tumore wiesen die höchste Proliferationsrate, eine schlechte klinische Prognose (71,72,77) und in der Studie von M. A. Troester et al. (74) eine schlechtere Ansprechbarkeit auf die Chemotherapeutika auf. Dies wurde auch von W. D. Foulkes et al. (27) zusätzlich in der Assoziation mit BRCA1-Mammakarzinomen beobachtet. Tsuda et al. (75,76) beschrieben die basale/myoepitheliale Differenzierung in der Gruppe der hochgradig invasiven duktaalen Karzinomen mit grosser zentraler azellulärer Zone, die aggressives Verhalten mit erhöhtem Risiko für Hirn- und Lungenmetastasen zeigten.

Basale Zytokeratine wurden aber nicht in allen Tumoren, die ursprünglich als basal in den DNA-Gen-Microarray-Analysen klassifiziert wurden, exprimiert. Das stellte die Frage nach anderen Markern bei der Identifizierung des sog. basalen Subtypes. In diesem Zusammenhang zeigten die Ergebnisse von Korsching et al. (40) eine häufige Coexpression von basalem Ck 5, EGFR, Proliferationsmarker Ki-67, p53 und zytogenetischen Anomalien. Auch die Studienresultate von Nielsen et al. (59) bestätigten diese Coexpression, fügten aber zwei weitere Antikörper (ER, HER2) als wichtige Mechanismen auf dem Weg zur Identifizierung des sog. basalen Karzinoms hinzu. Somit wurde dieser Karzinomsubtyp von den Autoren als derjenige Tumor

definiert, der ER (-), PR (-), HER2 (-) und Ck 5 (+) und/oder EGFR (+) bzw. c-kit (+) ist.

Es ist aktuell noch unklar, ob auch die anderen basalen/myoepithelialen Marker, wie SMA (smooth muscle actin), p63 oder CD10, in dem sog. basalen Mammakarzinom exprimiert werden. Auch die Notwendigkeit der Suche nach den anderen immunohistochemischen Markern, zusätzlich zu den typischen basalen Zytokeratinen, wurde in den Studien gezeigt. In der Studie von C. A. Livasy et al. (47) waren 39% der sog. basalen Karzinome negativ für Ck 5. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde nach weiteren histologischen und immunophenotypischen Eigenschaften gesucht, die die Definition der basalen Tumore erleichtern könnte. Es wurde gezeigt, dass die meisten sog. basalen Karzinome (17 von 18) zusätzlich noch für den prognostisch ungünstigen Marker (41) Vimentin immunreaktiv waren, und deshalb wurde es zur genauen Evaluation als zusätzlicher Screeningmarker vorgeschlagen. Eine Expression des luminalen Ck 8/18, das nicht in der normalen basalen/myoepithelialen Zelle exprimiert wird, wurde in 83% sog. basalen Tumoren beobachtet. 10/18 sog. basale Tumore zeigten die Coexpression von basalen und luminalen Zytokeratinen. Die Expression der myoepithelialen Marker SMA, p63 und CD 10 war in dieser Studie unregelmässig.

Ungeachtet der unmittelbaren klinischen Relevanz dieser oben genannten Ergebnisse kann der Dualismus von Ck 5 und Ck 8/18 im invasiven Mammakarzinom möglicherweise Hinweise auf die Histogenese der Tumoren geben.

Basierend auf immunohistochemischen Untersuchungen konnte in den letzten Jahren ein sog. Progenitorzell-Konzept (6,11,12) entwickelt und postuliert werden. So konnte mittels Mehrfach-Immunfluoreszenz-Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die weibliche Brust aus einer Vielzahl von Zellen mit unterschiedlichem Zytokeratinexpressionsmuster zusammensetzt. So konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Zellen vorwiegend eine Expression von Ck 5 bei Negativität von Ck 8/18 zeigten. Daneben fanden sich Zellen mit einer Coexpression von Ck 5 und Ck 8/18 und schliesslich in der Mehrzahl luminalen Zellen mit der Monoexpression von Ck 8/18. In der myoepithelialen Zellreihe fand sich ein ähnliches Verhalten. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass der Ck 5 (+)-, Ck 8/18 (-)-Phänotyp Progenitor- oder Stammzellen darstellen, welche sich entweder über Ck 5 (+)-, Ck 8/18 (+)- oder Ck 5 (+)-, SMA (+)-Intermediärzellen zu glandulären oder myoepithelialen

Ck 5 (-)- Endzellen differenzieren. Es kann somit postuliert werden, dass sich die Mehrzahl der invasiven Mammakarzinome möglicherweise aus dem luminalen, glandulären Epithel und der Rest aus den basalen, luminalen Epithelien herleitet. Obwohl die Karzinomzelllinien, die sich aus den luminalen Zellen entwickeln, schon gut studiert sind, sind die analogen Linien aus den „Progenitorzellen“ noch nicht im Detail identifiziert (74). Dieses neue hypothetische, zellbiologische Modell kann jedoch schon jetzt hilfreich sein im generellen Verständnis der Pathogenese des Mammakarzinoms, sowie bei der Entschlüsselung von Mechanismen, die die Regeneration und abnorme Proliferation des Brustepitheliums auf der zellulären Ebene regulieren.

In der vorgelegten Arbeit wurde ein vergleichsweise kleiner Satz von Zytokeratinen bzw. molekularen Markern untersucht und diskutiert, deren Expressionsmuster unter den Subtypen des invasiven Mammakarzinoms deutlich variieren. Durch die zusätzliche Analyse von verschiedenen Studien konnte die potenzielle klinische Relevanz der Zytokeratin-Expressionsmuster hinterfragt werden. Die Beachtung von Tausenden individuellen Markern, die das molekulare Bild eines jeden Tumors beeinflussen und charakterisieren und auch das Erlernen der richtigen Interpretation von Expressionsmustervariationen, werden zweifellos zu einem tieferen und vollständigeren Verständnis des Krankheitsbildes „Mammakarzinom“ führen. Ihr klinischer Einfluss muss aber noch in weiteren grossen Studien evaluiert werden, um dann die mit spezifischen Zytokeratinexpressionsmuster assoziierte molekulare Mechanismen zu charakterisieren, um damit weitere molekulare Ansatzpunkte in der Diagnostik und Therapie des invasiven Mammakarzinoms zu bekommen.

Die kostengünstige, zeitsparende und in vielen Laboratorien routinemässig angewendete immunhistochemische Untersuchung an tissue microarrays wird sich hierbei als Methode der ersten Wahl anbieten.

9. Zusammenfassung

Die Expression von Zytokeratinen wurde wiederholt als prognostisch relevant beschrieben. Die vorliegende Arbeit basiert auf der Analyse des Krankheitsverlaufes von 222 Mammakarzinompatientinnen in Relation zu der Expression von 6 verschiedenen Zytokeratinen mit dem Ziel die prognostische Relevanz der Zytokeratinexpression (Ck 1, 5, 10, 14, 8/18 und 19) in einem Kollektiv von Mammakarzinompatientinnen der Universitätsfrauenklinik Münster zu verifizieren.

Die mit Hilfe der Tissue Microarray-Methode gewonnenen Schnittpräparate wurden immunhistochemisch auf die Expression von 6 Zytokeratinen, sowie den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), Vimentin, MIB-1, p53, erbB2, bcl-2, CyclinD1, Epitheliales Membranantigen (EMA), sowie den Östrogen- (ER) und den Progesteronrezeptor (PR) untersucht. Die Ergebnisse wurden mittels Kaplan-Meier-Analysen auf die prognostische Relevanz untersucht. Zusätzlich wurde ein Bootstrap- und Permutationsverfahren durchgeführt, um globale, mit bestimmten Zytokeratinen assoziierte Proteinexpressionsmuster zu verifizieren.

Die Überlebensanalysen zeigten nach ca. 6,5 Jahren Beobachtung keine signifikanten Unterschiede. Die Resultate der Bootstrap- und Permutationsverfahren zeigten ein gegenläufiges Verhalten der Proteinexpressionen für Ck 5 und Ck 8/18. Diese Resultate sprechen dafür, dass der Wert der Zytokeratinexpression beim Mammakarzinom noch nicht abschliessend beurteilt werden kann. Die gefundenen Expressionsmuster lassen jedoch schon jetzt Einblicke in die Pathogenese des invasiven Mammakarzinoms zu, speziell unter Berücksichtigung eines kürzlich postulierten Progenitorzellkonzepts der weiblichen Brustdrüse.

10. Literaturverzeichnis

1. Abd El-Rehim D.M., Pinder S.E., Paish C.E., et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *Journal of Pathology* 203: 661-71, 2004.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Cancer. In: *Molecular Biology of the Cell*. New York, London: Garland Science Taylor & Francis Group, p. 1533-1592, 2002.
3. Antoine C., Liebens F., Carly B., Pastijn A., Rozenberg S. Influence of HRT on prognostic factors for breast cancer: a systematic review after the Woman`s Health Initiative trial. *Human Reproduction* 741-56, 2004.
4. Atteslander P. Prävention als Risiko? Grenzen der modernen Epidemiologie als Grundlage für gesundheitspolitische Massnahmen. *Deutsches Ärzteblatt A* 2492-6, 1997.
5. Baltzer J., Friese K., Graf M., Wolff F. *Praxis der Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, p. 471, 2004.
6. Bankfalvi A., Ludwig A., de-Hesselle B., Buerger H., Buchwalow I.B., Boecker W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Modern Pathology* 17: 1051-61, 2004.
7. Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Laboratory Investigation* 55: 244-8, 1986.
8. Beckmann M.W. Die Frau mit primärem Mammakarzinom - im Spannungsfeld von Medizin und Politik. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 137-8, 2005.

9. Böcker W., Höfler H.K., Kleihues P., Denk H., Heitz Ph.U. Allgemeine Tumorpathologie. In: Böcker H., Denk H., Heitz Ph.U., eds. Pathologie. München, Jena: Urban & Fischer, p. 163-211, 2001.
10. Böcker W., Kunze K.-D. Mamma. In: Böcker H., Denk H., Heitz Ph.U., eds. Pathologie. München, Jena: Urban & Fischer, p. 909-927, 2001.
11. Boecker W., et al. Usual ductal hyperplasia of the breast is a committed stem (progenitor) cell lesion distinct from atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ. *Journal of Pathology* 198: 458-67, 2002.
12. Boecker W., Moll R., Poremba C., et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Laboratory Investigation* 82: 737-46, 2002.
13. Breslau E.S., Davis W.W., Doner L., Eisner E.J., Goodman N.R., Meissner H.I., Rimer B.K., Rossouw J.E. The hormone therapy dilemma: women respond. *J Am Med Womens Assoc* 58: 33-4, 2003.
14. Broer K.-H., Beyer D., Schmitz S. Die weibliche Brust. Köln: Neuer Honos Verlag, p. 62-142, 2001.
15. Bubendorf L. High-throughput microarrays: from genomics to clinics. *European Urology* 231-8, 2001.
16. Bubendorf L., Nocito A., Moch H., Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *The American Journal of Pathology* 72-9, 2001.
17. Buerger H., Otterbach F., Simon R., Schäfer K.-L., Poremba C., Diallo R., Brinkschmidt C., Dockhorn-Dworniczak B., Boecker W. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *Journal of Pathology* 189: 521-6, 1999.

18. Bürger H., Poremba C., Diallo R., Dockhorn-Dworniczak B., Böcker W. Erarbeitung eines zytogenetischen und morphologischen Progressionsmodells des invasiven Mammakarzinoms. *Der Pathologe* 21: 375-82, 2000.
19. Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Monville F., Finetti P., et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 1-12, 2005.
20. Chen Q., Espey M., Krishna M.C., Mitchell J.B., Corpe C.P., Buettner G.R., Shacter E., Levine M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *PNAS* 102: 13604-9, 2005.
21. Claus E.B., Risch N., Thompson W.D. Genetic analysis of breast cancer in the Cancer and Steroid Hormon Study. *American Journal of Human Genetics* 232-42, 1991.
22. Collins J.A., Blake J.M., Crosignani P.G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Human Reproduction Update* 545-60, 2005.
23. Dietel M., Lewis M.A., Shapiro S. Hormone replacement therapy: pathobiological aspects of hormone-sensitive cancers in women relevant to epidemiological studies on HRT: a mini-review. *Human Reproduction* 2052-60, 2005.
24. Efron, Bradley, Tibshirani. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Statistical Science* 1: 54-75, 1986.
25. Fejzo M.S., Slamon D.J. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA and proteins. *The American Journal of Pathology* 1645-50, 2001.
26. Fidler I.J. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 87: 1588-92, 1996.

27. Foulkes W.D., Stefansson I.M., Chappuis P.O., et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 1482-5, 2003.
28. Fournier A., Berrino F., Riboli E., Avenel V., Clavel-Chapelon F. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPIC cohort. *International Journal of Cancer* 114: 448-54, 2004.
29. Gusterson B.A., Warbutson M.J., Mitchell D., Ellison M., Neville A.M., Rudland P.S. Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases. *Cancer Research* 42: 4763-70, 1982.
30. Haagedoorn E.M.L., Oldhoff J., Bender W., Clarke W.D., Sleijfer D.Th. Brustkrebs. In: Porzolt F., ed. *Basiswissen Onkologie (dt.)*. Berlin/Wiesbaden: Ullstein Mosby GmbH & Co., p. 57-77, 1996.
31. Hall, Peter, Horowitz. Bootstrap Critical Values for Tests Based on Generalized-Method-of-Moments Estimators. *Econometrica* 64: 891-916, 1996.
32. Jacquemier J., Ginestier C. et al. Protein Expression Profiling Identifies Subclasses of Breast Cancer and Predicts Prognosis. *Cancer Research* 65: 767-79, 2005.
33. Jonat W., Holweg M. *Mammakarzinom - aktuelle Diagnostik und Therapie*. 1 Auflage ed. p. 16-121, 2001.
34. Jones C., Ford E., Gillett C., Ryder K., Merrett S., Reis-Filho J.S., Fulford L.G., Hanby A., Lakhani S.R. Molecular Cytogenetic Identification of Subgroups of Grade III Invasive Ductal Breast Carcinomas with Different Clinical Outcomes. *Clin Cancer Res* 10: 5988-97, 2004.
35. Kallioniemi O.P., Wagner U., Kononen J., Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics* 10: 657-62, 2001.

36. Karp G. Krebs. In: Molekulare Zellbiologie. Berlin: Springer Verlag, p. 829-866, 2005.
37. Kaufmann M., Loibl S. Mammakarzinom 100 Fragen - 100 Antworten. Urban & Vogel Medizin & Wissen, p. 9-32, 2005.
38. Kiechle M., Harbeck N., Paepke S., Schmalfeldt B., Gerhard I. Gynäkologische Onkologie; Mammakarzinom. In: Gynäkologie integrativ. München: Urban & Fischer Verlag, p. 594-611, 2006.
39. Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine* 4: 767-8, 1998.
40. Korsching E., Packeisen J., Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Laboratory Investigation* 82: 1525-33, 2002.
41. Korsching E., Packeisen J., Liedtke C., Hungermann D., Wülfing P., van Diest P.J., Brandt B., Boecker W., Buerger H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *Journal of Pathology* 206: 451-7, 2005.
42. Laakso M., Nilsson J., Wiklund T., Erikstein B., Kellokumpu-Lehtinen P., Malmström P., Wilking N., Bergh J., Isola J. Basoluminal Carcinoma: A New Biologically and Prognostically Distinct Entity Between Basal and Luminal Breast Cancer . *Clin Cancer Res* 12: 4185-91, 2006.
43. Langston A.A., Stanford J.L., Wicklund K.G., Thompson J.D., Blazej R.G., Ostrander E.A. Germline BRCA1 mutations in selected man with prostate cancer. *The American Journal of Human Genetics* 881-5, 1996.

44. Lester S.C. The Breast. In: Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., eds. Robbins and Cotron Pathologic Basis of Disease. New York: Elsevier Saunders, p. 1119-1154, 2004.
45. Leung G.M., Thach T.Q., Chan E., Foo W., Meng O., Fielding R., Lam W.W.T., Hedley A.J., Wong C.-M., Lam T.-H. Short-term, medium-term, long-term, and lifetime risks of developing and dying of breast carcinoma in a Westernized Chinese population (Evidance from Hong Kong between 1976 and 2000). *Cancer* 103: 501-8, 2004.
46. Lewin B. Onkogene und Krebs. In: Molekularbiologie der Gene. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, p. 911-944, 1998.
47. Livasy C.A., Karaca G., Nanda R., Tretiakova M.S., Olopade O.I., Moore D.T., Perou C.M. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology* 19: 264-71, 2006.
48. Löffler G. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 4. Auflage ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, p. 677-689, 2001.
49. Luzzi K.J., MacDonald I.C., Schmidt E.E. Dormancy of Solitary Cells after Successful Extravasation and Limited Survival of Early Micrometastases. *American Journal of Pathology* 153: 865-73, 1998.
50. Malzahn K., Mitze M., Thoenes M., Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 433: 119-29, 1998.
51. Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet* 419-27, 2003.
52. Mitglieder der Projektgruppe Mammakarzinom im Tumorzentrum München. Mammakarzinome. 8 ed. München: W.Zuckschwerdt Verlag, p. 1-179, 2001.

53. Moch H., Kononen T., Kallioniemi O.P., Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Advances in Anatomic Pathology* 8: 14-20, 2001.
54. Molina R. et al. Tumour Markers in Breast Cancer: EGTM Recommendations. *Anticancer Res* 19: 2803-5, 1999.
55. Moll I. Cytokeratine. Marker epithelialer Differenzierung. *Hautarzt* 44: 491-501, 1993.
56. Moll R. Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, p. 1-164, 1993.
57. Mueck A.O. Hormonersatztherapie (HRT) oder Alternativen: Neuorientierung nach WHI? *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 323-5, 2005.
58. Naumov G., MacDonald I.C., Weinmeister P. Persistence of Solitary Mammary Carcinoma Cells in a Secondary Site. A Possible Contributor to Dormancy. *Cancer Research* 62: 2162-8, 2002.
59. Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K., et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 5367-74, 2004.
60. Nocito A., Kononen J., Kallioniemi O.P., Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *International Journal of Cancer* 1-5, 2001.
61. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-52, 2000.
62. Petrides P.E. Tumorgewebe. In: Löffler G., Petrides P.E., eds. *Pathologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, p. 1160-1183, 2003.

63. Petrosyan K., Press M.F. Multispecimen Tissue Blocks in Pathology: an Improved Technique of Preparation. *Laboratory Investigation* 77: 541-2, 1997.
64. Pfleiderer A., Breckwoldt M., Martius G. Maligne Tumoren der Mamma. In: Pfleiderer A., Breckwoldt M., Martius G., eds. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart; New York: Georg Thieme, p. 217-227, 2001.
65. Rak J, Filmus J., Kerbel R.S. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the "angiogenesis progression" hypothesis. *Eur J Cancer* 32A: 2438-50, 1996.
66. Riede U.-N., Freudenberg N., Rohrbach R., Schäfer H.-E. Zellpathologie. In: Riede U.-N., Werner M., Schäfer H.-E., eds. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 12-35, 2004.
67. Sachs H. Brustkrebs. Somatik, Psychosomatik, Selbsthilfe, Prävention. Vol. 559. 1 ed. Hamburg: akademos Wissenschaftsverlag, p. 12-539, 2003.
68. Schmidt - Matthiesen H., Bastert G., Wallwiener D. Mammakarzinome. In: Schmidt - Matthiesen H., Bastert G., eds. *Gynäkologische Onkologie*. Schattauer, p. 105-262, 2000.
69. Schmidt - Matthiesen H., Hepp H. Mammakarzinom. In: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart; New York: Schattauer, p. 390-407, 1998.
70. Seyffert W., Gassen H.G., Hess O., Jäckle, Fischbach K.-F. *Lehrbuch der Genetik*. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer, p. 814-828, 1998.
71. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 10869-74, 2001.
72. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8418-23, 2003.

73. Thorlacius S., Tryggvadottir L., Olafsdottir G.H., Jonasson J.G., Ogmundsdottir H.M. Linkage to BRCA2 region in hereditary male breast cancer. *The Lancet* 544-5, 1995.
74. Troester M.A., et al. Cell-Type-Specific Responses to Chemotherapeutics in Breast Cancer. *Cancer Research* 64: 4218-26, 2004.
75. Tsuda H., Takarabe T., Hasegawa F., et al. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am J Surg Pathol* 24: 197-202, 2000.
76. Tsuda H., Takarabe T., Hasegawa T., et al. Myoepithelial differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas with large central acellular zones. *Hum Pathol* 10: 1134-9, 1999.
77. van de Rijn M., Perou C.M., Tibshirani R., et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *American Journal of Pathology* 161: 1991-6, 2002.
78. van Gils C.H. and colleagues. Consumption of Vegetables and Fruits and Risk of Breast Cancer. *JAMA* 293: 183-93, 2005.
79. Wenderlein J.M. Kein erhöhtes Brustkrebsrisiko durch HRT. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 233, 2005.

11. Danksagung

Diese Arbeit entstand in einer für unsere Familie schwierigen Zeit. Für den erfolgreichen Abschluss schulde ich deshalb vielen Menschen meinen herzlichsten Dank.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Horst Bürger, für eine sehr gute Betreuung der Doktorarbeit, für seine Anregungen, Ideen und die investierte Zeit herzlichst bedanken.

Herrn Professor Dr. Burkhard Brandt gilt mein besonderer Dank für die Aufnahme in die Studie und eine gute Betreuung am Anfang dieser Arbeit.

Sehr viel Dank schulde ich Herrn Eberhard Korsching, da ohne die Ergebnisse der Bootstrap- und Permutationsverfahren diese Arbeit nicht in der vorliegenden Form hätte erstellt werden können. Frau Inka Buchroth danke ich sehr für die Hilfe beim Durchführen der TMA-Methode und immunhistochemischer Untersuchungen im Labor.

Ein grosses Dankeschön geht an Martin Belz, der die gesamte Arbeit Korrektur gelesen hat und mir aufzeigte, an welcher Stelle ich noch an inhaltlichen und sprachlichen Problemen arbeiten musste.

Ich möchte mich bei meinen Freunden für ihre vielseitige fachliche Unterstützung bedanken. Bei Sergej Derjabkin und Alexander Powolozki, die mich mit ihren umfassenden Kenntnissen der Informatik bei technischen Problemen unterstützt haben. Bei Dr. Markus Tschopp, der mir in zahlreichen Diskussionen wertvolle Anregungen und Empfehlungen geliefert hat. Bei Elena Gilman, die mir viel bei statistischen Problemen geholfen hat.

Ein besonderes Dankeswort möchte ich meinen Grosseltern, Olga und Dr. Wladimir Babuchadia, meiner Mutter, Natella Baboukhadia, und meiner Schwester Elena aussprechen, die mich während des ganzen Studiums und während dieser Arbeit mit

Wort und Tat unterstützt, an mich geglaubt haben und die immer für mich da waren.
Diese Arbeit möchte ich meiner Mutter widmen.

Meinem Onkel, Dr. Dimitri Babuchadia, danke ich für die Bereitstellung der neuesten
Information aus dem Gebiet Gynäkologie.

Grosser Dank geht an meinen Freund Ioannis für seine verständnis- und
hingebungsvolle Unterstützung und für die Bestärkung, diese Arbeit zu schreiben, wenn
ich selbst an der erfolgreichen Fertigstellung gezweifelt habe.

Natalie Kling, Georgi Lomsadze und Alexander Kliawer danke ich herzlich für ihre
Zusprüche in langen privaten Gesprächen.

13. Anhang

13.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Brustkrebsrisiko in Abhängigkeit vom Alter	3
Tab. 2:	Für die Entstehung des Mammakarzinoms bekannte Onkogene und Antionkogene	4
Tab. 3:	Regionäre Lymphknoten	13-14
Tab. 4:	Aufteilung der axillären Lymphknoten auf Level I-III	14
Tab. 5:	Tumordurchmesser, axilläre Metastasierung und Multizentrität	14
Tab. 6:	pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms (2002)	15-17
Tab. 7:	Cancerogene Risikofaktoren	18-19
Tab. 8:	Protoonkogene und verwandte Onkogene	20
Tab. 9:	Antionkogene	21
Tab. 10:	Klassifizierung der Intermediärfilamente	22-23
Tab. 11:	Verwendete Antikörper	30
Tab. 12:	Kategorisierung der untersuchten Ck-Antikörper	31
Tab. 13:	Korrelationen (p-Werte) der beobachteten Test- und Referenzfaktoren	46

13.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Einteilung der Patientinnen in verschiedene Alterstufen	34
Abb. 2:	Regulationsverhältnis der beobachteten Test- und Referenzfaktoren	44
Abb. 3:	Fokal schwache immunhistochemische Färbung für Ck 1 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)	47
Abb. 4:	Fehlender immunhistochemischer Nachweis von Ck 1 in einem gut differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)	47
Abb. 5:	Starke Expression von Ck 5 in einem schlecht differenzierten, mit Nekrosen versehenem, invasiv duktalem Mammakarzinom (10x)	47
Abb. 6:	Negativer Nachweis von Ck5 in einem gut differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom. Deutliche Positivität für Ck 5 in den Myoepithelien des assoziierten in-situ Karzinoms (10x)	47
Abb. 7:	Starke Expression von Ck 8/18 in einem mittelgradig differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (10x)	48
Abb. 8:	Mässiggradige Expression von Ck 8/18 in einem mittelgradig differenzierten, stark lymphoplasmazellulär durchsetzten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)	48
Abb. 9:	Schwache Expression von Ck 10 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)	48
Abb. 10:	Fehlende Expression von Ck 10 in einem mittelgradig differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x)	48

- Abb. 11: Beispiel einer fokalen, überwiegend schwachen Expression von Ck 14 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x) 49
- Abb. 12: Beispiel einer fokalen, teils starken Expression von Ck 14 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x) 49
- Abb. 13: Beispiel einer heterogenen, fokal starken, teilweise fehlenden Expression von Ck 19 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (10x) 49
- Abb. 14: Starke Expression von Ck 19 in einem schlecht differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinom (20x) 49

13.3. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AB	Antibody; Antikörper
Abb.	Abbildung
ABL (abl)	Abelson-Onkogen
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BCL 1	B-cell-lymphoma; Onkogen
BRCA-1 /-2	Breast Cancer Gene -1 / -2; Antionkogene
BRD	Bundesrepublik Deutschland
CHROM	Chromogen Working Solution
Ck	Zytokeratin
C-MYC	Myelo-cyto-matosis-Onkogen
DCC	Deleted in colon carcinoma-Antionkogen
DCIS	ductales Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
EMA	Epitheliales Membranantigen
EPIC-Studie	European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition cohort study
ER	Östrogenrezeptor
ERBA (erbA)	erythroblastic leukemia viral oncogene A
ERB-B2	(Syn.: HER-2/NEU) Human Epithelial growth factor Receptor
EU	Europäische Union
FMS (fms)	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor (CSF-1-R); Fms-Protoonkogen
FOS (fos)	Fos-Onkogen
G	Tumorgrad

HBC	Hereditary Early Onset Breast Cancer
HBOC	Hereditary-Breast-Ovarian-Cancer Syndrome
HRT	Hormonersatztherapie
INT 2	INT-2 Protooncogene Precursor (Fibroblast growth factor 3)
JUN (jun)	Jun-Onkogen
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ (Syn: CLIS)
LK	Lymphknoten
LSAB	Labelled-Strept-Avidin-Methode
NM 23	Non-metastatic-Onkogen
M-CSF-Rezeptor	Macrophage colony-stimulating Factor- Rezeptor
MIB-1	Monoklonal Anti-Ki-67-AK
MOS (mos)	Onkogenbezeichnung
MYB (myb)	Onkogenbezeichnung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PR	Progesteron Receptor
RAF	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog isoform 1
RB1	Retinoblastoma-Antionkogen
REL (rel)	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
SIS	platelet-derived growth factor beta isoform 1
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TNM	Klassifikation maligner Tumoren
TMA	Tissue Microarray-Methode
USA	United States of America
Vim	Vimentin
WHI	Women`s-Health-Initiative
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem