

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

**Immunhistochemische Analyse der Östrogen-, Progesteron- und Androgen-
rezeptorexpression bei invasiven Mammakarzinomen:
Eine methodische und prognostische Studie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

Der Medizinischen Fakultät

Der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Christiane Weining

aus Münster

2002

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Clemens Sorg

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Agnes Piffko-Bankfalvi

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. R.J. Lellé

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domak-Institut für Pathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker-
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Agnes Bankfalvi
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med.

Zusammenfassung

Immunhistochemische Analyse der Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptorexpression bei invasiven Mammakarzinomen: Eine methodische und prognostische Studie

Christiane Weining

Der immunhistochemische Nachweis von Hormonrezeptoren hat schon seit längerer Zeit an Bedeutung für die Therapie und die Prognose der am Mammakarzinom erkrankten Frauen gewonnen. 1991 publizierten Shin et al. [144] die Methode der hydratisierten Autoklavierung als effektive Vorbehandlung bei der immunhistochemischen Darstellung des TAU-Antigens im Gehirn. Bankfalvi et al. [11] zeigten in einer systematischen Analyse einer Reihe von Antikörpern, daß eine modifizierte Autoklavierung, die sog. feuchte Autoklavierung, für die Immunhistochemie eine einfache und äußerst verlässliche Methode zur Antigendemaskierung darstellt [12].

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Überprüfung der Anwendbarkeit der feuchten Autoklaven-Vorbehandlung in der immunhistochemischen Routinediagnostik bezüglich der Östrogen-, Progesteron- und der Androgenrezeptordarstellung beim Mammakarzinom.

Zum anderen sollten die klinisch-pathologischen Korrelationen und der prognostische Wert der immunhistochemisch bestimmten Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren bei Mammakarzinompatientinnen untersucht werden.

Dazu wurde routinemäßig Formalin fixiertes und Paraffin eingebettetes Gewebe von 138 Mammakarzinomen nach Autoklavenvorbehandlung immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet.

Folgende Aussagen konnten getroffen werden:

1. Es konnte eine größere Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Methode im Gegensatz zur herkömmlichen biochemischen Bestimmungsmethode des Östrogenrezeptorgehaltes gezeigt werden.
2. Es konnten direkte Korrelationen in der Expression der Hormonrezeptoren untereinander und eine inverse Korrelation zwischen der Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und dem pathologischen Grading nachgewiesen werden.
3. Unsere univariate Überlebensanalyse der Gesamtüberlebenszeit und der rezidivfreien Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit vom positiven oder negativen Hormonrezeptorstatus bestätigt Östrogen-, Progesteron-, und Androgenrezeptoren als prognostische Indikatoren [6].
4. Alle unsere Ergebnisse stehen weitestgehend in Einklang mit dem aktuellen Stand in der Literatur.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf ein hohes Potential der feuchten Autoklavierung zur Antigendemaskierung für die immunhistochemische Demonstration von Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren in Formalin fixierten und Paraffin eingebettetem Mammakarzinomgewebe hin. Diese Methode ist zuverlässig, sicher reproduzierbar, einfach zu handhaben und auch für den Routinebetrieb eine geeignete Form der Gewebevorbehandlung. Mittlerweile ist sie als Standardmethode der Antigendemaskierung in der Routine-Immunhistochemie am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie eingeführt worden.

Meinen Eltern gewidmet

Bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. A. Bankfalvi für die engagierte und so geduldige Betreuung dieser Arbeit. Meinem Bruder Dr. Götz Cubick und Dr. Martin Kleer möchte ich für die Anregungen und Durchsicht meiner Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt meinem Mann für die unermüdliche Unterstützung und Ermunterung während dieser Zeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie	1
1.2	Bedeutung der Hormonrezeptoren im Hinblick auf das Mammakarzinom	1
1.2.1	Östrogen und sein Rezeptor	3
1.2.2	Progesteron und sein Rezeptor	6
1.2.3	Androgen und sein Rezeptor.....	7
1.2.4	Ansätze der Hormontherapie	8
1.2.5	Prognostische und prädiktive Aussagen anhand der Hormonrezeptoren	12
1.3	Bestimmungsmethoden der Hormonrezeptoren	14
1.3.1	DCCA (dextran-coated charcoal assay).....	15
1.3.2	EIA (enzyme immunoassay) und ICA (immunocytochemical assay).....	15
1.3.3	Antikörper.....	17
1.3.4	Demaskierung der Antigene	18
1.4	Zielsetzung meiner Dissertation.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Untersuchungsmaterial	20
2.1.2	Verwendete Reagenzien.....	20
2.2	Methode.....	21
2.2.1	Immunhistochemische Färbungen	21
2.2.1.1	Vorbereitung der Färbungen	21
2.2.1.2	Durchführung der Färbungen.....	23
2.2.2	Auswertung.....	24
2.2.2.1	Auswertung der Präparate.....	24
2.2.2.2	Statistische Auswertung.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Patientinnenkollektiv	28
3.2	Vergleich der Expression von den immunhistochemisch untersuchten Hormonrezeptoren mit klinisch-pathologischen Parametern	38
3.2.1	Korrelationsanalyse.....	38
3.2.2	Vergleichsanalyse (Chi-Quadrat-Test).....	39
3.3	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse	41
3.3.1	Gesamtüberlebenszeit	42
3.3.2	Rezidivfreie Überlebenszeit.....	44
4	Diskussion.....	46
4.1	Methodische Aspekte	46
4.2	Klinisch-pathologische Aspekte.....	48
4.3	Schlußfolgerungen	50
5	Zusammenfassung	51
6	Literatur	53

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist in Westeuropa und in Nordamerika die häufigste bösartige Erkrankung der weiblichen Bevölkerung. 17% aller Frauen der westlichen Welt erkranken in ihrem Leben an einem Mammakarzinom. Die Inzidenz beträgt 60 pro 100.000 Frauen im Jahr, ca. 50% sterben an diesem Tumorleiden. Der Häufigkeitsgipfel liegt um die Menopause. Karzinome vor dem 25. Lebensjahr treten dagegen ausgesprochen selten auf [19].

In den letzten Jahrzehnten zeichnete sich aber eine stetige Zunahme des Mammakarzinoms ab, wobei diese in den letzten Jahren sicherlich auch auf den weit verbreiteten Gebrauch der Mammographie zurückzuführen ist, durch die auch eine frühzeitige Entdeckung von kleinen oder in situ Karzinomen möglich wurde. Doch trotz der Diagnostizierbarkeit des Mammakarzinoms in einem früheren Stadium seiner Entwicklung und trotz der Fortschritte bezüglich der Behandlung hat sich die Mortalitätsrate in den letzten 25 Jahren nicht bedeutsam verbessert [42, 49].

1.2 Bedeutung der Hormonrezeptoren im Hinblick auf das Mammakarzinom

Bereits um das Jahr 3000 v.Ch. wurden die ersten Konzepte für die Diagnostik und Behandlung des Mammakarzinoms beschrieben. Bis um 1860 n. Chr. war die palliative Tumorentfernung die einzige Therapieform des Mammakarzinoms, was in der Regel den Tod der meisten Frauen infolge der Erkrankung oder der Operation bis Anfang der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts bedeutete. 1867 stellte der englische Arzt MOORE fest, dass Rezidive eines Mammakarzinoms nicht durch ein erneutes Karzinom, sondern durch eine unzureichende primäre Tumorentfernung bedingt waren. Er definierte chirurgische Prinzipien der Tumorchirurgie, die teilweise bis heute gültig geblieben sind: Entfernung des Tumors im Gesunden, Mitnahme der umgebenden Haut, der Lymphknoten, des Fettgewebes und der Pectoralmuskulatur. Um 1882 begann dann mit HALSTED die Ära der radikalen Brustchirurgie, bei der eine komplette Mastektomie mit Entfernung des M. pectoralis major, der gesamten Haut und aller axillären Lymph-

knoten en bloc einschließlich der Lymphknoten oberhalb der Vena axillaris bis zur Clavikula entfernt wurden. Die ersten Berichte über eine endokrine Therapie wurden von BEATSON 1896 veröffentlicht. Sie bezogen sich auf die Wirksamkeit der Ovariectomie beim metastasierenden, inoperablen Mammakarzinom. Damit setzte BEATSON den ersten Meilenstein in der Entwicklung der Hormontherapie beim Mammakarzinom. Im Jahre 1959 wurden die sog. Hormonrezeptoren durch GLASCOCK und HOEKSTRA entdeckt. JENSEN und JAKOBSEN beschrieben im Jahre 1962 als erste, daß die Rezeptorbindung reversibel sein kann. Einen weiteren Meilenstein in der Entwicklung der Hormontherapie des Mammakarzinoms setzten schließlich JENSEN und Mitarbeiter 1971 mit der Entdeckung des Östrogenrezeptors.

Heute wissen wir, daß Östrogen im normalen Mammagewebe zur Stimulation der duktaalen Entwicklung und des Zellwachstums in den Ductuli führt. Dazu passieren die lipophilen Östrogene zunächst die Zellmembran und werden vom Östrogenrezeptor gebunden. Dieser ist wahrscheinlich im Zellkern lokalisiert. Der Östrogenrezeptor-Östrogen-Komplex kann nur funktionell aktiv werden, wenn er sein Target-Gen auffindet, ein Vorgang, der als „Nuclear Processing“ bezeichnet wird. Dies scheint nicht immer zu gelingen, denn bei 30% der Östrogenrezeptor-positiven Tumoren fehlt der Progesteronrezeptor, dessen Synthese abhängig von Östrogen erfolgt. Durch das Nuclear Processing wird die Kodierung der mRNA induziert. Sie führt nicht nur zur Synthese des Progesteronrezeptors, sondern auch zur Produktion von Wachstumsfaktoren. Eine Reihe von ihnen ist bekannt: die Insulin-like growth factors, IGF I und IGF II, die Transforming growth factors, TGF α und TGF β , der Epidermal growth factor EGF [11, 109], pS2-Protein, Kathepsin D, 24-K-Protein und 160-K-Protein. Diese wiederum, insbesondere TGF α und EGF, führen zu einer Rückbildung der Östrogenrezeptoren [70, 109, 131]. Die Signale der Wachstumsfaktoren werden schließlich über Membranrezeptoren vermittelt. Sie steuern metabolische Prozesse der Zelldifferenzierung und Zellproliferation, wobei sich gezeigt hat, daß nur kleine Konzentrationen von Östrogen (1-10pmol) für die Replikation der Zellen notwendig sind, während große Konzentrationen (100pmol-1nmol) für die Induktion von Progesteronrezeptoren und die Zelldifferenzierung gebraucht werden [70].

Im normalen Mammagewebe überwiegen jedoch durch eine physiologische Zellkontrolle die Östrogenrezeptor-negativen Zellen [160].

1.2.1 Östrogen und sein Rezeptor

Östrogen ist ein hoch potentes Mammamitogen, dessen Messung einen hohen Stellenwert in der Behandlung des Mammakarzinoms eingenommen hat. In Mammakarzinomzellen fördert Östrogen das Zellwachstum [14] und stimuliert dadurch das Tumorstadium [74]. Drei Gründe sprechen für diese Annahme: Erstens bestätigen epidemiologische Daten den fördernden Einfluss des Östrogens auf das Mammakarzinom [54]. So hat die Ovariectomie im Hinblick auf die Mammakarzinomentwicklung einen protektiven Charakter, während eine Diäthylstilböstrolgabe zu einer erhöhten Mammakarzinomfrequenz führt [74]. Zweitens wurde an Zellkulturen der wachstumsstimulierende Effekt des Östrogens und der wachstumshemmende Effekt des Antiöstrogens beobachtet [54]. Und drittens begünstigt die Östrogenexposition bei Mäusen und Ratten nach tierexperimentellen Daten die Mammatumorentwicklung [58, 163]. Des Weiteren spielt das Zusammenwirken von Östrogen und Progesteron beim Tumorstadium eine entscheidende Rolle [102, 164]. Im Tierversuch führt Östrogen unter Gestageneinfluß zu intensiverem Tumorstadium als Östrogen allein [74]. Diese Tatsache stützt die Östrogen+Gestagen-Hypothese [73]. Weiter hat man festgestellt, daß die Östrogenkonzentration im Tumorgewebe in der Prämenopause dem Plasmaöstrogenspiegel entspricht [135], während der Östrogengehalt in der Postmenopause im Tumor 5 - 20mal höher liegt als im Plasma oder in anderen Geweben [137]. Er ist unter anderem abhängig vom ER-Gehalt [52]. Doch ist er auch bei ER-negativen Tumoren mehrfach höher als im Plasma [137]. Zudem liegt der Östrogengehalt im peritumoralen Fettgewebe signifikant höher als im übrigen Fettgewebe der tumortragenden Mamma [52]. Eine lokale Östrogenbiosynthese im Tumor bzw. im peritumoralem Gewebe ist deshalb bei postmenopausalen Patientinnen anzunehmen und auch *in vitro* nachgewiesen worden [101]. Abschließend ist jedoch zu sagen, daß die natürlichen Sexualhormone allgemein und das Östrogen im besonderen sicher nicht als Karzinogene anzusehen sind; sie haben jedoch Promotorfunktion. Eine präformierte ruhende Karzinomzelle kann z.B. durch

Östrogen zum Wachstum gebracht werden. Vom Östrogen ist bekannt, daß es präneoplastische Läsionen in malignes Wachstum überführen kann [74, 164].

Der **Östrogenrezeptor** ist ein 65 kDa östrogenbindendes Protein, der bei 70% der Mammakarzinome vorkommt. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation und der Tumorproliferation des Mammakarzinoms [54, 55, 66, 75, 104, 159]. Von ihm hängt das Ansprechen des Tumors auf hormonelle Maßnahmen entscheidend ab. Fehlt er, so beträgt die Ansprechrate allenfalls 10% [99]. Ist zusätzlich der Progesteronrezeptor nachweisbar, so liegt die Rate des Ansprechens auf die Hormontherapie bei 80% [108]. Der Östrogenrezeptor spielt bei der Wachstumsregulation der Mammakarzinomzelle eine zentrale Rolle. Nach einer Hormonexposition verhalten sich Mammakarzinomzellen anders als Normalzellen. Im Unterschied zu normalen Brustdrüsenzellen, die einen niedrigen ER-Gehalt haben, zeigen Karzinomzellen häufig eine Up-Regulation der Östrogenrezeptoren und damit meist eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem Östrogen [73]. Zudem werden die ER-positiven Karzinome mit zunehmendem Alter häufiger; d.h. in der Menopause steigt der Anteil ER-positiver Mammakarzinome, auch die ER-Konzentration steigt an [109]. Die Hormonempfindlichkeit der Tumorzellen für Östrogen hängt von der Zahl ihrer ER ab [109]. Im Zuge der Krankheitsprogression nehmen die Hormonrezeptoren ab, oder es kann auch zu einer Struktur- und Funktionsänderung der Rezeptoren kommen [33, 76]. Damit nimmt die Hormonempfindlichkeit der Tumorzellen ab; gleichzeitig nimmt ihr Malignitätsgrad zu. Diese Entwicklung erfolgt in mehreren Stufen [74, 76]. Das Tumorwachstum ist zunächst hormonabhängig; der Tumor wächst also nur unter Hormoneinfluß. In der nächsten Entwicklungsstufe ist der Tumor nur noch hormonempfindlich, d.h. das Tumorwachstum ist durch hormonelle Maßnahmen noch manipulierbar. In der letzten Stufe kommt es zu einem hormonunabhängigem Wachstum. Der stufenweise Prozeß mit Abnahme der Hormonempfindlichkeit geht mit einer zunehmenden Entdifferenzierung der Karzinomzelle und einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit einher [74, 76]. Während bei östrogenabhängigem Tumorwachstum die Wachstumsfaktoren über die Genaktivierung durch den Östrogen-ER-Komplex gesteuert werden, ist bei hormonrezeptornegativen Tumoren diese Kopplung gestört. Die parakrin bzw. autokrin auf die Zelle einwirkenden Wachstumsfaktoren sind östrogenunabhängig. Auffällig ist, daß das c-erb-2-Onkogen bei rezeptornegativen Tumoren verstärkt exprimiert wird. Es kodiert anscheinend ein einem EGF-Rezeptor ähnliches

Tyrosinkinaseprotein [33]. Der EGF kann in einer gemischten Zellpopulation von ER-negativen Zellen parakrin auf die ER-positiven Zellen übertragen werden, und diese können zum Wachstum stimuliert werden; dabei können sie der Tamoxifenkontrolle entzogen werden [82]. Möglicherweise läßt sich so die Tamoxifenresistenz bei ER-positiven Tumoren mit einer gemischten Zellpopulation erklären [130]. Die Verminderung der Hormonrezeptoren im Laufe der Tumorprogression erfolgt individuell sehr unterschiedlich. Es kommt vor, daß zunächst nur ein Hormonrezeptor nicht mehr nachweisbar ist, entweder der Progesteronrezeptor (PR) oder der ER. Diese Veränderungen führen zu einer verminderten Hormonbeeinflußbarkeit des Mammakarzinoms [105, 109].

Bei negativem PR und gleichzeitig positivem ER wird ein Postrezeptordefekt angenommen, der dazu führt, daß der PR entweder nicht mehr oder aber in veränderter Struktur gebildet wird und sich so mit den üblichen Methoden nicht mehr nachweisen läßt. Umgekehrt hat sich gezeigt, daß bei Tumoren mit negativem ER und positivem PR die hormonbindende Domäne des ER defekt ist. Diese Variante des ER, die dem üblichen Nachweis entgeht, ist jedoch noch zur Transkription und Induktion des östrogenabhängigen PR fähig [33, 76, 164]. Nun sind schon zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Hormonrezeptoren beim Mammakarzinom in sehr unterschiedlicher Dichte ausgeprägt. Wie in Tab. 1 zu sehen ist, überwiegen die Fälle mit doppelt positivem Rezeptor etwas über die Patientinnen mit doppelt negativem Rezeptor. Die Patientinnen, die nur einen positiven Rezeptor aufweisen, sind in der Minderheit.

Hormonrezeptorstatus	Tumorresponsrate %
ER+, PR+	43
ER-, PR+	7
ER+, PR-	12
ER-, PR-	38

Tabelle 1: Hormonrezeptorstatus im Primärkarzinom bei 508 Patientinnen [105]

Der Prozentgehalt des ER-positiven Karzinomgewebes ist bei Primärtumoren in der Postmenopause (79%) deutlich höher als in der Prämenopause (62%). Bei Rezidiven ist

dieser Unterschied weniger ausgeprägt. Das gemeinsame Vorkommen beider Rezeptoren ist in beiden Altersgruppen gleich; bei Rezidiven seltener als bei Primärtumoren [167]. In der Prämenopause werden deutlich mehr rezeptornegative oder -arme Tumoren gefunden, was mit zahlreichen Angaben in der Literatur übereinstimmt und wahrscheinlich auf die Besetzung der Rezeptoren durch den hohen endogenen Östrogenspiegel zurückzuführen ist. Nun lassen sich folgende Beobachtungen betreffend der Rezeptorverteilung machen: ER-positive Tumoren sind höher differenziert. Ihr histologisches Grading ist deshalb niedriger, die Elastose und die lymphoplasmazytoide Reaktion sind gering ausgeprägt, euploide Kerne dominieren [44], die Proliferationsaktivität ist gering [40, 148]. Dagegen sind ER-negative Tumoren gekennzeichnet durch hohes Grading, Kernanplasie, Aneuploidie und hohe Proliferationsaktivität [99].

1.2.2 Progesteron und sein Rezeptor

Die Progesteronrezeptoren werden im Gegensatz zu den Östrogenrezeptoren häufiger bei jüngeren Frauen gefunden. Es besteht bei ihnen keine Korrelation zum Menopausenstatus [28]. Das gemeinsame Vorkommen beider Rezeptoren ist in beiden Altersgruppen gleich; bei Rezidiven seltener als bei Primärkarzinomen [167]. Progesteron führt im normalen Mammagewebe vorwiegend zu einer Differenzierung und Entwicklung der lobulären und alveolären Strukturen [111]. Im Mammakarzinom hingegen ist der Mechanismus der Progesteronwirkung bis heute nicht ganz klar [56]. Auf zellulärer Ebene ist die Progesteronwirkung widersprüchlich. Wachstumshemmende und -fördernde Effekte werden gleichermaßen beschrieben [63]. In Tierversuchen konnte bei DMBA-induzierten Tumoren bei Ratten gezeigt werden, daß niedrig dosiertes Medroxyprogesteronacetat (MPA) (1mg/kg) das Tumorwachstum steigert, während eine höhere Dosis (100 mg/kg) das Wachstum hemmt [32]. Das heißt, daß sich Rückbildungen von Mammakarzinomtumoren, die im Tierversuch und auch klinisch beobachtet wurden, auf bestimmte pharmakologischen Gestagendosen beziehen [61, 68, 73]. Diese wachstumshemmende Wirkung geht jedoch nicht direkt über den ER, obwohl bekannterweise rezeptorpositive Karzinome besser auf synthetische Gestagene ansprechen als rezeptornegative. So zeigen in vitro ER-negative Zellen, die gegen Tamoxifen resistent sind,

eine Wachstumshemmung bei Zusatz eines synthetischen Progesterons [63]. Intrazellulär induziert Progesteron auch Enzyme, z.B. 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert die Konversion des Östradiols zu den weniger potenten Östrogenen. Dies könnte ein zusätzlicher Hemmechanismus des Progesterons sein [118, 164]. Progesteron besitzt außerdem eine systemische Wirkung über die Hypophyse. In der Postmenopause kommt es zur Suppression von ACTH, Cortisol, FSH, LH, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Östradiol. Dies läßt vermuten, daß die Behandlung mit Progesteron in vivo, möglicherweise ähnlich wie bei der Aminoglutethimidtherapie, einer chemischen Adrenalectomie entspricht [56]. Für diese These spricht auch, daß das Tumorgeschehen nach Therapie mit Aminoglutethimid durch Progesteronabkömmling kaum mehr zu beeinflussen ist [4, 164].

Hormonrezeptor	Prämenopause	Postmenopause
ER (%)	64	79
ER (fmol/mg)	8	46
PR (%)	58	53
PR (fmol/mg)	8	6

Tabelle 2: Zunahme der Östrogenrezeptoren nach Eintritt der Menopause [27]

1.2.3 Androgen und sein Rezeptor

Über die Sensitivität der Mammatumoren gegenüber Androgen und das Vorkommen und den prognostischen Wert des Androgenrezeptors ist bis heute noch nicht viel bekannt. Pharmakologische Dosen des Androgens bewirken eine Regression bei Mammakarzinomen von Mäusen, die durch 7.12-dimethylbenza-anthracene induziert wurden [156], während bei physiologischen Konzentrationen von Androgen eine Wachstumsstimulation beobachtet wurde [150]. In dieser Zelllinie scheint der wachstumsstimulierende Effekt von hohen Dosen von Östradiol durch den Androgenrezeptor vermittelt zu sein [93]. Ein direkter wachstumshemmender Effekt des Androgens auf das hormonabhängige menschliche Mammakarzinom wurde ebenfalls nachgewiesen [122], während der wachstumsstimulierende Effekt in Gewebekulturen beobachtet wurde, bei denen

Konzentrationen oberhalb der physiologischen Norm gebraucht wurden [90]. In klinischen Versuchen [48] wurde bei dem Gebrauch von synthetischen Androgenen eine objektive Remission bei ungefähr 25% der Patientinnen mit fortgeschrittenen Brustkrebs erzielt. Hinweise auf das Ansprechen einer Androgentherapie sollte durch den Androgenrezeptor bzw. durch das Vorhandensein eines anerkannten Produkts des Androgenstoffwechsels sein. Ein großes Problem liegt aber in der Thermolabilität des Rezeptors, wodurch dessen Nachweis erschwert ist. Nun hat man herausgefunden, daß die Stabilität des Androgenrezeptors sich durch „molybdate ions“ erhöht [51]. Mit Hilfe dieser neuen sensitiveren Meßmethode hat sich gezeigt, daß bei 80% der Mammakarzinomen Androgenrezeptoren vorkommen. Danach sind AR noch in den Tumoren vorhanden, in denen ÖR und PR Expression nicht mehr nachweisbar sind [85]. In metastatischem Gewebe sind AR mit der doppelten Frequenz wie PR vorhanden und einer von vier dieser Tumoren exprimiert den AR als alleinigen Hormonrezeptor [85]. Das unterstützt die Theorie, daß einige der nützlichen Effekte der hoch dosierten Progestin Behandlung bei fortgeschrittenem Mammakarzinom durch den AR vermittelt werden. Das Wissen um den AR-Status in Tumoren könnte so bei der Selektion einer optimalen endokrinen Therapie bei rezidivierenden Tumoren von Hilfe sein [85].

1.2.4 Ansätze der Hormontherapie

Die endokrinen Therapieansätze beim Mammakarzinom lassen sich nach der Therapieart einteilen: Man unterscheidet die ablative Hormontherapie von der additiven, der kompetitiven und der inhibtiven Hormontherapie.

Die **ablative Hormontherapie** beinhaltet die Ausschaltung der Hormone, die das Tumorstadium stimulieren, d.h. vor allem die Östrogene. Eine Möglichkeit dabei ist die Ovariectomie, die operativ oder durch Bestrahlung (Radiomenolyse) erfolgen kann. Die Anwendung der Aromatasehemmer ist eine weitere Möglichkeit. Sie entspricht einer „chemischen Adrenalectomie“ und ist der Hypophysektomie gleichwertig. Aromatasehemmer führen zu einer Reduktion der extragonadalen Östrogen- bzw. Östradiolbildung. Damit steht dem östrogenempfindlichen bzw. -abhängigen Mammakarzinom das wachstumsfördernde Hormon nicht mehr zu Verfügung, und es kommt zur Wachstums-

hemmung bzw. Rückbildung des Tumors. Die Östrogenbildung kann hauptsächlich in der Postmenopause durch Aromatasehemmer beeinflusst werden, während dagegen der Versuch, in der Prämenopause die Östrogensynthese im Ovar durch Aromatasehemmer zu vermindern, zu einem Anstieg der ovariellen Östrogenproduktion über Stimulation der Hypophyse führt [139]. Bei manchen Aromatasehemmern (wie z.B. Aminoglutethimide) ist eine begleitende Therapie mit physiologischen Konzentrationen von Hydrokortison notwendig, um einer adrenalen Insuffizienz und einem reflektorischem Anstieg von ACTH zuvorzukommen [136]. Es gibt funktionell zwei Arten der Aromatasehemmer: Zum einen die Suizidinhibitoren, die in Konkurrenz zum Substrat Androstendion treten, indem sie sich an die aktive Seite der Aromatase fixieren und das Enzym irreversibel ausschalten. Zum anderen gibt es die kompetitiv wirksamen Inhibitoren, die sich reversibel an das Enzym binden. Nur in Gegenwart des Inhibitors besteht dann die Enzymhemmung [137]. Es konnte schließlich gezeigt werden, daß eine Korrelation zwischen dem Gehalt der Aromatase im Tumor und seinem klinischen Ansprechen auf Aromatasehemmer besteht. 11 von 18 Patientinnen mit nachgewiesener Aromataseaktivität zeigten auf Aromatasehemmergabe eine Regression: Dies war bei keiner von 15 Patientinnen mit fehlender Aromataseaktivität der Fall [100]. Bei den Aminoglutethimiden als Aromatasehemmer beträgt die Ansprechrate 2-50%, abhängig vom ER Status und der Patientencharakteristik. 15 von 20 % der Patientinnen, die nicht mehr auf eine Tamoxifentherapie reagieren, sprechen noch auf eine Aminoglutethimidtherapie an. Eine weitere Möglichkeit der ablativen Therapie stellen die Adrenalektomie und die Hypophysektomie dar. Sie sind heute wegen der damit erforderlichen lebenslänglichen Hormonsubstitution und wegen der hohen Morbidität der Operation obsolet. Das Mittel der Wahl sind derzeit die GnRH-Agonisten. Sie binden an spezifischen GnRH-Rezeptoren an der Hypophyse mit einer um den Faktor 20-150 stärkeren Bindungsaffinität an [80] und führen zu einer Rezeptor-Desensitivierung (Down-Regulation) [72]. Dadurch wird die LH- und FSH-Synthese blockiert und damit die Steroidbiosynthese gehemmt. Beide Plasmaspiegel bleiben dann über Jahre auf tiefem Niveau [80]. Durch Suppression der Hypophyse kommt es zu einer hypogonadotropinen Ovarialinsuffizienz. Klinisch wird dadurch ein Zustand wie nach Ovarektomie simuliert. Durch die Anovulation ist der Progesteronspiegel tief; der Östrogengehalt im Plasma gleicht dem eines Zustandes nach Kastration. Bei zu niedriger Dosis von GnRH-Agonisten kann es

jedoch wieder zu einem Östrogenanstieg kommen [80]. Es gibt allerdings auch Hinweise für eine direkte antiproliferative Wirkung an der Mammakarzinomzelle, die ebenfalls GnRH-Rezeptoren aufweist [72] [14]. So kann z.B. eine Wachstumsstimulation, die durch Östrogen oder Prolaktin hervorgerufen wurde, durch GnRH-Analoga verhindert werden. Auch die Induktion des Östradiol induzierten PR unterbleibt [56]. Durch die selektive GnRH-Wirkung werden die Androstendion- und Cortisolspiegel im Plasma nicht vermindert. Das Prolaktin steigt kurzfristig an, um wieder auf den üblichen Basispiegel abzusinken. Der physiologische Nachtanstieg verschwindet [80, 164].

Bei der **additiven Hormontherapie** gibt man Hormone in einer hohen, pharmakologischen Konzentration. Von den früher verabreichten Östrogenen, Androgenen, Gestagenen und Kortikosteroiden besitzen heute nur noch die Gestagene Medroxyprogesteronacetat (MPA) und Megestrolacetat eine Bedeutung als second-line Hormontherapie nach Versagen von Tamoxifen. Die Wirkung der hoch dosierten Gestagene wird vermutlich über eine Bindung an den Progesteronrezeptor und über negative feed-back-Mechanismen (LH-RH-Hemmung) erreicht [41, 113, 162] [14]. Wichtig dabei ist die richtige Dosis des Progesterons, denn wie bereits erwähnt, konnte bei DMBA-induzierten Tumoren an Tieren gezeigt werden, daß niedrig dosiertes MPA (1mg/kg) das Tumorwachstum steigert, während eine höhere Dosis (100mg/kg) das Wachstum hemmt [32].

Bei der **kompetitiven Hormontherapie** antagonisieren Substanzen an den endogenen Hormonrezeptoren (kompetitiver, reversibler, dosis-abhängiger Antagonismus). Die wichtigste Substanz aus dieser Gruppe ist das Antiöstrogen Tamoxifen, dessen Wirkungsmechanismus nicht nur durch Bindung am ER, sondern auch durch Bindung an einen eigenen „Antiöstrogen-Rezeptor“ und durch Hemmung der als Bestandteil einiger second-messenger Systeme funktionierenden Proteinkinase C vermittelt wird [89, 90, 107]. Tamoxifen führt dabei zu einer Verminderung der RNA und DNA-Synthese. Es kommt dabei zur Verlangsamung der Zellproliferation. Der Zellzyklus wird in der G1-Phase bzw. in der G1/S-Interphase blockiert [70, 131]. Die Halbwertszeit von Tamoxifen und seinen aktiven Metaboliten beträgt nach Erreichen des Sättigungsgrads sieben Tage [69], wesentlich länger als die Halbwertszeit des Östrogen-ÖR-Komplex beträgt [115]. Tamoxifen ist nun letztlich Mittel der Wahl in der adjuvanten Therapie bei prä- und postmenopausalen Patientinnen mit ER/PR-positiven Tumoren und führt zu länge-

ren rezidivfreien Zeiten und einer längeren Überlebensrate [1, 65]. Insgesamt liegt die Ansprechrate des Tamoxifens bei metastasierendem, ER-positivem Mammakarzinom bei $\pm 50\%$ [61, 62, 108]. Die Ansprechrate korreliert dabei streng mit der ER-Expression im primären Mammakarzinom [9, 23, 91, 97, 108, 114, 128, 132, 161, 165] und nimmt mit wachsender ER-Konzentration [9, 23, 91, 98, 108, 165] oder ER-Expression [9, 16] zu. Die Ansprechrate ist ebenfalls in solchen Tumoren höher, in denen der ER funktionell tätig ist, wie man indirekt an der PR-Expression erkennen kann [21, 31, 108]. Leider ist aber die Dauer der Ansprechbarkeit auf Tamoxifen meist aufgrund einer sich entwickelnden Tamoxifenresistenz im Tumorgewebe begrenzt. Der entsprechende Mechanismus, der zur Tamoxifenresistenz führt, ist bis heute noch nicht ganz geklärt [38]. Beobachtet wurde aber, daß das c-erb-2-Onkogen bei rezeptornegativen Tumoren verstärkt exprimiert wird. Dieses Onkogen kodiert anscheinend ein einem EGF-Rezeptor ähnliches Tyrosinkinaseprotein [33]. Der EGF kann in einer gemischten Zellpopulation von ER-negativen Zellen parakrin auf die ER-positiven Zellen übertragen werden, und diese können zum Wachstum stimuliert werden; dabei können sie der Tamoxifenkontrolle entzogen werden [82]. Dies wäre ein Ansatz, die Tamoxifenresistenz bei ER-positiven Tumoren zu erklären [130]. ER-negative Tumoren ohne EGF-Expression würden damit eine erhöhte Ansprechrate auf endokrine Therapie aufweisen [129]. Neue Studien haben des weiteren gezeigt, daß tamoxifenresistente Tumoren gelegentlich noch ansprechbar sind auf neu entwickelte reine Antiöstrogene [37, 39, 64] oder daß sie noch mit verschiedenen hormonalen Zusammensetzungen für eine kurze Zeit behandelt werden können [110]. So berichten verschiedene Studien [83, 159], daß eine kombinierte Therapie von Androgen und Antiöstrogenen Vorteile gegenüber der alleinigen Antiöstrogen Behandlung zeigt [84]. Eine weitere Möglichkeit der kompetitiven Hormontherapie bietet das Antigestagen RU 486 (Mifepristone). Es hat antitumorale Effekte, die durch Antagonisierung des Progesterons am PR hervorgerufen werden. Allerdings liegen noch keine ausreichenden klinischen Erfahrungen vor [60]. Die Toxizität von Mifepristone ist allerdings erheblich [56][14].

Die **inhibitive Hormontherapie** wird durch Hemmung von Enzymen (Aromatase, Hydroxylase) erreicht, die an der Biosynthese von Hormonen beteiligt sind. Durch die Inhibition der Aromatase wird die Umwandlung des Androstendions in Östron gehemmt und die Plasmakonzentration des Östrogens entspricht dem Zustand nach Adrenalekto-

mie (Aromatasehemmer = chem. Adrenalektomie) [14]. Die Aromatasehemmer werden vor allem als second-line Hormontherapie bei postmenopausalen Patientinnen und als Metastasentherapie (v.a. Knochenmetastasen) angewandt. Durch die Inhibition von Hydroxylasen wird die Bildung von Cortisol und 18-OH-Corticosteroiden verhindert, so daß ein Addison-Syndrom entstehen kann [138]. Zusammenfassend kann man sagen, daß bei einem unausgewählten Kollektiv von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom ungefähr ein Drittel aller Frauen auf eine hormonelle Therapie anspricht. Werden Hormonrezeptoren und andere Risikofaktoren zusätzlich berücksichtigt, so steigen die Erfolgsquoten auf ein Halb bis zwei Drittel des Patientenguts an [164]. Die Wahl der hormonellen Maßnahmen wird nach dem Menopausenstatus, der Risikogruppe, dem Metastasierungstyp und dem Allgemeinzustand der Patientin ausgerichtet. Bei einem Ansprechen auf eine erste hormonelle Maßnahme sind weitere hormonelle Therapieversuche im Rezidivfalle gerechtfertigt, da bis zu einem Drittel der Patientinnen noch einmal ansprechen. Bei Patientinnen, die auf die erste hormonelle Maßnahme nicht ansprechen, liegt die Erfolgsquote bei einem zweiten hormonellen Therapieversuch unter 10% [56, 99]. Bei Patientinnen mit negativem Rezeptorstatus ist der Therapieerfolg auf hormonelle Maßnahmen bei 10% oder weniger anzusetzen. Als Erfolgsparameter dienen klinische Befunde und bildgebende Verfahren. Auch positive Tumormarker (CA 15-3, CEA) sind zur Therapiekontrolle geeignet. Da die Nebenwirkungen der hormonellen Maßnahmen in der Regel gering sind, ist die Ausschöpfung der hormonellen Möglichkeiten in dazu geeigneten Fällen immer sinnvoll [164].

1.2.5 Prognostische und prädiktive Aussagen anhand der Hormonrezeptoren

Die Prognose des primären Mammakarzinoms kann von Patientin zu Patientin sehr stark variieren. Einige Patientinnen werden nur durch lokale Therapie geheilt oder einige überleben viele Jahre, selbst nach Metastasenentwicklung. Ein kleiner Prozentsatz von Patientinnen überlebt sogar mehr als zehn Jahre, ohne irgendeine Therapie in Anspruch zu nehmen [18]. Bei anderen Frauen folgt die Krankheit dagegen einem aggressiven, schnell progressivem Verlauf, der sich als sehr hartnäckig gegenüber den Behandlungsmethoden erweisen kann [42]. Insgesamt sterben 40-50% der am Mammakarzinom

erkrankten Frauen [6]. Bei Patientinnen mit ER-und/oder PR-positiven Tumoren, die nach ihrer initialen Operation nicht mehr behandelt wurden, zeigt sich ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall und eine längere Überlebensrate als bei Patientinnen mit Rezeptor-negativen Tumoren, auch wenn die Stärke der Verbesserung relativ gering ist [20, 43, 109, 147]. ER-negative und EGFR-positive Tumoren hingegen stellen einen Marker für hormonell nicht ansprechbare Tumoren dar [129]. Interaktionen mit anderen Faktoren haben ebenfalls einen Einfluß auf die prognostische Rolle der beiden Rezeptoren. Vorausgegangene Berichte haben zum einen gezeigt, daß die Hormonrezeptoren eine stärkere prognostische Rolle bei Patientinnen mit Lymphknotenbefall spielen [2, 96, 102], zum anderen, daß sie besser als Kurzzeitprognosefaktor zu gebrauchen sind [10, 81, 154]. Die Rolle der Hormonrezeptoren wurde schließlich in Relation zum Menopausenstatus gesetzt, allerdings wurde kein Konsens gefunden, ob ihr Effekt stärker in prä- [92, 102] oder in postmenopausalen Zuständen der Frauen war [92, 121]. Das könnte aus verschiedenen Definitionen des menopausalen Status resultieren und würde nahelegen, daß der ÖR- und PR-Status bei mittelalten Patientinnen separat untersucht werden sollte. Einige Berichte haben sich auf den Effekt des ÖR- und PR-Status in Relation zum Alter der Patientinnen konzentriert. Shek et al [141] zeigte, daß der ÖR-Status bei Patientinnen unter 45 Jahren einen schwachen prognostischen Effekt hat, wohingegen sich der größte prognostische Effekt bei Frauen zwischen 45 und 54 Jahren zeigte. Schließlich ist der ÖR-, PR- und der AR-Status für die Vorhersage der Fünf-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen mit 60 Jahren oder jünger wichtiger als für Patientinnen über 60 Jahre [30]. Durch die Bestimmung der Hormonrezeptoren läßt sich also heute mittlerweile die Ansprechrate auf eine endokrine Therapie abschätzen. Sind in dem Tumorgewebe Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren zu finden, liegt die Ansprechrate der endokrinen Therapie bei 77 %. Ist nur der Östrogenrezeptor positiv und der Progesteronrezeptor negativ, liegt die Ansprechrate bei 27 %, wobei experimentelle Untersuchungen darauf hinwiesen, daß solche „falsch-positiven“ Östrogenrezeptoren von gespleißten Varianten des Östrogenrezeptors herrühren können, die transkribiert werden, aber funktionell inaktiv sind [46]. Östrogenrezeptor-negative und Progesteronrezeptor-positive Mammakarzinome haben wiederum eine signifikant höhere Ansprechrate auf eine hormonelle Therapie als Östrogenrezeptor-negative und Progesteronrezeptor-negative Tumoren. Neue Untersuchungsergebnisse weisen aber darauf hin, daß

einige dieser „falsch-negativen“ Östrogenrezeptorwerte aus zusätzlichen, also Spleißingvarianten des Rezeptors resultieren können, denen die hormonbindende Domäne fehlt. Dadurch können sie nicht durch immunhistochemische Untersuchungsmethoden entdeckt werden, können aber dennoch transkribiert werden und noch eine funktionelle Restaktivität besitzen [46].

Wie in vergleichenden immunhistochemischen Studien festgestellt wurde, sind einige dieser Diskrepanzen aber auch auf Fehler in der biochemischen Methode, z.B. bei Verdünnungseffekten von stromareichen Tumoren zu finden [87, 88]. Leider ist bis heute noch kein methodischer Konsens zur Beurteilung der ÖR, PR und AR durch die Immunhistochemie gefunden worden. Bis es dazu kommt, muß sich jedes Labor, das dieses Verfahren anwendet, selbst überprüfen oder Verfahren von anderen Labors verwenden, die sich selbst überprüft haben [6].

Phenotyp	Inzidenz	Ansprechrate
ER+/PR+	58%	77%
ER+/PR-	23%	27%
ER-/PR+	4%	46%
ER-/PR-	15%	11%

Tabelle 3: Vorhersagewert des ER und PR Phänotyps bei Patientinnen mit fortgeschrittenem metastasiertem Mammakarzinom, die eine endokrine Therapie bekommen [6, 97]

Insgesamt gesehen wird die Mortalitätsrate des Mammakarzioms durch zytotoxische und durch hormonelle Therapie wahrscheinlich um ca. 30% bzw. 20% gesenkt [1, 6]. Zusammenfassend kann man sagen, dass beide Rezeptoren, der Östrogen- und der Progesteronrezeptor, prognostische Indikatoren sind, jedoch durch keinen von beiden eine strenge Vorhersage gemacht werden kann [6].

1.3 Bestimmungsmethoden der Hormonrezeptoren

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus ist heute ein wichtiger Eckstein sowohl für die Behandlung als auch für die Prognose der Mammakarzinompatienten.

1.3.1 DCCA (dextran-coated charcoal assay)

Biochemische Demonstrationen, wie durch die dextran-coated charcoal assay (DCCA), sind seit mehr als zehn Jahren technisch und klinisch anerkannte Verfahren zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus. Und in der Tat gründet sich das meiste unseres Wissens über Hormonrezeptoren im Mammakarzinom auf Studien, die diese Methoden angewandt haben. Sie wurden daher zu Recht zu den „golden standards“ bei der Bestimmung der ER und PR-Gehälter ernannt [5]. Allerdings weist die biochemische Bestimmungsmethode auch einige Nachteile auf. So erfordert diese Technik relativ große Gewebeproben von ungefähr 300 mg, was für sehr kleine Tumoren, wie sie häufig durch Mammakarzinomscreening entdeckt werden, ein Problem ist. Der anschließende Transport des Gewebes muß im tiefgefrorenem Zustand erfolgen, um den Verlust der Bindungsaktivität zu verhindern. Für größere Distanzen zum nächsten Labor kann das mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden sein [13, 116]. Im Labor wird dann durch das DCC-Verfahren die Steroidbindungskapazität eines Gewebshomogenats bestimmt, mit fehlender Diskriminierung zwischen neoplastischem und nichtneoplastischem Gewebe. Das birgt u.a. die Gefahr falsch positiver Ergebnisse in sich und stellt mit Sicherheit den größten Nachteil der DCC-Methode dar [155]. Um die Analyse des Gewebes zu vervollständigen, werden im Labor oft einige Tage benötigt [123], und die Anzahl der Proben, die gleichzeitig untersucht werden kann, ist dabei begrenzt [13]. Insgesamt erfordert der Rezeptornachweis nach der DCC-Methode ein gut ausgerüstetes biochemisches Labor, das auch für den Umgang mit radioaktivem Material ausgerichtet ist, fordert einen relativ hohen Material- und Personalaufwand und ist daher mit großen Kosten verbunden [25, 34]. Der Vorteil der DCC-Methode liegt jedoch in ihrer hohen Meßgenauigkeit [155].

1.3.2 EIA (enzyme immunoassay) und ICA (immunocytochemical assay)

Durch die durch King und Greene 1984 [77] und später durch Greene und Press 1987 [47] möglich gewordene Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den ÖR bzw. den PR konnte eine immunoenzymatische Methode (EIA) entwickelt werden, die auf einer direkten Bestimmung der Steroidrezeptormoleküle basiert. Diese Immunoenzymatische

Methode verlangt allerdings, genauso wie die biochemischen Methoden, die Homogenisation der Gewebeschnitte. Mit diesem Verlust der Zellintegrität ist es dann ebenfalls unmöglich, den Grad der Heterogenität der Rezeptorverteilung innerhalb des Tumors festzusetzen. Dann hat man herausgefunden, daß eine direkte Demonstration der ER und PR in Gewebeschnitten von Karzinomgewebe mit einer immunhistochemischen Methode (ICA) möglich ist, die dieselben monoklonalen Antikörper benutzt (ER-ICA und PR-ICA) [25, 67, 78, 112, 120]. Zahlreiche Autoren haben mittlerweile eine gute Korrelation zwischen der EIA [71, 86, 106, 166] oder ICA [8, 17, 50, 78, 116, 119, 133, 153] und der biochemischen Methode (DCC) anhand des Mammakarzinoms herausgefunden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der EIA mit der DCC-Methode sind ausgezeichnet für Schnitte mit Steroidrezeptorwerten von mehr als 10 fmol/mg protein [158, 166]. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der ER-ICA mit der DCC-Methode liegt durchschnittlich bei 86% [15, 29, 50, 53, 94, 119, 145, 157] und die der PR-ICA mit der DCC-Methode bei durchschnittlich 82% [50, 53, 95, 157]. Eine gute Beziehung wurde ebenfalls zwischen den Ergebnissen der EIA und der ICA bezüglich des ER festgestellt [35, 50, 57]. Allerdings verliert sich diese Korrelation, wenn die Schnitte ER-Werte von kleiner 15 fmol/mg protein enthalten [35]. Zwischen der PR-EIA und PR-ICA Methode wurde ebenfalls eine gute Korrelation gefunden [35, 50], die sich allerdings bei Tumoren mit einem PR-Gehalt vom kleiner 30 fmol/mg protein verliert [35]. Der Vorteil der immunhistochemischen Methode liegt in der möglichen exakten zellulären Zuordnung der Befunde bei allerdings nur semiquantitativer Abschätzung der Reaktion. Insgesamt hat sich die Immunhistochemie als äußerst vielseitige und verlässliche Methode in der diagnostischen Pathologie etabliert. Sie ist eine sensitive, spezifische und eine kostensparende Methode. Der hohe Standard der verwendeten Antikörper sowie die Verwendung ausgesuchter Antikörperpanels zum positiven Nachweis und negativen Ausschluß gesuchter Antigene (Erstellung sogenannter Antikörper-Profile) gewährleistet eine breite Anwendbarkeit. Stark zunehmende Bedeutung für die Therapie gewinnt der immunhistochemische Nachweis von Prognose- und Proliferationsmarkern, wie z.B. die Bestimmung der Hormonrezeptoren beim Mammakarzinom [140]. Möchte man nun immunhistochemische Reaktionen quantifizieren, müssen sowohl die Färbungsintensität als auch die Proportion (der Anteil der ER-positiven Zellen) berücksichtigt werden [155]. Als Nachteil der Immunhistochemie ist die gewisse Subjektivität bei der semi-

quantitativen Auswertung zu erwähnen, auch wenn bereits zahlreiche verschiedene Auswertungsmöglichkeiten beschrieben wurden. Eine objektive Auswertungsmöglichkeit stellt die Anwendung der computergestützten „Image Analyse“ dar [79, 126, 127]. Zudem müssen noch standardisierte Techniken zur Qualitätssicherung eingeführt werden, um wie bei anderen medizinischen Untersuchungen die Sicherheit und Wertigkeit der Methode zu gewährleisten [140].

1.3.3 Antikörper

Einer der ersten verfügbaren Antikörper des ER war der Antikörper H222 von den Abbott Laboratories, der für den Gebrauch an Gefrierschnitten verwendbar war. Für den Gebrauch an routinifixiertem Material war er allerdings nur bedingt geeignet [45]. In den letzten 10 Jahren wurden daher große Anstrengungen unternommen, Untersuchungen auch an fixiertem Gewebe durchführen zu können. Modifikationen der Fixation und der Fixiermittel [36, 117, 124, 143, 149, 152], zusammen mit verschiedenen Methoden der enzymatischen Vorverdauung [7, 22, 26, 29, 59, 145, 146, 151], wurden beschrieben, um Rezeptorantigenität in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebetteten Routinewebe des Mammakarzinomsgewebes zurück zu erlangen [12]. Mit der Einführung von Antikörpern wie ER ID5 [3], die auch an fixierten, in Paraffin eingebetteten Schnitten anwendbar sind, hat sich die Situation sehr verändert. Nun konnten die Rezeptorbestimmungen als Teil der histopathologischen Routineuntersuchungen angewandt werden [13], und auch die Möglichkeit retrospektiver Studien war gegeben. Parallel zu der Entwicklung der ER-Antikörper wurden auch PR-Antikörper entwickelt. Im Gegensatz zum ER konnte der originale PR-Antikörper KD 68 [125], von den Abbott Laboratories hergestellt, von vorneherein gut an Formalin fixiertem und Paraffin eingebetteten Gewebe wie an Gefrierschnitten angewandt werden [99]. Andere PR-Antikörper wie z.B. NCL PGR sind mittlerweile entwickelt worden, die genauso gute Ergebnisse an fixiertem Material geben [103] und zudem weniger teuer sind [13].

1.3.4 Demaskierung der Antigene

Ein Teil dieses Erfolges, daß manche Antikörper nun auch an Formalin fixiertem und Paraffin eingebettetem Gewebe anzuwenden waren, ist der Einführung der Mikrowellenvorbehandlung zu verdanken. Es galt zwar in der Immunhistochemie lange als eine Todsünde, das zu untersuchende Gewebe höheren Temperaturen auszusetzen, aber in den letzten Jahren wurden insbesondere durch die Einführung der Mikrowellenvorbehandlung an routinemäßig eingebetteten Materialien [24, 142] diese Dogmen widerlegt. Die Mikrowellenvorbehandlung führt zur Demaskierung der durch die Formalinfixierung verdeckten Antigene. Hierdurch fanden einige Antikörper, die bisher ausschließlich am Gefriermaterial eingesetzt werden konnten, auch eine Anwendung am Paraffinmaterial. Darüber hinaus konnte mit dieser Methode eine Sensitivitätssteigerung problematischer Antikörper (z.B. Antikörper gegen Östrogenrezeptoren) erreicht werden [12, 134]. 1991 publizierten Shin et al. [144] die Methode der hydratisierten Autoklavierung als effektive Vorbehandlung bei der immunhistochemischen Darstellung des TAU-Antigens im Gehirn. Bankfalvi et al. [12] zeigten in einer systematischen Analyse einer Reihe von Antikörpern, daß eine modifizierte Autoklavierung, die sog. feuchte Autoklavierung, wobei statt destilliertem Wasser Citratpuffer (0,1 M; pH 6,0) angewendet wird, für die Immunhistochemie eine einfache und äußerst verlässliche Methode zur Antigendemaskierung darstellt [12]. Das Autoklavieren der Gewebe als Vorbehandlung der immunhistologischen Färbung ergab für die meisten der untersuchten Antikörper eine deutliche Sensitivitätssteigerung; ebenso konnte die Anwendbarkeit von einigen bisher nur auf Gefriermaterial einsetzbaren Antikörpern auf Paraffinmaterial gezeigt werden [12]. Vor allem was die tägliche Anwendung betrifft, besitzt das Autoklavieren einige entscheidende Vorteile gegenüber der Mikrowellenvorbehandlung. Je nach Größe des Autoklaven können bis zu mehrere hundert Schnittpräparate gleichzeitig vorbehandelt werden; ein Wiederauffüllen der Küvetten mit Pufferlösung - bei der Mikrowellenvorbehandlung nach jedem Zyklus notwendig - entfällt. Die feuchte Autoklavierung führt letztlich zu einer gleichmäßigen Vorbehandlung aller Schnittpräparate. Neben einer guten Erhaltung der Morphologie kommt auch das Abschwimmen der Schnitte von den Objektträgern nur sehr selten vor. Die Antikörper können bis in 5- bis 10fach höheren Verdünnungen als üblich angegeben verwendet werden. Einige der bisher nur

am Gefrierschnitt einsetzbaren Antikörper können nach Autoklavenvorbehandlung auch am Paraffinschnitt genutzt werden [12].

1.4 Zielsetzung meiner Dissertation

Ziel dieser Studie ist

1. die Darstellung der Anwendbarkeit der Autoklaven-Vorbehandlung in der normalen immunhistochemischen Routinediagnostik bzgl. der Östrogen-, Progesteron- und der Androgenrezeptordarstellung beim Mammakarzinom und
2. die Darstellung klinisch-pathologischer Korrelationen sowie die Darstellung des prognostischen Werts des immunhistochemisch ermittelten Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptorstatus bei Mammakarzinompatientinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurden invasive Mammakarzinome von 138 Patientinnen. Die routinemäßig Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Tumoren entstammten dem Archiv des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Zu den einzelnen Fällen lagen neben Angaben zum Gesamtüberleben und zum rezidivfreien Überleben klinische Parameter vor, wie das Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose, der Menopausalstatus, die Art des operativen Eingriffs und die Informationen, ob eine adjuvante Chemotherapie, eine adjuvante Strahlentherapie oder eine Antiöstrogentherapie durchgeführt wurde oder nicht. An pathologischen Parametern lagen die jeweiligen Tumortypen, der histologische Grad, das TNM-Stadium (T-, N-, und M-Wert einzeln) und das UICC-Gruppenstadium vor. Zudem war der jeweils biochemisch gemessene Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron bekannt.

2.1.2 Verwendete Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien stammten von folgenden Firmen:

- HCL, NaOH: Bernd Kraft GmbH
- Alkalische-Phosphatase-konjugiertes Streptavidin („Label“): Firma Biogenex
- Tris(-hydroxymethyl)amino-methan (TRIS): Firma Biomol
- Diethylether, N,N-Dimethylformamid, Kaisers Glycerin-Gelantine, Natriumazid, Natriumchlorid, tri-Natriumzitat-Dihydrat, Zitronensäuremonohydrat: Firma Merck
- Bovins Serum (inaktiviert), Humanserum (inaktiviert), Fast Red (4-Chloro-2-methylbenzenediazonium-Salz; Hemi(Zinkchlorid)-Salz), Levamisol (Levamisolhydrochlorid), Lysin (einprozentige wässrige Poly-L-Lysin-Lösung), Naphthol-

AS-MX-biphosphat, RPMI-1640, 2%ige Silanlösung (3-Aminopropyltriethoxysilan), TRIS-HCL: Firma Sigma

- Ethanol (vergällt): Auf's Blatt Alexander Kisker GmbH

Die Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen:

Antikörper	Verdünnung	Poly-/ monoklonal	Hersteller
Anti-Östrogen-Rezeptor	1 : 50	monoklonal	DIANOVA
Anti-Progesteron-Rezeptor	1 : 400	Polyklonal (rabbit)	DAKO
Anti-Androgen-Rezeptor	1 : 300	Monoklonal (mouse anti human)	BIOGENEX MONO

Tabelle 4: Primärantikörper

2.2 Methode

2.2.1 Immunhistochemische Färbungen

2.2.1.1 Vorbereitung der Färbungen

1. Beschichtung der Objektträger

Um ein Abschwimmen der Gewebeschnitte vom Objektträger zu verhindern, wurden die Objektträger mit Silan und Lysin beschichtet. Dazu wurden sie zunächst entfettet, gespült und getrocknet. Anschließend wurden sie in einer 2%igen Silanlösung (in Aqua dest) mehrere Stunden lang inkubiert. Nach erneutem Spülen und Trocknen wurde je ein Tropfen Lysin so lange auf den Objektträgern verrieben, bis sich kein flüssiges Lysin mehr auf der Oberfläche befand.

2. Vorbereitung der Antikörperlösungen

- Herstellung der RPMI-Lösung: 0,5 g Natriumazid wurden in einem Gemisch aus 50 ml RPMI-1640, 450 ml Aqua bidestillata und 50 ml Bovinserum (inaktiviert) gelöst. Mit NaOH bzw. HCl erfolgte anschließend die Einstellung eines pH von 7,4 bis 7,6.
- Verdünnung der Antikörper: Die primären Antikörper wurden mit RPMI-Lösung verdünnt. Die Verdünnung für den Anti-Östrogen-AK betrug 1:50, für den Anti-Progesteron-AK 1:400 und für den Anti-Androgen-AK 1:300. Der sekundäre Antikörper (RAM) wurde in RPMI-Lösung und Humanserum (ein Teil inaktiviertes Humanserum + 7 Teile RPMI-Lösung) 1:30 verdünnt, der APAAP-Komplex in RPMI-Lösung 1:50.
- Herstellung des Citratpuffers: Der Citratpuffer wurde aus zwei Stammlösungen hergestellt. Für Stammlösung A wurden 10,5 g Zitronensäuremonohydrat, für Stammlösung B 14,7 g Natriumcitrat-Dihydrat in Aqua dest. gelöst. Die Lösungen wurden jeweils auf 500 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden 15 ml Stammlösung A und 85 ml Stammlösung B gemischt. Anschließend wurde ein pH von 6,0 eingestellt. Die Lösung wurde auf 1000 ml aufgefüllt, und der pH wurde gegebenenfalls korrigiert.
- Herstellung des TRIS-Spülpuffers: Zunächst erfolgte die Herstellung einer Stammlösung, aus der durch 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. die Gebrauchslösung gewonnen wurde. Für die Stammlösung wurden 9,0 g TRIS, 68,5 g Tris-HCl und 87,8 g NaCl in einem Liter Aqua dest. gelöst, anschließend wurde ein pH von 7,4 bis 7,6 eingestellt.
- Herstellung des TRIS-Entwicklungspuffers: 17,4 g NaCl, 3,0 g TRIS-HCL und 9,8 g TRIS wurden auf 2000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurde ein pH von 8,2 eingestellt.
- Herstellung der Fast-Red-Lösung: Eine Lösung von 0,012 g Levamisol in 49 ml TRIS-Entwicklungspuffer, deren pH auf 8,2 eingestellt worden war, wurde mit einer Lösung von 0,01 g Naphthol-AS-MX-biphosphat in 1,0 ml N,N-Dimethylformamid und mit 0,05 g Fast Red gemischt. Die entstandene Lösung wurde durch zwei Filter filtriert.

2.2.1.2 Durchführung der Färbungen

Die Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptor-Immunhistochemie wurde nach der APAAP-Methode durchgeführt.

Die 2 µm dicken Gewebeschnitte wurden auf silanisierten und durch Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und für 2 mal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Nach der Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Objektträger in Plastikküvetten mit Citratpuffer gestellt. Die Küvetten wurden verschlossen und in Alufolie gehüllt. Das Autoklavieren erfolgte bei 120° C in einem Gössner-Laborautoklaven (GLA-40-2) je nach Antikörper 5 oder 10 Minuten. Nach dem Autoklavieren wurden die Schnittpräparate für ca. 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend kurz in Aqua dest. und im TRIS-Spülpuffer gespült. Nun erfolgte die Beschichtung mit dem Primäantikörper und eine 16-stündige Inkubation bei 4° C. Die Präparate wurden dann erneut in TRIS-Spülpuffer gespült und im Anschluß mit dem sekundären Antikörper Rabbit Anti-Mouse in RPMI+HuSe überschichtet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (bzw. beim polyklonalen Progesteron Primäantikörper zunächst für 30 Minuten der Antikörper Mouse Anti-Rabbit in einer Verdünnung von 1:125 in RPMI aufgetragen, bevor der Antikörper Rabbit Anti-Mouse aufpipettiert wurde). Nach nochmaligem Spülen in TRIS-Spülpuffer erfolgte die Beschichtung mit dem APAAP-Komplex; die Inkubationszeit betrug auch hier 30 Minuten. Wiederum wurde gespült und im nächsten Schritt die Enzymreaktion mit einer frisch angesetzten Fast-Red-Lösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten entwickelt. Nach Spülen in Leitungswasser, Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin und fünfminütigem Bläuen in Leitungswasser wurden die Schnitte in frisches Aqua dest. überführt und mit Kayser's Glycerin eingedeckt.

Bei jedem immunhistochemischem Färbeverfahren wurden entweder positive oder negative Kontrollen durchgeführt. Bei Negativ-Kontrollen wurden die Primäantikörper weggelassen, bei Positiv-Kontrollen wurden Schnitte mit bereits nachgewiesenem positivem Rezeptorstatus dem immunhistochemischen Färbeverfahren mit unterzogen.

2.2.2 Auswertung

2.2.2.1 Auswertung der Präparate

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte semiquantitativ, wobei sowohl die Färbungsintensität als auch die Anzahl positiver Zellen im Gewebe in die Begutachtung mit eingingen. Die Zuordnung in die Kategorien „stark“, „mittelstark“, „schwach“, „vereinzelt“ und „negativ“ erfolgte nach den in Tabelle 5 angegebenen Kriterien.

Kategorie	
stark	starke Anfärbung von > 50% aller Zellen
mittelstark	fokale (< 50 % aller Zellen) dunkle Anfärbung oder mäßige Anfärbung in > 50 % aller Zellen
schwach	fokale (< 50 % aller Zellen) moderate Anfärbung oder blasse Anfärbung in einem beliebigen Anteil von Zellen
vereinzelt	dunkle Anfärbung weit verbreiteter Zellen
negativ	keine der oben genannten Kriterien

Tabelle 5: Beschreibung der Bewertungskategorien

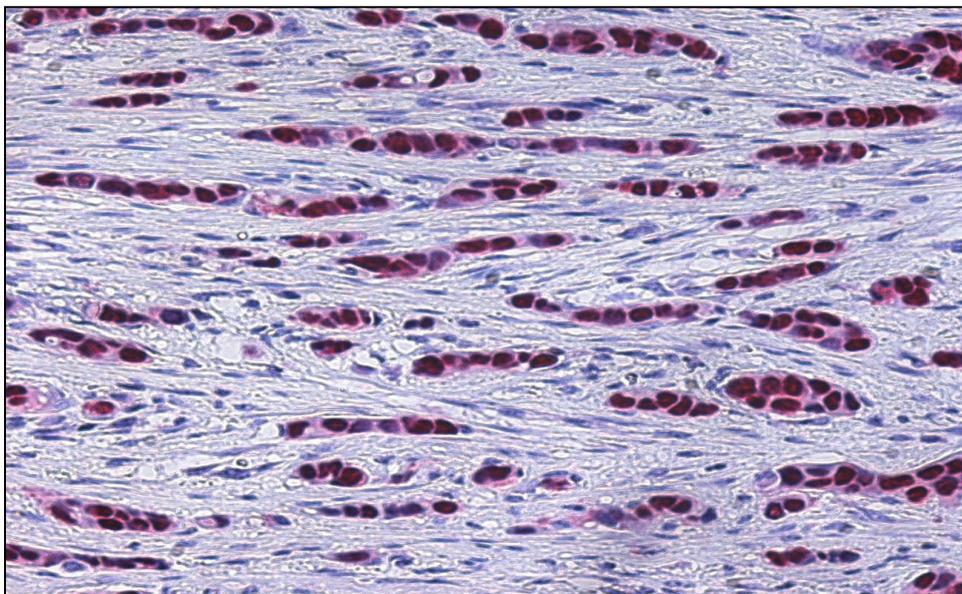


Abb. 1: Östrogenrezeptor-Immunhistochemie am invasiv lobulären Mammakarzinom. Die ER-Immunoreaktivität zeigt sich als Rotfärbung der Zellkerne. Die Kerne ohne ER-Immunoreaktivität stellen sich aufgrund der Gegenfärbung blau dar.

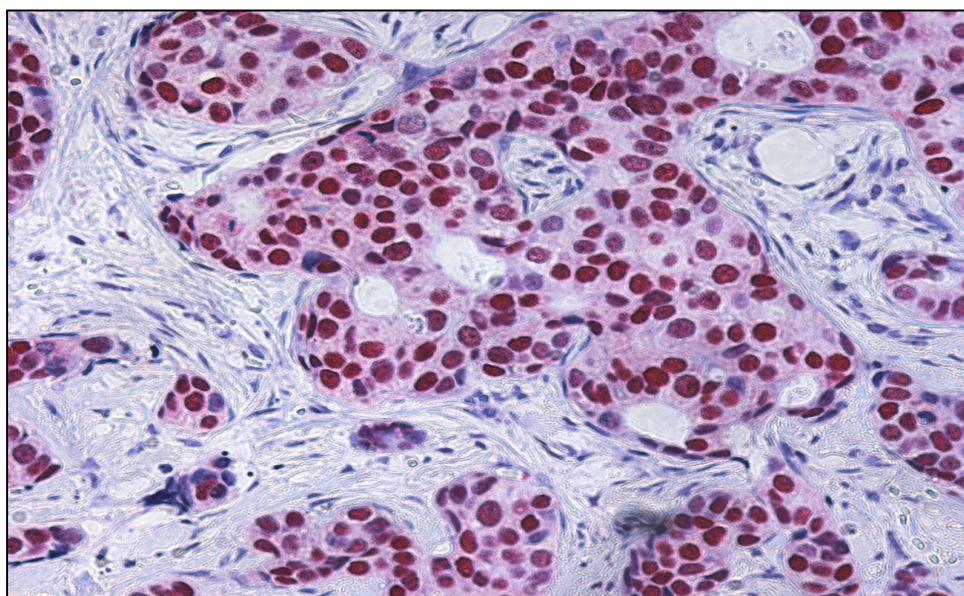


Abb. 2: Östrogenrezeptor-Immunhistochemie am invasiv duktalem Mammakarzinom. Die ER-Immunoreaktivität zeigt sich als Rotfärbung der Zellkerne. Die Kerne ohne ER-Immunoreaktivität stellen sich aufgrund der Gegenfärbung blau dar.

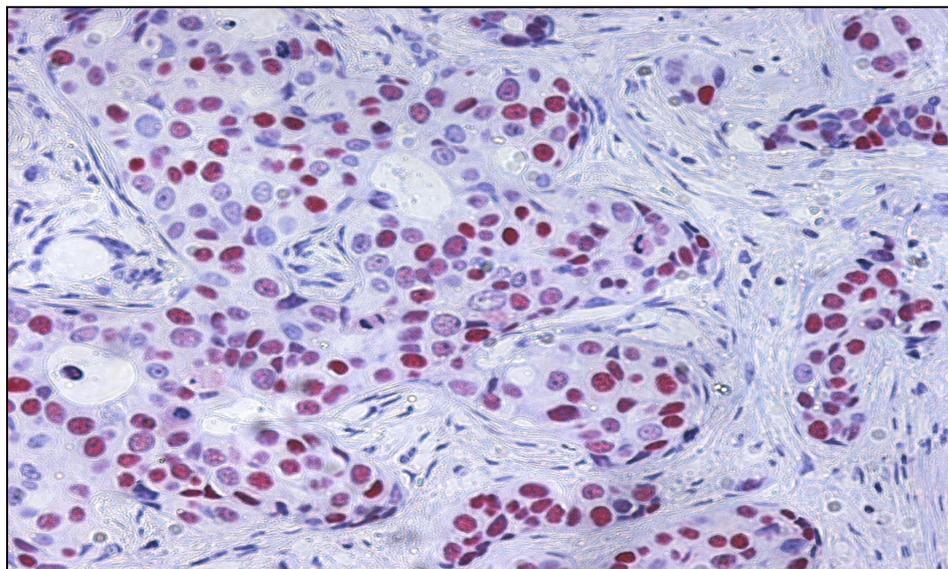


Abb. 3: Progesteronrezeptor-Immunhistochemie. Die PR-Immunoreaktivität zeigt sich als Rotfärbung der Zellkerne. Die Kerne ohne PR-Immunoreaktivität stellen sich aufgrund der Gegenfärbung blau dar.

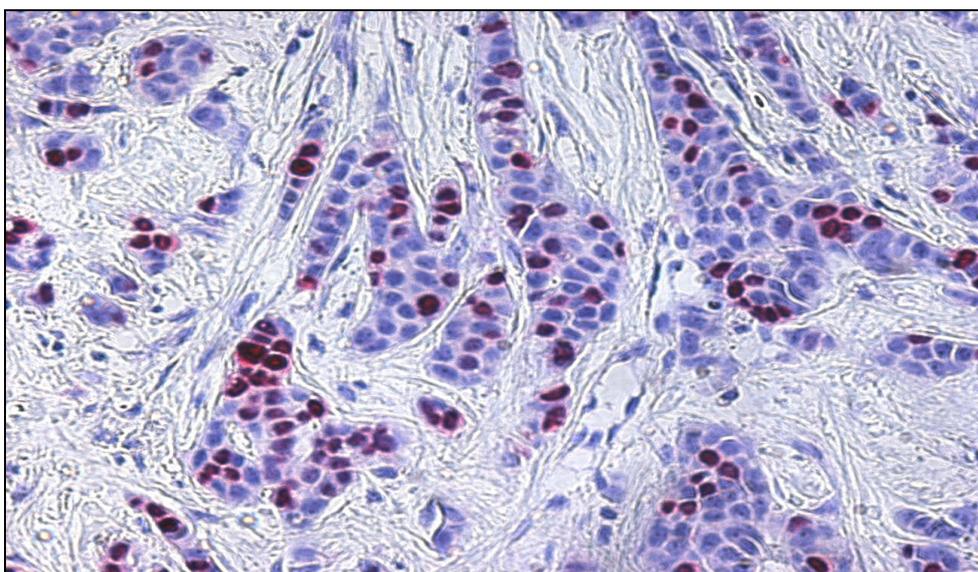


Abb. 4: Androgenrezeptor-Immunhistochemie. Die AR-Immunoreaktivität zeigt sich als Rotfärbung der Zellkerne. Die Kerne ohne AR-Immunoreaktivität stellen sich aufgrund der Gegenfärbung blau dar.

2.2.2.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem SPSS (Statistical Package for Social Science) Statistikprogramm. Für den Vergleich der einzelnen Hormonrezeptor-Parameter untereinander und der einzelnen Hormonrezeptor-Parameter mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern wurde eine bivariate Korrelationsanalyse mit Bestimmung der Spearman Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Um signifikante Korrelationen zwischen einzelnen Variablen zu überprüfen, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt, wobei ein p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant angesehen wurde. Zudem wurde das kumulative Patientenüberleben nach Kaplan-Meier bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientinnenkollektiv

Untersucht wurde das Mammakarzinomgewebe von 138 Patientinnen im Alter zwischen 32 und 78 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 53,1 Jahre (Abb. 5).

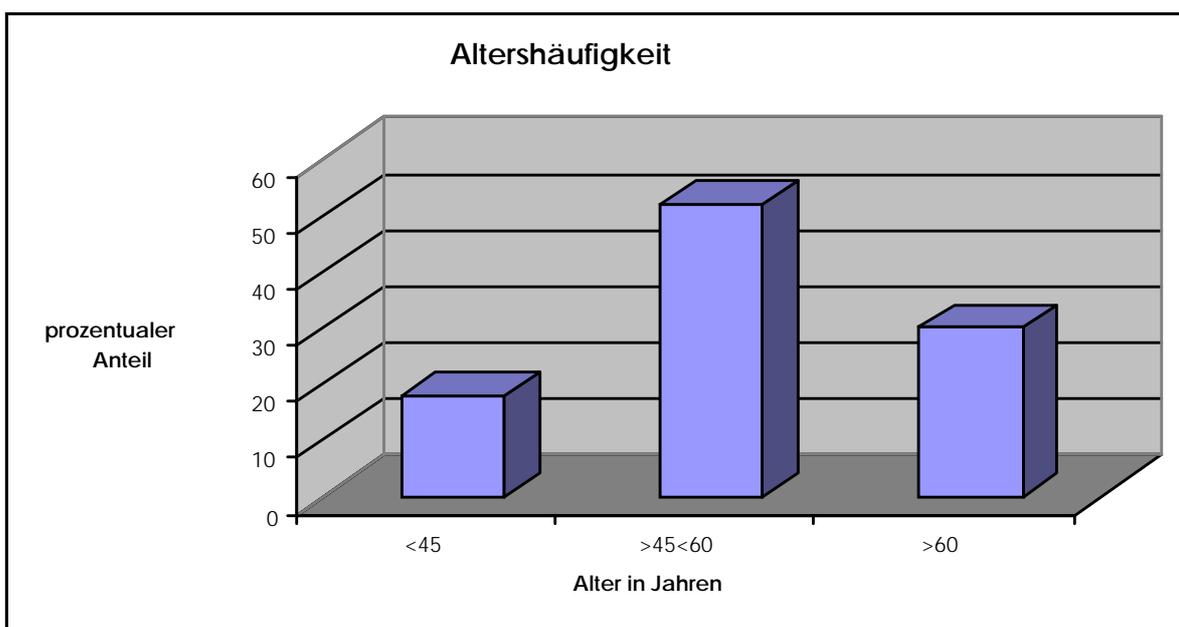


Abb. 5: Altersverteilung

Von den 138 Patientinnen befanden sich 39 im prämenopausalen Stadium, 86 im postmenopausalen und 4 Patientinnen im peripausalen Stadium (Abb. 6).

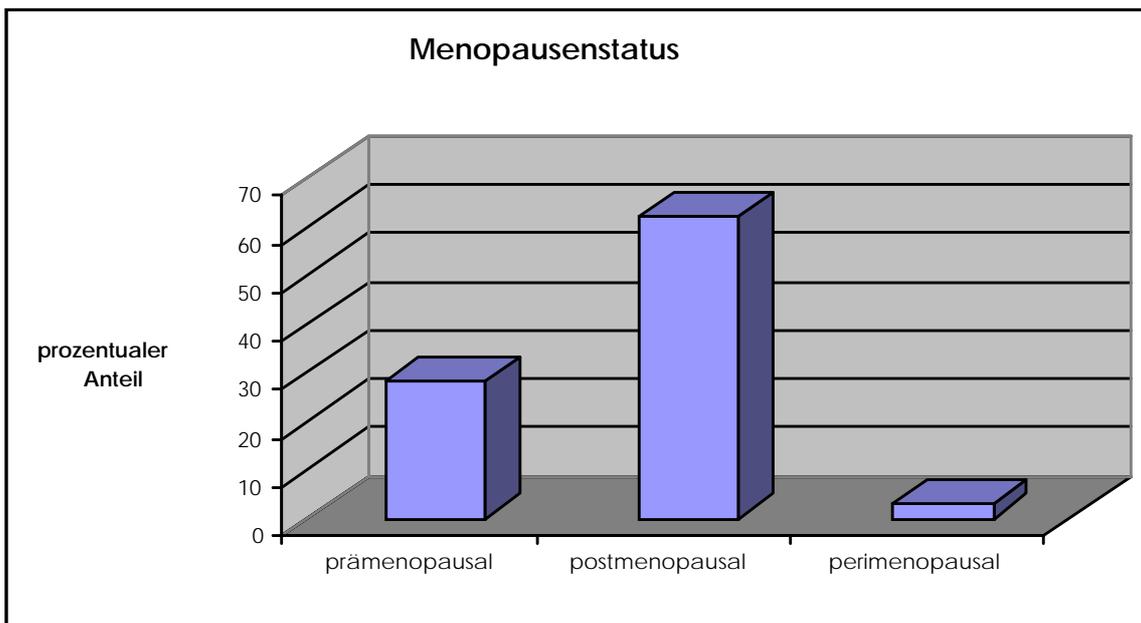


Abb. 6: Menopausenstatus

20 Patientinnen hatten ein invasiv lobuläres Karzinom, 90 ein invasiv duktales und 10 Frauen ein Mischkarzinom aus beiden Komponenten (Abb. 7).

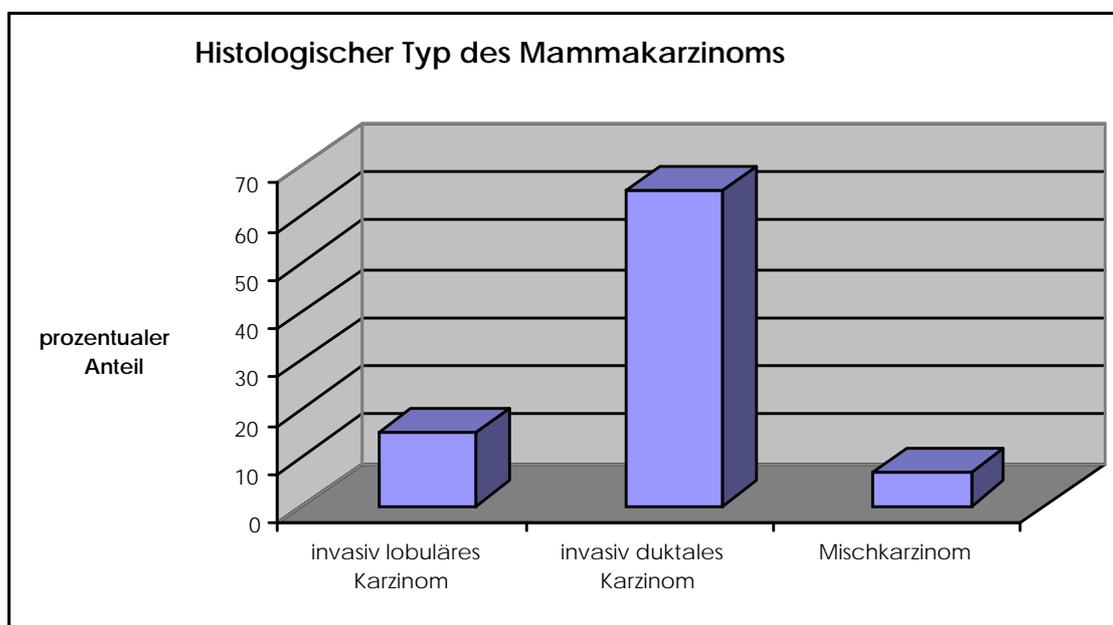


Abb. 7: Häufigkeit der verschiedenen histologischen Typen des Mammakarzinoms

Bei der Klassifikation nach dem pathologischen TNM-System ergaben sich folgende Einteilungen:

PT		pN		pM	
pT1	30	pN0	60	pM0	28
pT2	66	pN1	14	pM1	5
pT3	18	pN2	55		
pT4	19				
PTx	5	pNx	9	pMx	105

Tabelle 6: Verteilung der TNM–Stadien

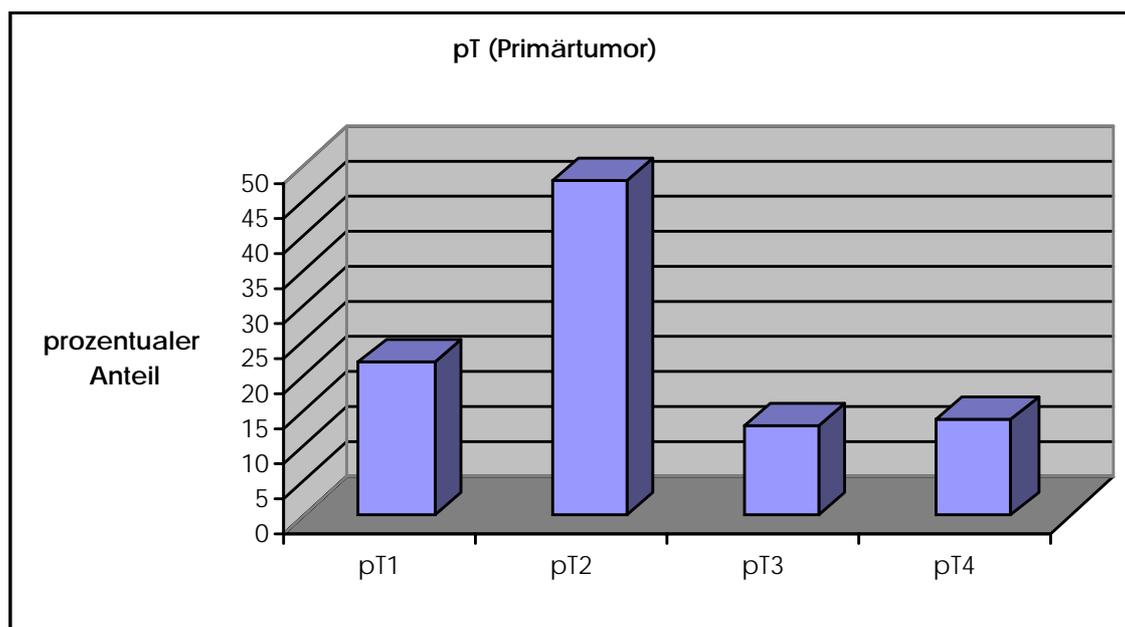


Abb. 8: Verteilung der pT-Stadien

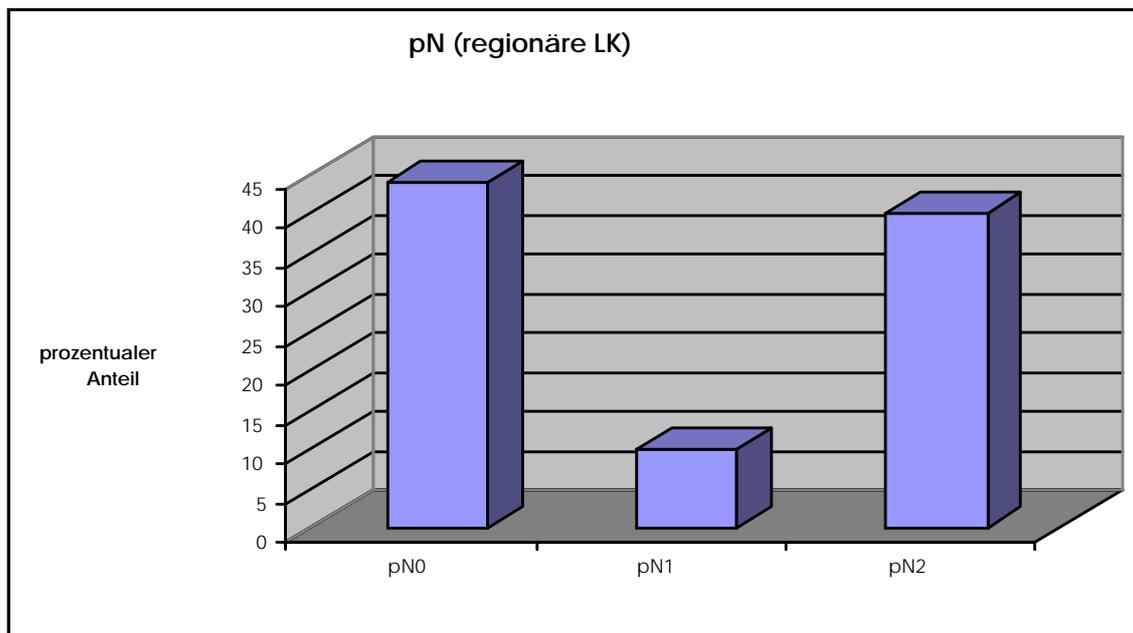


Abb. 9: Verteilung der pN-Stadien

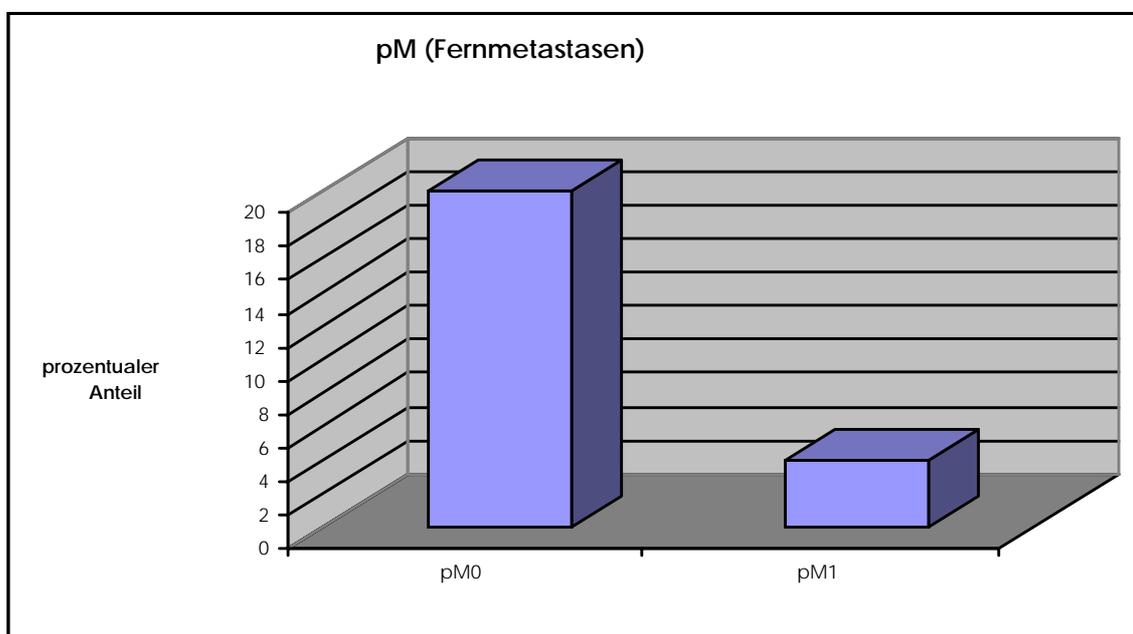


Abb. 10: Verteilung der pM-Stadien

Nach dem gängigen histopathologischen Grading (nach Elston und Ellis) befanden sich 8 der untersuchten Patientinnen in G1, 64 in G2, 48 in G3 (Abb. 11).

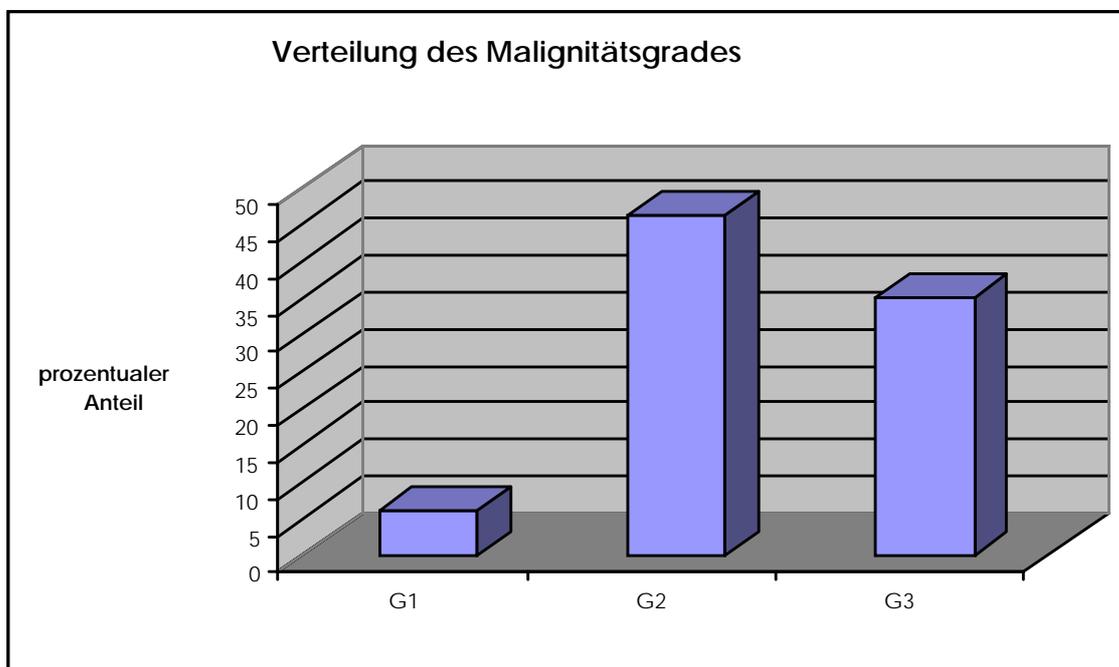


Abb. 11: Verteilung des Malignitätsgrades

Von den klinischen Stadien des Patientinnenkollektivs ergaben sich folgende Verteilungen:

Stadium:

I	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	unbekannt
22	36	16	38	16	5	5

Tabelle 7: Verteilung der verschiedenen Stadien

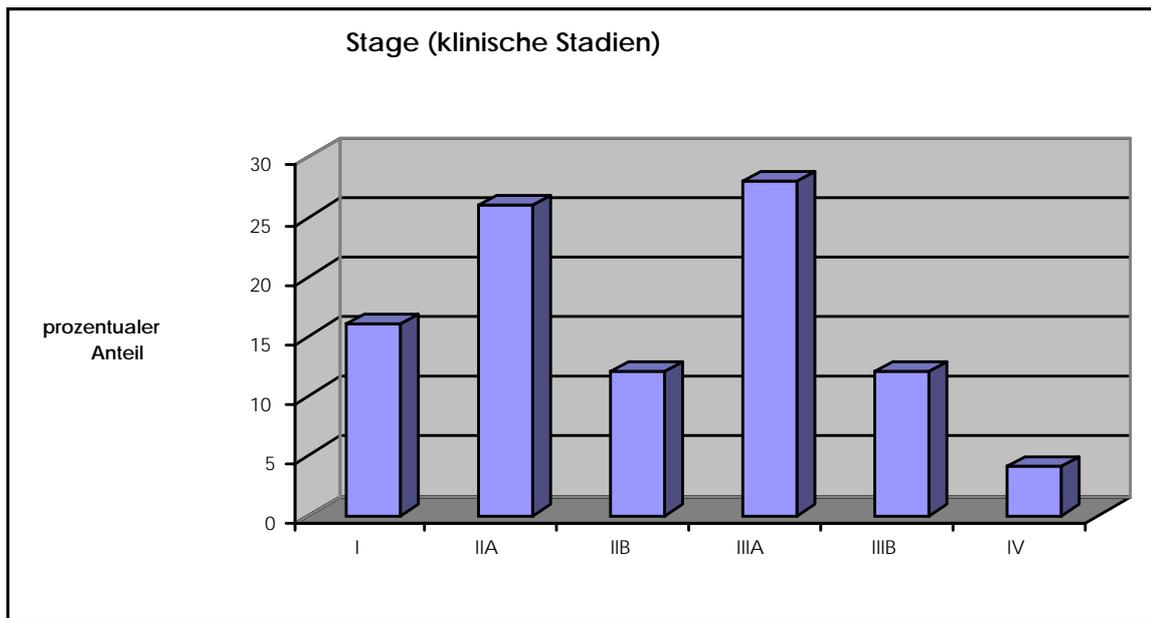
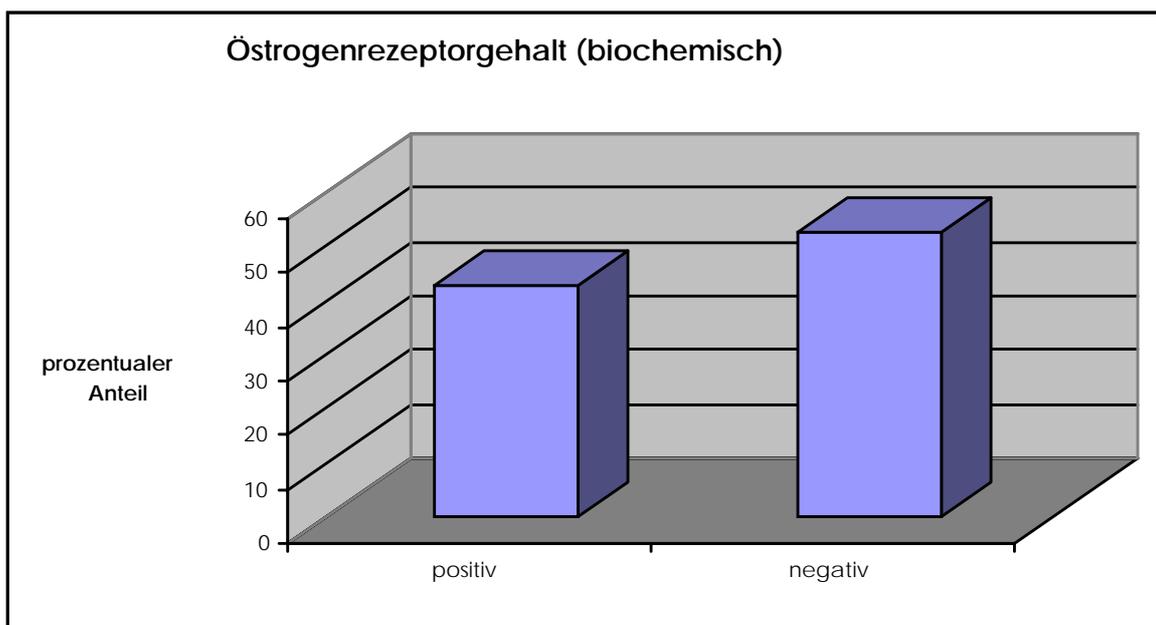


Abb. 12: Verteilung der Stadien

Von den biochemisch untersuchten Mammakarzinomen waren insgesamt 59 Östrogenrezeptor positiv, 73 Östrogenrezeptor negativ und 7 mit unbekanntem Steroid-Rezeptorstatus. Der Progesteronrezeptor war in 46 Fällen positiv, in 33 negativ und in 60 der Fälle unbekannt (Abb. 13/14).



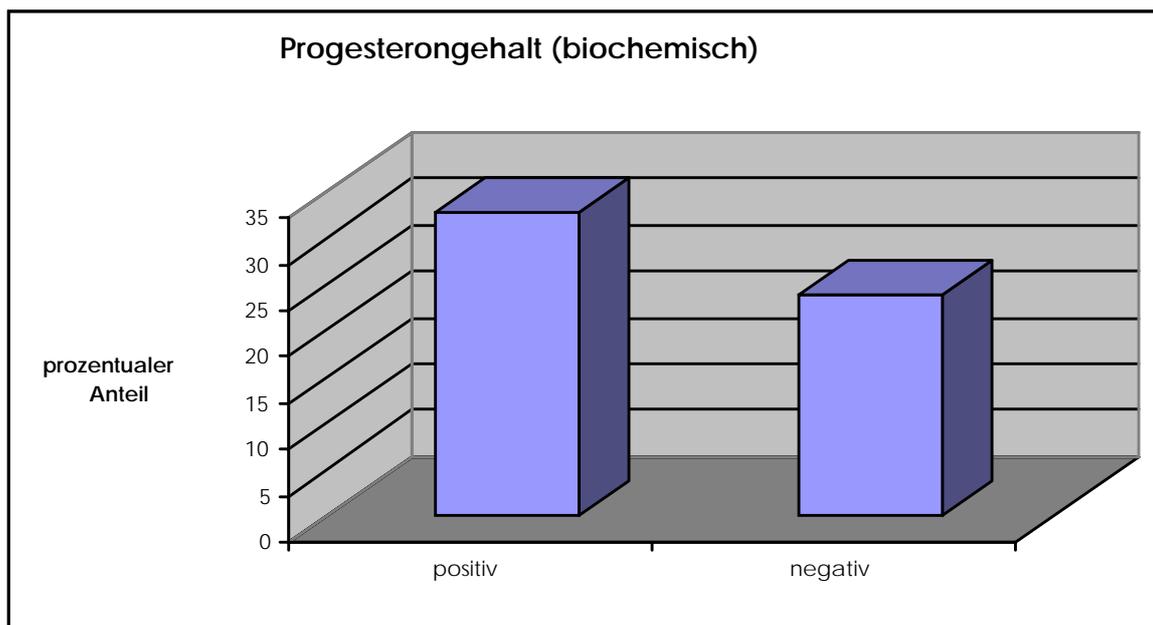


Abb. 13 und Abb. 14: Verteilung des biochemisch gemessenen Östrogen- und Progesteronrezeptorgehaltes

Nach unserer immunhistochemischen Färbemethode wurde die Rezeptordichte der Hormonrezeptoren in „negativ, vereinzelt, schwach, mittel und stark“ eingeteilt. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

23% der Patientinnen waren Östrogenrezeptor negativ, 48 % Östrogenrezeptor positiv. 36% der Patientinnen waren Progesteronrezeptor negativ und 35% waren positiv. Androgenrezeptor negativ waren 39% der Patientinnen, Androgenrezeptor positiv 35 % der Patientinnen (s. Tab. 8).

	Östrogen	Progesteron	Androgen
Negativ	23	33	39
Vereinzelt	0	3	0
Schwach	22	13	31
Mittel	17	12	3
Stark	9	10	1

Tabelle 8: Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Expression von den immunhistochemisch untersuchten Hormonrezeptoren Östrogen, Progesteron und Androgen

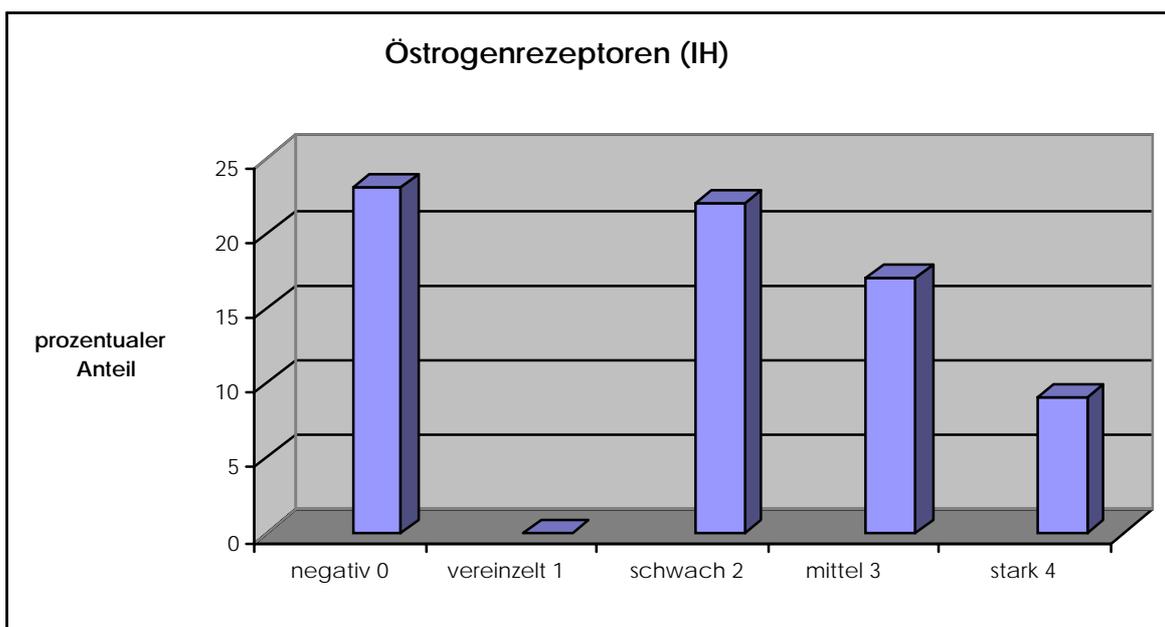


Abb. 15: Häufigkeitsverteilung der Expression von Östrogenrezeptoren

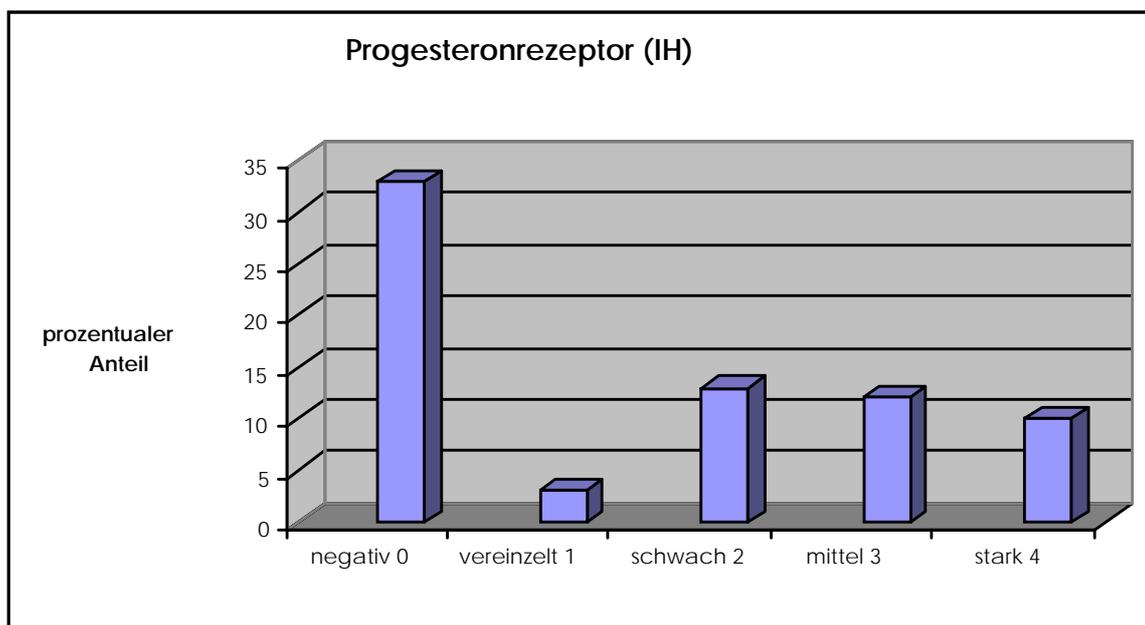


Abb. 16: Häufigkeitsverteilung der Expression von Progesteronrezeptoren

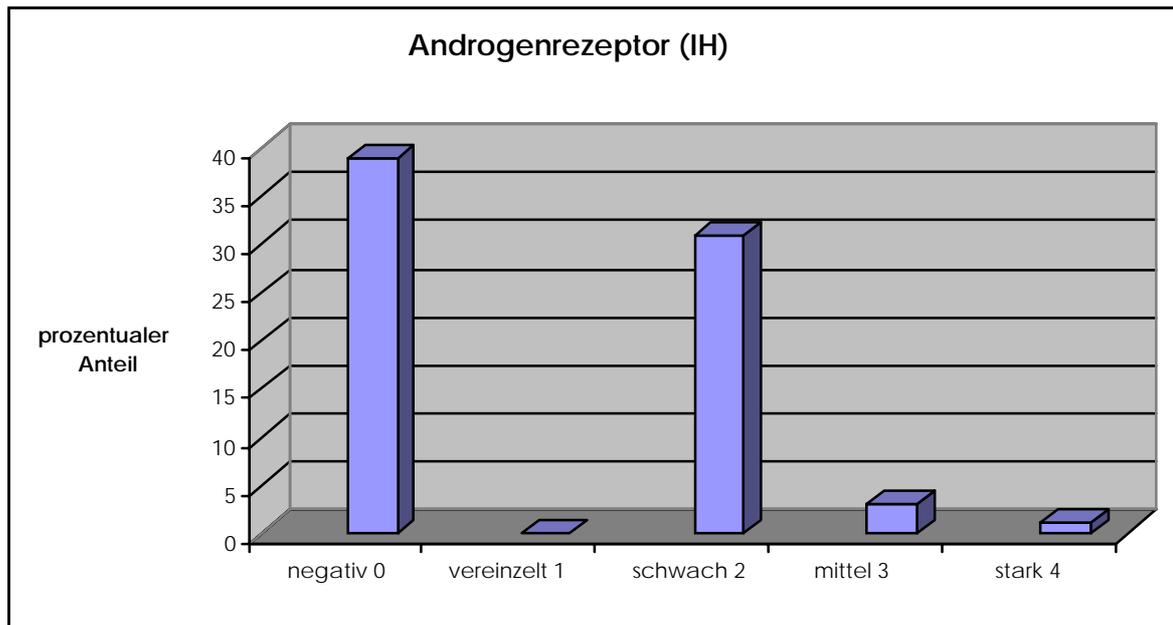


Abb. 17: Häufigkeitsverteilung der Expression von Androgenrezeptoren

Parameter	No	%	Parameter	No	%
			ER biochem.		
Alter			positiv	59	43
<45	25	18	negativ	73	53
>45<60	72	52	PR biochem.		
>60	42	30	positiv	46	33
Geschlecht			negativ	33	24
weiblich	138	100	Östrogenrezeptordichte (IH)		
Menopausaler Status			negativ	32	23
prämenop.	39	28	vereinzelt	0	0
postmenop.	86	62	schwach	30	22
perimenopausal	4	3	mittel	24	17
			stark	13	9

Parameter	No	%	Parameter	No	%
Art des Mammakarzinoms			Progesteronrezeptordichte (IH)		
inv. duktal	90	65	negativ	45	33
Beides	10	7	vereinzelt	4	3
pT (Primärtumor)			schwach	18	13
			mittel	17	12
			stark	14	10
			Androgenrezeptordichte (IH)		
pT1	30	22	negativ	54	39
pT2	66	48	vereinzelt	0	0
pT3	18	13	schwach	43	31
pT4	19	14	mittel	4	3
pN (regionäre LK)			stark	1	0,7
pN0	60	44	postoperative Bestrahlung		
pN1	14	10			
pN2	55	40			
pM (Fernmetastasen)					
pM0	28	20	nein	36	26
pM1	5	4	ja	102	74
Grading			Adjuvante Chemotherapie		
G1	8	6	nein	75	54
G2	64	46	ja	64	46
G3	48	35	Hormontherapie		
Klin. Stadien			ja	15	11
I	22	16			
IIA	36	26			
IIIB	16	12			
IIIA	38	28			
IIIB	16	12			
IV	5	4			

IH=immunhistochemisch

Tabelle 9: Übersicht klinisch-pathologischer Daten

3.2 Vergleich der Expression von den immunhistochemisch untersuchten Hormonrezeptoren mit klinisch-pathologischen Parametern

3.2.1 Korrelationsanalyse

Als erstes wurden die einzelnen Hormonrezeptor-Parameter untereinander und mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern auf ihre Korrelation überprüft. Wie man aus Tab. 10 entnehmen kann, korrelierten mit dem Östrogenrezeptor der Progesteron- und Androgenrezeptor, das pathologische Grading, die Gesamt-Überlebenszeit und die rezidivfreie Überlebenszeit. Mit dem Progesteron- und Androgenrezeptor hingegen korrelierten jeweils nur die anderen hier aufgeführten Rezeptoren.

Parameter	Östrogen	Progesteron	Androgen
Progesteron	0,495 p = 0,000 ***	-	0,885 p = 0,000 ***
Östrogen	-	0,495 p = 0,000 ***	0,250 p = 0,013*
Androgen	0,250 p = 0,013 *	0,885 p = 0,000 ***	-
T	-0,158 p = 0,125	-0,023 p = 0,789	-0,046 p = 0,595
N	-0,087 p = 0,403	0,006 p = 0,945	0,018 p = 0,841
M	0,140 p = 0,514	0,306 p = 0,083	0,305 p = 0,084
Path.Grading	-0,449 p = 0,000 ***	-0,035 p = 0,706	0,920 p = 0,316
Ges. Überleben	0,317 p = 0,001**	0,120 p = 0,159	0,058 p = 0,498
Rezidivfreies Überleben	0,288 p = 0,004 **	0,076 p=0,375	0,045 p=0,601

Tabelle 10: Korrelation der Hormonrezeptor-Parameter mit verschiedenen klinisch- pathologischen Parametern.

- *** hoch signifikant
- ** stark signifikant
- * signifikant

3.2.2 Vergleichsanalyse (Chi-Quadrat-Test)

Anschließend wurden die Zusammenhänge zwischen den Hormonrezeptoren untereinander und den Hormonrezeptoren mit klinisch-pathologischen Parametern mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests untersucht.

Wie man Tab. 11 entnehmen kann, bestehen deutliche Zusammenhänge zwischen dem Östrogen- und dem Progesteron- und Androgenrezeptor mit den biochemisch gemessenen Östrogen- und Progesterongesamtgehalt und dem pathologischem Grading.

<u>Östrogenrezeptor (IH)</u>			
Parameter	X	Freiheitsgrad	P
Progesteronrezeptor (IH)	66,4	15	0,000
Androgenrezeptor (IH)	28,2	12	0,005
Östrogen (biochem.)	44,9	6	0,000
Progesteron (biochem.)	13,5	6	0,036
T	10,7	9	0,299
N	6,8	6	0,339
M	1,3	3	0,727
Stage	16,5	18	0,560
pathol. Grading	31,6	6	0,000
Menopausenstatus	12,9	9	0,168

Tabelle 11: Zusammenfassende Darstellung der Chi-Quadrat-Teste von Östrogenrezeptordichte mit anderen Hormonrezeptoren und klinisch-pathologischen Parametern
 IH = immunhistochemisch
 biochem. = biochemisch

Wie aus Tab. 12 ersichtlich wird, besteht lediglich ein Zusammenhang zwischen der Progesteron- und der Östrogen- und Androgenrezeptordichte, sowie dem biochemisch gemessenem Östrogen- und Progesterongesamtgehalt und dem pathologischem Grading.

<u>Progesteronrezeptor (IH)</u>			
Parameter	X	Freiheitsgrad	P
Östrogenrezeptor (IH)	66,4	15	0,000
Androgenrezeptor (IH)	150,7	20	0,000
Östrogen (biochem.)	25,5	10	0,004
Progesteron (biochem.)	19,2	10	0,037
T	16,6	15	0,343
N	11,7	15	0,699
M	8,1	5	0,150
Stage	26,7	30	0,637
pathol. Grading	27,2	10	0,002
Menopausenstatus	14,6	15	0,481

Tabelle 12: Zusammenfassende Darstellung der Chi-Quadrat-Teste von Progesteronrezeptordichten mit anderen Hormonrezeptordichten und klinisch-pathologischen Parametern.

IH = immunhistochemisch

biochem. = biochemisch

In Tab. 13 lassen sich lediglich Zusammenhänge zwischen der Rezeptordichte von Androgen und Progesteron und Östrogen und dem Stadium (Stage) erkennen.

<u>Androgenrezeptor (IH)</u>			
Parameter	X	Freiheitsgrad	P
Progesteronrezeptor (IH)	150,7	20	0,000
Östrogenrezeptor (IH)	28,2	12	0,005
Östrogen (biochem.)	5,4	8	0,716
Progesteron (biochem.)	10,7	8	0,221
T	10,7	9	0,294
N	4,6	9	0,871
M	4,9	2	0,85
Stage	47,2	24	0,003
pathol. Grading	8,3	8	0,402
Menopausenstatus	13,7	12	0,320

Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung der Chi-Quadrat-Teste von Androgenrezeptordichten mit anderen Hormonrezeptordichten und klinisch-pathologischen Parametern
 IH = immunhistochemisch
 biochem. = biochemisch

3.3 Kaplan-Meier-Überlebensanalyse

Anhand der Kaplan-Meier-Analyse untersuchten wir zum einen die prognostische Relevanz der Hormonrezeptoren und zum anderen die Frage, inwieweit sich die Hormonrezeptoren mit ihren unterschiedlichen Anfärbeintensitäten prognostisch unterscheiden. Wir untersuchten dabei die Gesamtüberlebenszeit und die rezidivfreie Überlebenszeit.

3.3.1 Gesamtüberlebenszeit

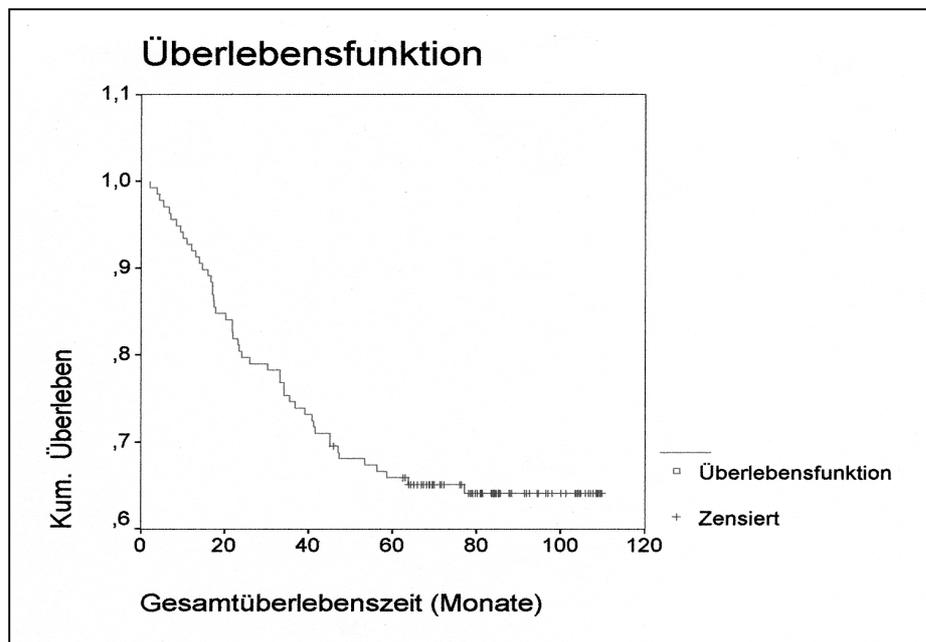


Abb. 18: Gesamtüberlebenszeit der von uns untersuchten Patientinnen

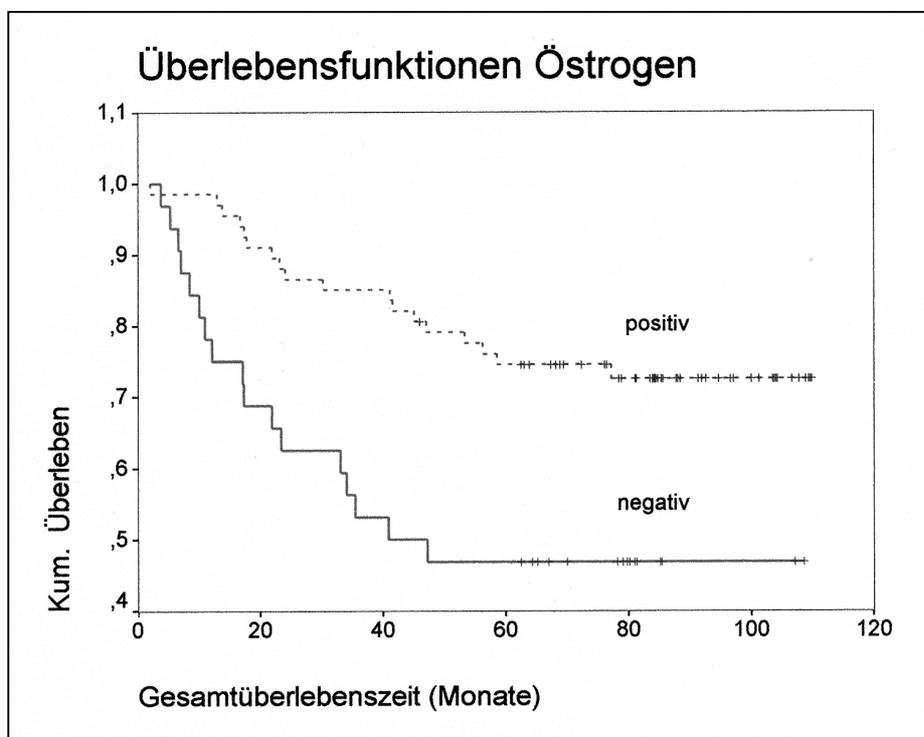


Abb. 19: Kaplan-Meier-Analyse „Prognostischer Wert der Östrogenrezeptoren“ anhand der Gesamtüberlebenszeit

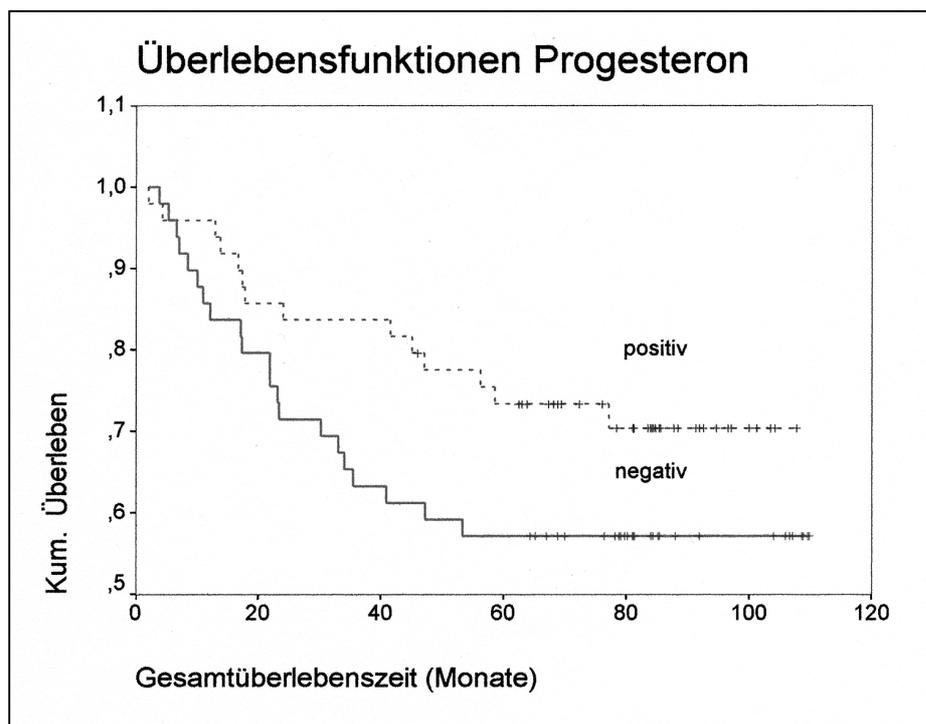


Abb. 20: Kaplan-Meier-Analyse „Prognostischer Wert der Progesteronrezeptoren“ anhand der Gesamtüberlebenszeit

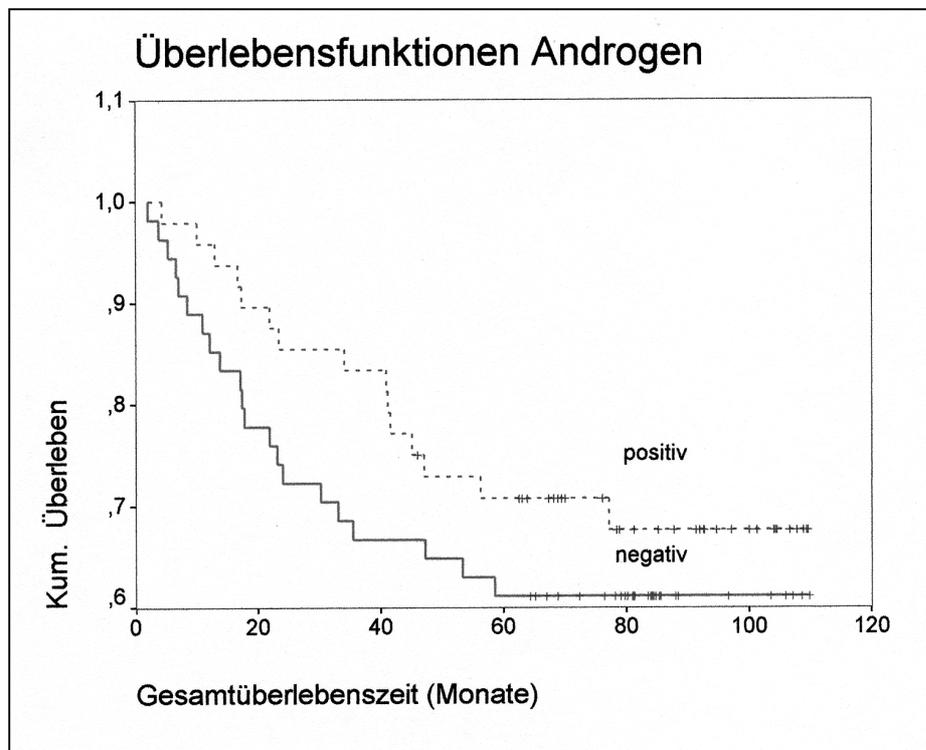


Abb. 21: Kaplan-Meier-Analyse „Prognostischer Wert der Androgenrezeptoren“ anhand der Gesamtüberlebenszeit

3.3.2 Rezidivfreie Überlebenszeit

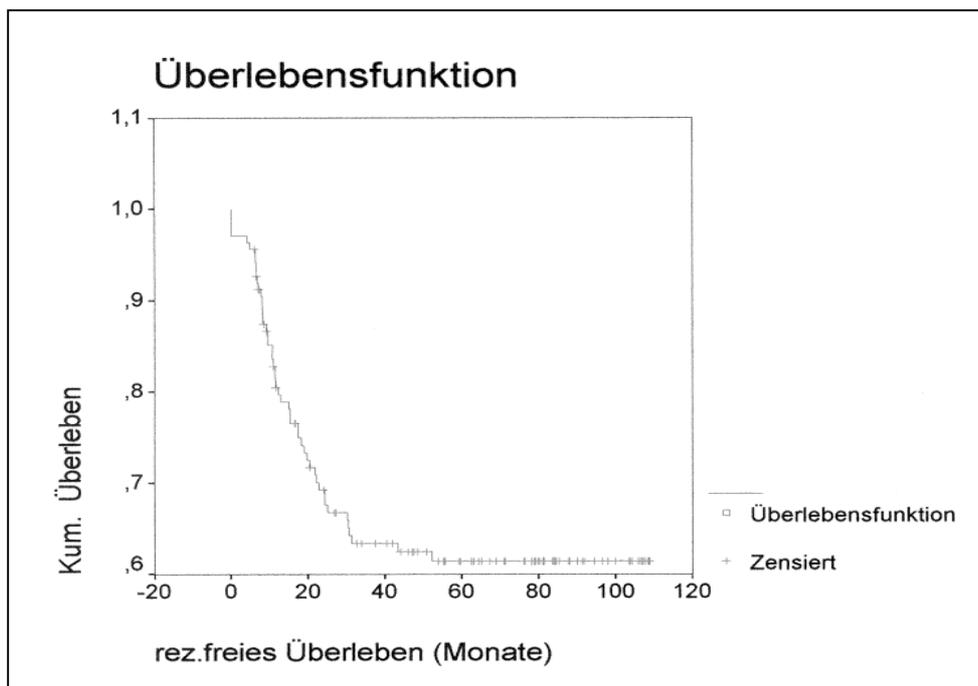


Abb. 22: Rezidivfreie Überlebenszeit der von uns untersuchten Patientinnen

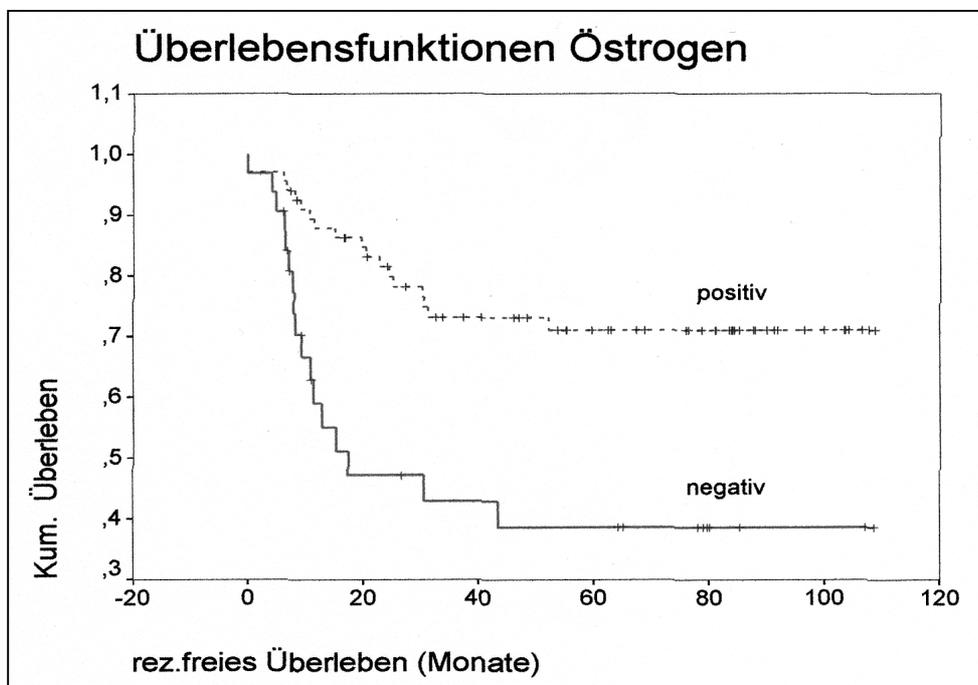


Abb. 23: Kaplan-Meier-Analyse „Prognostischer Wert der Östrogenrezeptoren“ anhand der rezidivfreien Überlebenszeit

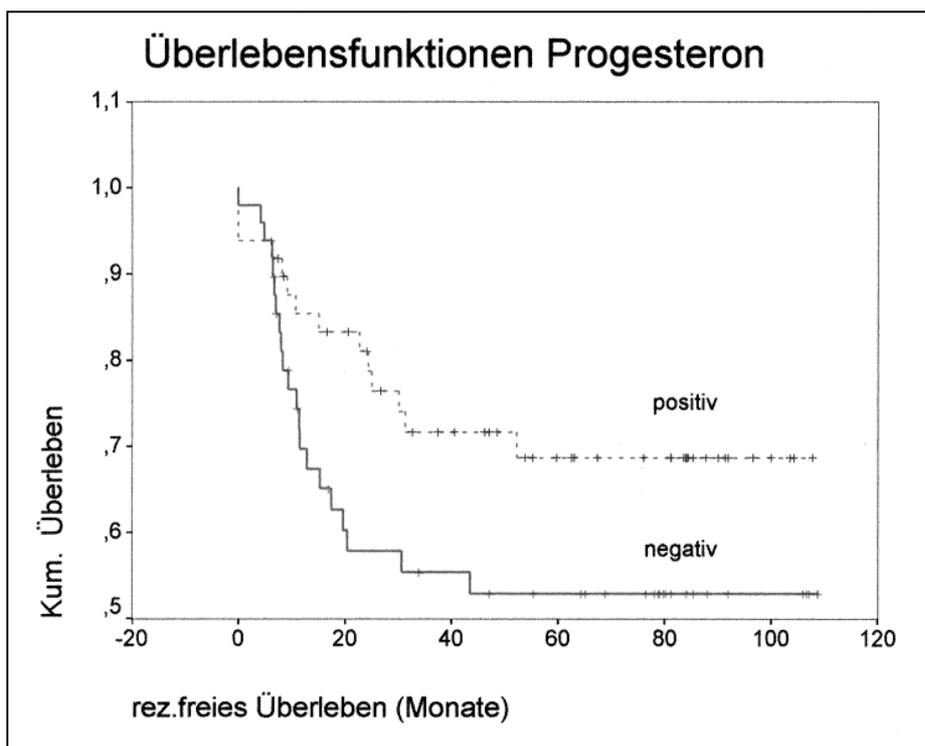


Abb. 24: Kaplan-Meier-Analyse „Prognostischer Wert der Progesteronrezeptoren“ anhand der rezidivfreien Überlebenszeit

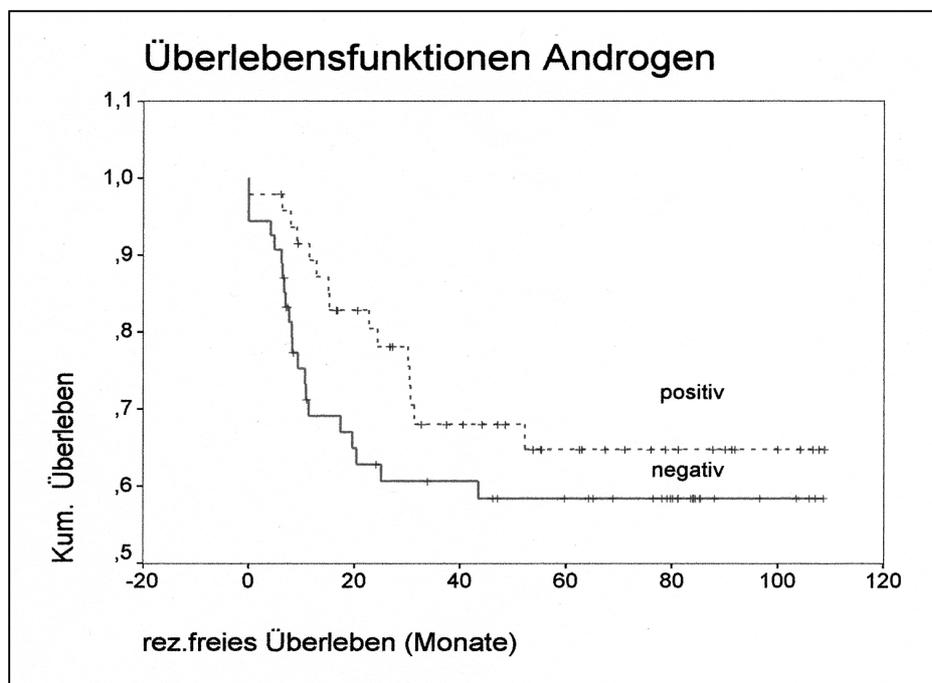


Abb. 25: Kaplan-Meier-Analyse „Prognostischer Wert der Androgenrezeptoren“ anhand der rezidivfreien Überlebenszeit

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

Die Bestimmung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Mammakarzinomen ist ein wichtiger Faktor zum einen für die Entscheidung der weiteren Behandlung und zum anderen für die Prognose der Patienten. Biochemische Methoden, wie die dextran-coated charcoal assay (DCCA), sind seit mehr als zehn Jahren technisch und klinisch anerkannte Verfahren zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus. Und in der Tat gründet sich das meiste unseres Wissens über Hormonrezeptoren im Mammakarzinom auf Studien, die diese Methoden angewendet haben. Sie wurden daher zu Recht zu den „golden standards“ bei der Bestimmung der Östrogen- und Progesteronrezeptorgehälter ernannt [5]. Durch die durch King und Greene 1984 [77] und später durch Greene und Press 1987 [47] möglich gewordene Herstellung monoklonaler Antikörper des Östrogen- bzw. des Progesteronrezeptors konnte eine immunenzymatische Methode (EIA) entwickelt werden, die auf einer direkten Aufdeckung der Steroidrezeptormoleküle basiert. Diese Immunenzymatische Methode verlangte allerdings, genauso wie die biochemischen Methoden, die Homogenisation der Gewebe. Mit dem Verlust der Zellintegrität war es dann ebenfalls unmöglich, den Grad der Heterogenität der Rezeptorverteilung innerhalb des Tumors festzusetzen. Schließlich wurde die immunhistochemische Methode (ICA) entwickelt, die eine direkte Aufdeckung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Gewebeschnitten von Karzinomgewebe unter Benutzung derselben monoklonalen Antikörper ermöglichte (ER-ICA und PR-ICA) [67, 78, 112, 119, 120]. Autoren zahlreicher Studien wiesen gute Korrelationen zwischen der EIA [86, 71, 106, 166] oder ICA [8, 17, 50, 78, 116, 119, 133, 153] und der biochemischen Methode (DCC) in Mammakarziomen nach.

Mittlerweile hat sich die Immunhistochemie als äußerst vielseitige und verlässliche Methode in der diagnostischen Pathologie etabliert. Der Einführung der Mikrowellenvorbehandlung war schließlich ein Teil des Erfolges zu verdanken, daß manche Antikörper nun auch an Formalin fixiertem und Paraffin eingebettetem Gewebe anzuwenden waren [142]. Bei problematischen Antikörpern (z.B. Antikörper gegen Östrogenrezeptoren)

konnte damit eine Sensitivitätssteigerung erreicht werden [12, 134]. Parallel dazu wurde von Bankfalvi und Mitarbeitern am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie in Münster die Methode der hydratisierten Autoklavierung von Shin et al. [144] modifiziert [11]. Die neue Methode, die sogenannte feuchte Autoklavierung, bei der statt destillierten Wasser Citratpuffer angewendet wird, konnte bisher in der Antigendemaskierung mit vielversprechendem Erfolg eingesetzt werden. Gegenüber anderen Methoden, wie z.B. der auf den gleichen Mechanismen beruhenden Mikrowellenvorbehandlung, weist diese Methode eine Reihe von entscheidenden Vorteilen auf, vor allem was die tägliche Anwendung betrifft. Je nach Größe des Autoklaven können bis zu mehrere hundert Schnittpräparate gleichzeitig vorbehandelt werden. Ein Wiederauffüllen der Küvetten mit Pufferlösung – was bei der Mikrowellenvorbehandlung nach jedem Zyklus notwendig ist – entfällt. Die feuchte Autoklavierung führt letztlich zu einer gleichmäßigen Vorbehandlung aller Schnittpräparate. Neben einer guten Erhaltung der Morphologie kommt auch das Abschwimmen der Schnitte von den Objektträgern nur sehr selten vor. Insgesamt ist der Vorgang einfach zu handhaben und wenig zeitaufwendig, im Gegensatz zur Mikrowellenvorbehandlung, die die Notwendigkeit der Beobachtung beinhaltet, um Schäden oder Austrocknung zu verhindern. Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß manche Antikörper in 5-10fach höherer Verdünnung als üblich angegeben verwendet werden können. Zudem konnten einige der bisher nur am Gefriermaterial erfolgreich anwendbaren Antikörper nach feuchter Autoklavierung auch am Paraffinschnitt eingesetzt werden [12].

Die von uns verwendete Methode des feuchten Autoklavierens zur Antigendemaskierung muß somit als zuverlässige, sicher reproduzierbare, einfach zu handhabende und auch für den Routinebetrieb geeignete Form der Gewebepreparation angesehen werden, die eine standardisierte Anwendung immunhistochemischer Färbungen am paraffineingebetteten Material erlaubt. Mittlerweile ist die feuchte Autoklavierung eine Standard Vorbehandlungsmethode in der Routine-Immunhistochemie am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie geworden.

4.2 Klinisch-pathologische Aspekte

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Anwendbarkeit des feuchten Autoklavierens in der normalen immunhistochemischen Routinediagnostik bezüglich der Darstellung der Hormonrezeptoren von Östrogen, Progesteron und Androgen untersucht.

In der statistischen Analyse zeigten sich eindeutige Zusammenhänge in der Expression der Hormonrezeptoren. Die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren korrelierten signifikant miteinander ($p=0,000$). Da die Progesteronrezeptorsynthese in der Literatur als östrogenabhängig beschrieben wird [33, 70, 76, 164], bestätigt dieses Ergebnis die bisherigen Literaturangaben. Signifikante Korrelationen bestanden auch zwischen Androgen- und Östrogenrezeptoren ($p=0,013$) und Androgen- und Progesteronrezeptoren ($p=0,000$). Jedoch bezogen sich die Korrelationen vor allem auf die schwache oder fehlende Expression der Rezeptoren. Bei negativem Östrogenrezeptorstatus war meistens auch der Androgenrezeptor negativ.

Nun ist vom Androgenrezeptor bis heute noch nicht viel bekannt. Ein großes Problem stellt bei der Detektion des Rezeptors seine Thermolabilität dar. Nachgewiesen wurde, daß die Stabilität des Androgenrezeptors sich durch „Molibdat Ionen“ erhöht [85]. Mit Hilfe dieser sensitiveren Methode hat sich gezeigt, daß bei 80% der Mammakarzinompatienten Androgenrezeptoren vorkommen. Dementsprechend sind Androgenrezeptoren auch in den Tumoren vorhanden, in denen Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression nicht nachweisbar sind [85]. Eine mögliche Ursache für die Korrelationen, die sich fast ausschließlich auf die schwach exprimierten Rezeptoren beziehen, könnte in dieser Thermolabilität liegen, da wir eine übliche immunhistochemische Färbung nach Autoklaven-Hitzevorbehandlung durchgeführt haben.

Es zeigte sich in unserer Studie eine inverse Korrelation zwischen der Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und dem pathologischen Grading (Tab. 11 und Tab. 12/13). Bekannt ist, daß im Zuge der Krankheitsprogression die Hormonrezeptoren abnehmen bzw. daß es auch zu einer Struktur- und Funktionsänderung der Rezeptoren kommt [33,76]. Der stufenweise Prozeß mit Abnahme der Hormonempfindlichkeit geht mit einer zunehmenden Entdifferenzierung der Karzinomzelle und einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit einher [44, 74, 76, 99]. Unser Ergebnis der inversen Korre-

lation zwischen dem Östrogen- und Progesteronrezeptoren und dem pathologischen Grading bestätigt damit die aktuellen Literaturangaben.

Des Weiteren haben wir eine signifikante Korrelation zwischen der Östrogenrezeptorexpression und der Gesamt- und rezidivfreien Überlebenszeit festgestellt ($p=0,001$; $p=0,004$). Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß Patientinnen mit Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-positiven Tumoren, die nach ihrer initialen Operation nicht mehr behandelt wurden, ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall und eine längere Überlebensrate als Patientinnen mit Rezeptor-negativen Tumoren haben, auch wenn die Stärke der Verbesserung relativ gering ist [20, 43, 109, 147]. Schlußfolgernd kann man sagen, daß zwar beide Rezeptoren, sowohl der Östrogen- als auch der Progesteronrezeptor signifikant mit dem Überlebensintervall korrelieren, jedoch durch keinen von beiden eine strenge Vorhersage gemacht werden kann. Beide Rezeptoren gelten als schwache prognostische Indikatoren [6]. Die von uns erhobene statistische Analyse der Gesamtüberlebenszeit und der rezidivfreien Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit von Östrogen- und Progesteronrezeptorgehalt bestätigt diesen Sachverhalt. Vor allem der Vergleich zwischen stark und negativ angefärbten Mammakarzinomschnitten verdeutlicht diese Aussagen. Patientinnen mit mittelstark angefärbten Östrogenrezeptoren in den Karzinomzellen weisen in den ersten 50 Monaten eine längere Gesamt- und rezidivfreie Überlebenszeit auf als Patientinnen mit schwach angefärbten Karzinomzellen. Danach geht dieser Vorteil verloren. Das gleiche gilt bei mittelstarker Progesteronrezeptorexpression. Bei der Überlebensanalyse mit Bezug auf die Androgenrezeptoren kann man zumindest einen Trend feststellen (Abb. 21/25). Patientinnen mit negativem Androgenrezeptorstatus sterben früher als Patientinnen mit positivem Androgenrezeptorstatus. Die Patientinnen, deren Rezeptorstatus bei allen drei Hormonrezeptoren als „vereinzelt“ beschrieben wurden, können aufgrund der geringen Anzahl nicht in die Wertung mit einbezogen werden.

Von entscheidender Bedeutung für unsere Studie war schließlich noch der Vergleich des von uns immunhistochemisch bestimmten Östrogenrezeptorgehaltes und des biochemisch bestimmten Östrogenrezeptorgehaltes der Mammakarzinome. 23 der biochemisch als negativ gewerteten Schnitte ergaben immunhistochemisch mit der Autoklavenvorbehandlung positive Ergebnisse: 17 Schnitte wurden schwach und 6 mittelstark angefärbt. Umgekehrt wiesen nur 2 immunhistochemisch als negativ gewertete Schnitte ein positives biochemisches Ergebnis auf. Die Übereinstimmung des positiven Östro-

genrezeptorstatus im Vergleich beider Methoden lag bei 95%, die des negativen Östrogenrezeptorstatus bei 56%. Insgesamt lag die Übereinstimmung des Östrogenrezeptorstatus bei 74%. Dies weist auf eine größere Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Methode hin. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der Östrogenrezeptorimmunocytochemical assay (ICA) mit der DCC-Methode (dextran-coated charcoal assay) wurde bereits durch viele Studien untersucht. Diese lag durchschnittlich bei 86% [15, 29, 50, 53, 94, 119, 145, 157], was durch unsere Ergebnisse ebenso untermauert wurde. Bei der statistischen Analyse des von uns bestimmten Progesteronrezeptorgehaltes und des biochemisch bestimmten Progesteronrezeptorgehaltes hielten sich die immunhistochemisch und biochemisch negativen gemessenen Ergebnisse die Waage (12/11). Hier läßt sich keine eindeutig größere Sensitivität oder Spezifität festlegen.

4.3 Schlußfolgerungen

Zusammenfassend können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Mit der Methode des feuchten Autoklavierens ist eine spezifische und sensitive immunhistochemische Bestimmung der Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren an routinemäßig Paraffin eingebettetem Gewebe möglich.
2. Mit den statistischen Analysen des von uns bestimmten Östrogenrezeptorgehaltes und des biochemisch bestimmten Östrogenrezeptorgehaltes der Mammakarzinome konnte eine größere Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Methode gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf ein hohes Potential der feuchten Autoklavierung zur Antigendemaskierung für die immunhistochemische Demonstration von Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren in formalinfixierten und paraffin eingebettetem Mammakarzinomgewebe hin. Diese Methode ist zuverlässig, sicher reproduzierbar, einfach zu handhaben und auch für den Routinebetrieb eine geeignete Form der Gewebepreparation. Zudem ist die Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Steroidrezeptor-Bestimmung der der biochemischen Detektion weit überlegen. Daher ist die Anwendung der Immunhistochemie für den diagnostischen Zweck wissenschaftlich begründet.

5 Zusammenfassung

Der immunhistochemische Nachweis von Hormonrezeptoren hat schon seit längerer Zeit an Bedeutung für die Therapie und die Prognose der am Mammakarzinom erkrankten Frauen gewonnen. 1991 publizierten Shin et al. [144] die Methode der hydratisierten Autoklavierung als effektive Vorbehandlung bei der immunhistochemischen Darstellung des TAU-Antigens im Gehirn. Bankfalvi et al. [11] zeigten in einer systematischen Analyse einer Reihe von Antikörpern, daß eine modifizierte Autoklavierung, die sog. feuchte Autoklavierung, für die Immunhistochemie eine einfache und äußerst verlässliche Methode zur Antigenmaskierung darstellt [12].

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Überprüfung der Anwendbarkeit der feuchten Autoklaven-Vorbehandlung in der immunhistochemischen Routinediagnostik bezüglich der Östrogen-, Progesteron- und der Androgenrezeptordarstellung beim Mammakarzinom.

Zum anderen sollten die klinisch-pathologischen Korrelationen und der prognostische Wert der immunhistochemisch bestimmten Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren bei Mammakarzinompatientinnen untersucht werden.

Dazu wurde routinemäßig Formalin fixiertes und Paraffin eingebettetes Gewebe von 138 Mammakarzinomen nach Autoklavenvorbehandlung immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet.

Folgende Aussagen konnten getroffen werden:

1. Es konnte eine größere Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Methode im Gegensatz zur herkömmlichen biochemischen Bestimmungsmethode des Östrogenrezeptor-gehaltes gezeigt werden.
2. Es konnten direkte Korrelationen in der Expression der Hormonrezeptoren untereinander und eine inverse Korrelation zwischen der Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression und dem pathologischen Grading nachgewiesen werden.

3. Unsere univariate Überlebensanalyse der Gesamtüberlebenszeit und der rezidivfreien Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit vom positiven oder negativen Hormonrezeptorstatus bestätigt Östrogen-, Progesteron-, und Androgenrezeptoren als prognostische Indikatoren [6].

4. Alle unsere Ergebnisse stehen weitestgehend in Einklang mit dem aktuellen Stand in der Literatur.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf ein hohes Potential der feuchten Autoklavierung zur Antigendemaskierung für die immunhistochemische Demonstration von Östrogen-, Progesteron- und Androgenrezeptoren in Formalin fixierten und Paraffin eingebettetem Mammakarzinomgewebe hin. Diese Methode ist zuverlässig, sicher reproduzierbar, einfach zu handhaben und auch für den Routinebetrieb eine geeignete Form der Gewebepreparation. Mittlerweile ist sie als Standardmethode der Antigendemaskierung in der Routine-Immunhistochemie am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie eingeführt worden.

6 Literatur

1. *Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.* Lancet, 1992. 339(8785): p. 71-85.
2. Aamdal, S., et al., *Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer.* Cancer, 1984. 53(11): p. 2525-9.
3. al Saati, T., et al., *Production of monoclonal antibodies to human estrogen-receptor protein (ER) using recombinant ER (RER).* Int J Cancer, 1993. 55(4): p. 651-4.
4. Alberto, P., et al., *A clinical trial of aminoglutethimide in advanced postmenopausal breast carcinoma: low response in patients previously treated with medroxyprogesterone.* Eur J Cancer Clin Oncol, 1985. 21(4): p. 423-8.
5. Allred, D.C., *Should immunohistochemical examination replace biochemical hormone receptor assays in breast cancer?* Am J Clin Pathol, 1993. 99(1): p. 1-3.
6. Allred, D.C., et al., *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.* Mod Pathol, 1998. 11(2): p. 155-68.
7. Andersen, J., T. Orntoft, and H.S. Poulsen, *Semiquantitative oestrogen receptor assay in formalin-fixed paraffin sections of human breast cancer tissue using monoclonal antibodies.* Br J Cancer, 1986. 53(5): p. 691-4.
8. Andersen, J., et al., *The prognostic value of immunohistochemical estrogen receptor analysis in paraffin-embedded and frozen sections versus that of steroid-binding assays.* Eur J Cancer, 1990. 26(4): p. 442-9.
9. Anderson, E.D., et al., *Response to endocrine manipulation and oestrogen receptor concentration in large operable primary breast cancer.* Br J Cancer, 1989. 60(2): p. 223-6.
10. Andry, G., et al., *Relation between estrogen receptor concentration and clinical and histological factors: their relative prognostic importance after radical mastectomy for primary breast cancer.* Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(2): p. 319-29.
11. Bankfalvi, A., et al., *Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry.* J. Path., 1994. 174: p. 223-8.
12. Bankfalvi, A., et al., *Moist autoclaving. A simplified method for antigen unmasking.* Pathologe, 1994. 15(6): p. 345-9.
13. Barnes, D.M., et al., *Immunohistochemical determination of oestrogen receptor: comparison of different methods of assessment of staining and correlation with clinical outcome of breast cancer patients.* Br J Cancer, 1996. 74(9): p. 1445-51.

14. Bastert, G., S.D. Costa, *Therapie des Mammakarzinoms*, in *Onkologie*, Z.z. Hausen, Editor., 1995.
15. Beebe, K., *The immunohistochemical detection and estimation of estrogen receptor protein activity in breast carcinoma*. *Can. J. MedTech*, 1990. 52: p. 23-32.
16. Benner, S.E., G.M. Clark, and W.L. McGuire, *Steroid receptors, cellular kinetics, and lymph node status as prognostic factors in breast cancer*. *Am J Med Sci*, 1988. 296(1): p. 59-66.
17. Berger, U., et al., *Comparison of an immunocytochemical assay for progesterone receptor with a biochemical method of measurement and immunocytochemical examination of the relationship between progesterone and estrogen receptors*. *Cancer Res*, 1989. 49(18): p. 5176-9.
18. Bloom, H.J., *The natural history of untreated breast cancer*. *Ann N Y Acad Sci*, 1964. 114(2): p. 747-54.
19. Böcker, W., H. Denk, P. Heitz, *Pathologie 1997*: Urban & Schwarzenberg Verlag. 849-69.
20. Brocklehurst, D., et al., *Relative importance of estrogen and progesterone receptor assays as prognostic indicators in primary breast cancer: a short-term study*. *Clin Chem*, 1989. 35(2): p. 238-40.
21. Brooks, S.C., et al., *Relation of tumor content of estrogen and progesterone receptors with response of patient to endocrine therapy*. *Cancer*, 1980. 46(12 Suppl): p. 2775-8.
22. Bur, M.E., *Estrogen receptor localization in formalin fixed paraffin sections of human breast cancer tissue using monoclonal antibodies*. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 1987. 6: p. 140-51.
23. Campbell, F.C., et al., *Quantitative oestradiol receptor values in primary breast cancer and response of metastases to endocrine therapy*. *Lancet*, 1981. 2(8259): p. 1317-9.
24. Cattoretti, G., et al., *Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections*. *J Pathol*, 1993. 171(2): p. 83-98.
25. Charalambous, D., et al., *A comparison between radioligand and immunohistochemical assay of hormone receptors in primary breast cancer*. *Aust N Z J Surg*, 1993. 63(8): p. 637-41.
26. Cheng, L., et al., *Demonstration of estrogen receptors by monoclonal antibody in formalin-fixed breast tumors*. *Lab Invest*, 1988. 58(3): p. 346-53.

27. Clark, G., Osborne, CK., McGuire, WL., *Correlation between estrogen-receptor, progesterone-receptor and patient characteristics in human breast cancer*. J. Clin. Oncol., 1984. 2(10): p. 1102-9.
28. Clark, G.M. and W.L. McGuire, *Progesterone receptors and human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1983. 3(2): p. 157-63.
29. Cohen, C., et al., *Automated immunohistochemical estrogen receptor in fixed embedded breast carcinomas*. Am J Clin Pathol, 1991. 95(3): p. 335-9.
30. Collett, K., et al., *Prognostic role of oestrogen and progesterone receptors in patients with breast cancer: relation to age and lymph node status*. J Clin Pathol, 1996. 49(11): p. 920-5.
31. Coombes, R.C., et al., *Prediction of endocrine response in breast cancer by immunocytochemical detection of oestrogen receptor in fine-needle aspirates*. Lancet, 1987. 2(8561): p. 701-3.
32. Danguy, A., N. Legros, N. Devlee, Schouwner et al, *Effects of medroxyprogesterone acetate (MPA) on growth of DMBA induced mammary tumors. Histopathological and Endocrine Studies*. In Jacobelli, S., A: Di Marco: Tumors. Raven, New York, 1980 p. 21-8.
33. Davidson, N.E., *Biology of breast cancer*. Curr Opin Oncol, 1991. 3(6): p. 988-94.
34. Daxenbichler, G., *Histochemischer Nachweis hormonsensitiver Zellen aus "Steroidhormonzellen im Karzinomgewebe"*, in W. Jonat u. H. Maas, Editor, Enke Verlag, p. 181-97.
35. De Negri, F., et al., *Comparison of monoclonal immunocytochemical and immunoenzymatic methods for steroid receptor evaluation in breast cancer*. Am J Clin Pathol, 1991. 96(1): p. 53-8.
36. De Rosa, C.M., et al., *Immunostaining of estrogen receptor in paraffin sections of breast carcinomas using monoclonal antibody D75P3 gamma: effects of fixation*. Am J Surg Pathol, 1987. 11(12): p. 943-50.
37. DeFriend, D.J., et al., *Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer*. Cancer Res, 1994. 54(2): p. 408-14.
38. Dorssers, L.C. and T. van Agthoven, *Genetic mechanisms of estrogen-independence in breast cancer*. Pathol Res Pract, 1996. 192(7): p. 743-51.
39. Dowsett, M., et al., *Response to specific anti-oestrogen (ICI182780) in tamoxifen-resistant breast cancer*. Lancet, 1995. 345(8948): p. 525.
40. Dressler, L.G., et al., *DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens*. Cancer, 1988. 61(3): p. 420-7.

41. Elias, J.M., S. Masood, *Estrogen Receptor Assay: Are We Doing It The same Way? - A survey*. The Journal of Histotechnology, 1995. 18(2).
42. Fischer, B., C.K. Osborne, R. Margolese, W. Bloomer, *Neoplasms of the breast*.
43. Fisher, B., et al., *Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06*. J Clin Oncol, 1988. 6(7): p. 1076-87.
44. Fisher, E.R., et al., *Correlation of primary breast cancer histopathology and estrogen receptor content*. Breast Cancer Res Treat, 1981. 1(1): p. 37-41.
45. Frigo, B.L., S., Faber, M. et al, *Application of an estrogen receptor- immunocytochemical assay primary monoclonal antibody kit to paraffin-embedded human breast tumor tissue*. Appl. Immunohistochem.1, 1993: p. 136.
46. Fuqua, S.A. and D.M. Wolf, *Molecular aspects of estrogen receptor variants in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1995. 35(3): p. 233-41.
47. Greene, G.L., M.F. Press, *Immunohistochemical evaluation of estrogen receptor and progesterone receptor in breast cancer*. In Ceriani, RL., ed.; Immunological approaches to the diagnosis and therapy of breast cancer. New York: Plenum Press, 1987, p.119-135..
48. group, T.C.B.c., *Progress report: results of studies by the cooperative breast cancer group 1956-1960*. Cancer Chemother Rep., 1961. 11: p. 119-141.
49. Haagedoorn, O., Bender, Clarke, Sleijfer, *Basiswissen Onkologie*.
50. Hanna, W. and B.G. Mobbs, *Comparative evaluation of ER-ICA and enzyme immunoassay for the quantitation of estrogen receptors in breast cancer*. Am J Clin Pathol, 1989. 91(2): p. 182-6.
51. Hawkins, E.F., G. Lieskovsky, and F.S. Markland, Jr., *Molybdate and the measurements of androgen receptors in prostate cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 1981. 53(2): p. 456-8.
52. Hawkins, R.A., J.H.H Thijssen, W.R. Miller, *Die Bedeutung der Aromatase und Sulfatasestoffwechselwege in die intrazelluläre Östrogensynthese beim Mammakarzinom postmenopausaler Frauen*, in *Aromatasehemmer*. Aktuelle Onkologie, Bd. 38, Zuckerschwerdt, München, 1987.
53. Helin, H.J., et al., *Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human breast carcinoma. Correlation with histopathology and DNA flow cytometry*. Cancer, 1989. 63(9): p. 1761-7.

54. Henderson, B.E., R. Ross, and L. Bernstein, *Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture*. *Cancer Res*, 1988. 48(2): p. 246-53.
55. Henderson, B.E., R.K. Ross, and M.C. Pike, *Toward the primary prevention of cancer*. *Science*, 1991. 254(5035): p. 1131-8.
56. Henderson, C.E., *Endocrine therapy of metastatic breast cancer*, in *Breast diseases*, S. Hellmann, J.R. Harris, C.J. Henderson, D.W. Kinne, Editor. 1991: Philadelphia. p. 559-603.
57. Heubner, A., et al., *Comparison of immunocytochemical estrogen receptor assay, estrogen receptor enzyme immunoassay, and radioligand-labeled estrogen receptor assay in human breast cancer and uterine tissue*. *Cancer Res*, 1986. 46(8 Suppl): p. 4291s-4295s.
58. Heuson, J.C., N. Legros, J.A. Heuson-Stiennon, G. le Clercq, J.L. Pastels, *Hormone dependency of rat mammary tumors*, in *Breast cancer: trends in research and treatment*. 1976, Raven: New York. p. 81-93.
59. Hiort, O., P.W. Kwan, and R.A. DeLellis, *Immunohistochemistry of estrogen receptor protein in paraffin sections. Effects of enzymatic pretreatment and cobalt chloride intensification*. *Am J Clin Pathol*, 1988. 90(5): p. 559-63.
60. Horwitz, K.B., *The antiprogestin RU38 486: receptor-mediated progestin versus antiprogestin actions screened in estrogen-insensitive T47Dco human breast cancer cells*. *Endocrinology*, 1985. 116(6): p. 2236-45.
61. Horwitz, K.B., et al., *Progestin action and progesterone receptor structure in human breast cancer: a review*. *Recent Prog Horm Res*, 1985. 41: p. 249-316.
62. Horwitz, K.B., *Mechanisms of hormone resistance in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. 26(2): p. 119-30.
63. Howell, A. and A.E. Wakeling, *Steroid and peptide hormones and growth factors*. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, 1987. 9: p. 121-33.
64. Howell, A., et al., *Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer*. *Lancet*, 1995. 345(8941): p. 29-30.
65. Jaiyesimi, I.A., et al., *Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later*. *J Clin Oncol*, 1995. 13(2): p. 513-29.
66. Jensen, E.V., *Hormone dependency of breast cancer*. *Cancer*, 1981. 47(10): p. 2319-26.
67. Jonat, W., H. Maass, and H.E. Stegner, *Immunohistochemical measurement of estrogen receptors in breast cancer tissue samples*. *Cancer Res*, 1986. 46(8 Suppl): p. 4296s-4298s.

68. Jonat, W., M. Kaufmann, *Die Gestagenbehandlung des Mammakarzinoms*, in *Sytemtherapie des Mammakarzinoms*, Becher, R., K. Höffken, Editor. 1989, Zuckschwerdt: München. p. 98-104.
69. Jordan, V.C., *Metabolites of tamoxifen in animals and man: identification, pharmacology, and significance*. *Breast Cancer Res Treat*, 1982. 2(2): p. 123-38.
70. Jordan, V.C., *Oestrogen and antioestrogen action. A hypothesis for the regulation of breast cancer cell replication* in Cavelli, F., *Endocrine Therapy of breast cancer I*. 1986, Springer: Berlin. p. 41-49.
71. Jordan, V.C., H.I. Jacobson, and E.J. Keenan, *Determination of estrogen receptor in breast cancer using monoclonal antibody technology: results of a multicenter study in the United States*. *Cancer Res*, 1986. 46(8 Suppl): p. 4237s-4240s.
72. Kaufmann, M., et al., *Goserelin, a depot gonadotrophin-releasing hormone agonist in the treatment of premenopausal patients with metastatic breast cancer. German Zoladex Trial Group*. *J Clin Oncol*, 1989. 7(8): p. 1113-9.
73. Key, T.J. and M.C. Pike, *The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer*. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1988. 24(1): p. 29-43.
74. King, R.J., *Role of oestrogen and progestine in human mammary carcinogenesis*, in *Endocrine therapy of breast cancer*, A. Goldhirsch, Editor, Springer: Berlin. p. 3-8.
75. King, R.J., *Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis*. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. 27: p. 3-15.
76. King, R.J., P.D. Dabre, *Progression from steroid responsive to unresponsive state*, in *Endocrine therapy of breast cancer*, Springer: Berlin. p. 3-15.
77. King, W.J. and G.L. Greene, *Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells*. *Nature*, 1984. 307(5953): p. 745-7.
78. King, W.J., et al., *Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors*. *Cancer Res*, 1985. 45(1): p. 293-304.
79. Kinsel, L.B., et al., *Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods*. *Cancer Res*, 1989. 49(4): p. 1052-6.
80. Klijn, J.G., *Long-term LHRH-agonist treatment in metastatic breast cancer as a single treatment and in combination with other additive endocrine treatments*. *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 1984. 1(2): p. 123-8.
81. Klijn, J.G., et al., *The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study*. *Breast Cancer Res Treat*, 1994. 29(1): p. 73-83.

82. Koga, M. and R.L. Sutherland, *Epidermal growth factor partially reverses the inhibitory effects of antiestrogens on T 47D human breast cancer cell growth*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. 146(2): p. 739-45.
83. Kuenen-Boumeester, V., et al., *Immunohistochemical determination of androgen receptors in relation to oestrogen and progesterone receptors in female breast cancer*. Int J Cancer, 1992. 52(4): p. 581-4.
84. Kuenen-Boumeester, V., et al., *The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters*. Eur J Cancer, 1996. 32A(9): p. 1560-5.
85. Lea, O.A., S. Kvinnsland, and T. Thorsen, *Improved measurement of androgen receptors in human breast cancer*. Cancer Res, 1989. 49(24 Pt 1): p. 7162-7.
86. Leclercq, G., et al., *Abbott monoclonal enzyme immunoassay measurement of estrogen receptors in human breast cancer: a European multicenter study*. Cancer Res, 1986. 46(8 Suppl): p. 4233s-4236s.
87. Leong, A.-Y., A.K.C. Lee, *Biological indices in the assessment of breast cancer*. J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol., 1995. 48: p. 221-238.
88. Leong, A.-Y., J. Milios, Appl. Immunohistochem, 1993.
89. Lerner, L.J. and V.C. Jordan, *Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture*. Cancer Res, 1990. 50(14): p. 4177-89.
90. Lippman, M., G. Bolan, and K. Huff, *The effects of glucocorticoids and progesterone on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture*. Cancer Res, 1976. 36(12): p. 4602-9.
91. Lippman, M.E. and J.C. Allegra, *Quantitative estrogen receptor analyses: the response to endocrine and cytotoxic chemotherapy in human breast cancer and the disease-free interval*. Cancer, 1980. 46(12 Suppl): p. 2829-34.
92. Logan, L.A., et al., *The estrogen receptor test: a prognostic tool in primary breast cancer*. Can J Surg, 1982. 25(5): p. 581-4.
93. Luthy, I.A., D. Begin, and F. Labrie, *Mediation by the androgen receptor of the stimulatory and antiandrogenic actions of 17 beta-estradiol on the growth of androgen-sensitive Shionogi mammary carcinoma cells in culture*. Endocrinology, 1988. 123(3): p. 1418-24.
94. Masood, S., L. Lu, and N. Rodenroth, *Potential value of estrogen receptor immunocytochemical assay in formalin-fixed breast tumors*. Mod Pathol, 1990. 3(6): p. 724-8.

95. Masood, S., S. Dee, and J.D. Goldstein, *Immunocytochemical analysis of progesterone receptors in breast cancer*. Am J Clin Pathol, 1991. 96(1): p. 59-63.
96. Mathiesen, O., et al., *The prognostic value of estrogen and progesterone receptors in female breast cancer. A single center study*. Acta Oncol, 1991. 30(6): p. 691-5.
97. McGuire, W.L., G.C. Chamness, and S.A. Fuqua, *Estrogen receptor variants in clinical breast cancer*. Mol Endocrinol, 1991. 5(11): p. 1571-7.
98. McGuire, W.L., D.T. Zara, K.B. Horwitz, G.C. Chamness, *Hormones Receptors and Breast cancer* in Proceedings of the sixth Tenovus Workshop on Tumour Markers. Griffiths, K., A.M. Neville and C.K. Pierrepont, Alpha Omega Publishing Cardiff 1978, p. 153-61.
99. Meuret, G., *Grundlagen*, in *Mammakarzinom*, Hsg. G. Meuret, Georg Thieme Verlag. p. 1-25.
100. Miller, W.R., *The clinical relevance of aromatase activity in breast tumor tissue*, in *Aromatase Inhibition Present and Future* in Jonat, W., R.J. Santen: 1991, Patheon: New Jersey, p. 11-27.
101. Miller, W.R., O'Neill, *Bedeutung der Aromataseaktivität der Brust*, in Possinger, K., W.R. Miller: *Aromatasehemmer in Aktuelle Onkologie*. Bd. 38. Zuckerschwerdt, München, 1987. p. 11-22.
102. Molino, A., et al., *Estrogen and progesterone receptors in breast cancer: correlation with clinical and pathological features and with prognosis*. Oncology, 1992. 49(2): p. 82-8.
103. Nadyi, M., A. Morales, *Immunhistologic Prognosticators of Breast Cancer*, in *Immunhistochemische Diagnostik gynäkologischer Tumoren*, G.K. u. B. Lampe, Editor, Thieme Verlag. p. 106-113.
104. Nandi, S., R.C. Guzman, and J. Yang, *Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(9): p. 3650-7.
105. Nillis, K.U., *Risikoadaptierte adjuvante Therapie bei primär modifiziert operierten Mamma-CA-Patientinnen.*, in *Diss, Düsseldorf*. 1992.
106. Noguchi, S., et al., *Comparison of enzyme immunoassay with dextran-coated charcoal method in the determination of progesterone receptor in breast cancer cytosols*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1988. 24(11): p. 1715-9.
107. O'Brian, C.A., et al., *Inhibition of protein kinase C by tamoxifen*. Cancer Res, 1985. 45(6): p. 2462-5.
108. Osborne, C.K., et al., *The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer*. Cancer, 1980. 46(12 Suppl): p. 2884-8.

109. Osborne, C.K., *Receptors*, in *Breast diseases*, J.R. Harris, S. Hellmann, J. Henderson, D.W. Kinne, Editor. 1991: Philadelphia. p. 301-325.
110. Osborne, C.K., *Mechanisms for tamoxifen resistance in breast cancer: possible role of tamoxifen metabolism*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1993. 47(1-6): p. 83-9.
111. Osborne, M.P., *Breast development and anatomy*. In Harris, J.R., S. Hellmann, C.I. Henderson, D.W. Kinne.: *Breast Diseases*, 2nd ed. Lippincott, Philadelphia 1991. p. 1-13.
112. Ozzello, L., et al., *Detection of estrophilin in frozen sections of breast cancers using an estrogen receptor immunocytochemical assay*. *Cancer Res*, 1986. 46(8 Suppl): p. 4303s-4307s.
113. Pannuti, F., et al., *Experimental study on the anabolic and androgenic/antiandrogenic activity of different dose levels of medroxyprogesterone acetate (MAP) in rats*. *Oncology*, 1981. 38(5): p. 307-10.
114. Paridaens, R., et al., *Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in advanced breast cancer*. *Cancer*, 1980. 46(12 Suppl): p. 2889-95.
115. Paridaens, R., Heuson, J.C., *Steroids*, in *Cancer Chemotherapy. Te EORTC Cancer Chemotherapy Annual*. 1979: Amsterdam. p. 167-181.
116. Parl, F.F. and Y.F. Posey, *Discrepancies of the biochemical and immunohistochemical estrogen receptor assays in breast cancer*. *Hum Pathol*, 1988. 19(8): p. 960-6.
117. Paterson, D.A., et al., *Assessment of oestrogen receptor content of breast carcinoma by immunohistochemical techniques on fixed and frozen tissue and by biochemical ligand binding assay*. *J Clin Pathol*, 1990. 43(1): p. 46-51.
118. Paterson, J.S., A. Howell, *Steroid and Peptide Hormones and growth factors*, in *Cancer Chemotherapy*. 1985, Excerpta Medica: Amsterdam. p. 164-191.
119. Pertschuk, L.P., et al., *Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies. Correlation with biochemistry and clinical endocrine response*. *Cancer*, 1985. 55(7): p. 1513-8.
120. Pertschuk, L.P., et al., *Immunocytochemical detection of progesterone receptor in breast cancer with monoclonal antibody. Relation to biochemical assay, disease-free survival, and clinical endocrine response*. *Cancer*, 1988. 62(2): p. 342-9.
121. Pichon, M.F., et al., *Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer*. *Cancer Res*, 1980. 40(9): p. 3357-60.
122. Poulin, R., D. Baker, and F. Labrie, *Androgens inhibit basal and estrogen-induced cell proliferation in the ZR-75-1 human breast cancer cell line*. *Breast Cancer Res Treat*, 1988. 12(2): p. 213-25.

123. Poulsen, H.I.F.C.M., Wolff, M. eds., *In vitro tests and hormonal treatment of breast cancer.*, in *Progress in surgical pathology*. 1983: New York; Masson Publishing USA. p. 37-65.
124. Poulsen, H.S., et al., *The use of monoclonal antibodies to estrogen receptors (ER) for immunoperoxidase detection of ER in paraffin sections of human breast cancer tissue.* J Histochem Cytochem, 1985. 33(2): p. 87-92.
125. Press, M.F. and G.L. Greene, *Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor.* Endocrinology, 1988. 122(3): p. 1165-75.
126. Reiner, A., et al., *Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer.* Cancer Res, 1990. 50(21): p. 7057-61.
127. Remmele, W. and H.E. Stegner, *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue.* Pathologe, 1987. 8(3): p. 138-40.
128. Robertson, J.F., et al., *Factors predicting the response of patients with advanced breast cancer to endocrine (Megace) therapy.* Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(3): p. 469-75.
129. Robertson, J.F., *Oestrogen receptor: a stable phenotype in breast cancer.* Br J Cancer, 1996. 73(1): p. 5-12.
130. Robinson, S.P. and V.C. Jordan, *The paracrine stimulation of MCF-7 cells by MDA-MB-231 cells: possible role in antiestrogen failure.* Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(3): p. 493-7.
131. Rochefort, H., *Mechanism of action of high-affinity antiestrogens. An overview.* Am J Clin Oncol, 1991. 14 Suppl 2: p. S1-4.
132. Rubens, R.D. and J.L. Hayward, *Estrogen receptors and response to endocrine therapy and cytotoxic chemotherapy in advanced breast cancer.* Cancer, 1980. 46(12 Suppl): p. 2922-4.
133. Saccani Jotti, G., et al., *Comparison of new immunohistochemical assay for oestrogen receptor in paraffin wax embedded breast carcinoma tissue with quantitative enzyme immunoassay.* J Clin Pathol, 1994. 47(10): p. 900-5.
134. Sannino, P. and S. Shousha, *Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing.* J Clin Pathol, 1994. 47(1): p. 90-2.
135. Santen, R.J., E. Samojlik, and S.A. Wells, *Resistance of the ovary to blockade of aromatization with aminoglutethimide.* J Clin Endocrinol Metab, 1980. 51(3): p. 473-7.

136. Santen, R.J., et al., *Aminoglutethimide as treatment of postmenopausal women with advanced breast carcinoma*. Ann Intern Med, 1982. 96(1): p. 94-101.
137. Santen, R.J., *The principles of aromatase inhibition in the treatment of breast cancer*, in *Aromatase Inhibition Present and Future*, W.S. Jonat, Editor. 1991: New Jersey.
138. Santen, R.J., Samojlik, E., Worgul, T.J., *Aminogluthetimide*, in *A comprehensive guide to the therapeutic use of Aminogluthetimide*, Santen, R.J. , I.T. Henderson, Editor. 1982, Karger: Basel. p. 101-160.
139. Santen, R.J., E. Juhos, *Local estrogen production by human breast cancer tumors*, in *Endocrine-Dependent Breast Cancer: Critical Assessment of Recent Advances.*, R.J. Santen, Juhos, E., Editor. 1988, Huber: Bern. p. 92-110.
140. Schmid, K.W., W. Böcker , *Immunohistochemie - Neue Entwicklung in der Tumordiagnostik*. 1994.
141. Shek, L.L. and W. Godolphin, *Survival with breast cancer: the importance of estrogen receptor quantity*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(2): p. 243-50.
142. Shi, S.R., M.E. Key, and K.L. Kalra, *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections*. J Histochem Cytochem, 1991. 39(6): p. 741-8.
143. Shimada, A., et al., *Immunocytochemical staining of estrogen receptor in paraffin sections of human breast cancer by use of monoclonal antibody: comparison with that in frozen sections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(14): p. 4803-7.
144. Shin, R.W., et al., *Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues*. Lab Invest, 1991. 64(5): p. 693-702.
145. Shintaku, I.P. and J.W. Said, *Detection of estrogen receptors with monoclonal antibodies in routinely processed formalin-fixed paraffin sections of breast carcinoma. Use of DNase pretreatment to enhance sensitivity of the reaction*. Am J Clin Pathol, 1987. 87(2): p. 161-7.
146. Shousha, S., et al., *Immunohistological study of oestrogen receptors in breast carcinomas that are biochemically receptor negative*. J Clin Pathol, 1990. 43(3): p. 239-42.
147. Sigurdsson, H., et al., *Indicators of prognosis in node-negative breast cancer*. N Engl J Med, 1990. 322(15): p. 1045-53.
148. Silverstrini, R., M.G. Daidone, and G. Di Fronzo, *Relationship between proliferative activity and estrogen receptors in breast cancer*. Cancer, 1979. 44(2): p. 665-70.

149. Slattery, A.F., England, D.M., *Estrogen and progesterone receptor proteins in zinc sulfate, formalin fixed breast carcinoma: advantages of a supersensitive streptavidin technique*. J. Histotechnol., 1993. 16: p. 51-56.
150. Smith, J.A. and R.J. King, *Effects of steroids on growth of an androgen-dependent mouse mammary carcinoma in cell culture*. Exp Cell Res, 1972. 73(2): p. 351-9.
151. Snead, D.R., et al., *Methodology of immunohistological detection of oestrogen receptor in human breast carcinoma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: a comparison with frozen section methodology*. Histopathology, 1993. 23(3): p. 233-8.
152. Snijders, M.P., et al., *Is immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometrial carcinoma superior to the radioligand binding assay?* J Pathol, 1990. 161(2): p. 129-35.
153. Sondergaard, G., K.O. Pedersen, and S.M. Paulsen, *Estrogen receptor analyses in breast cancer: comparison of monoclonal immunohistochemical and biochemical methods*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(10): p. 1425-9.
154. Spyrtos, F., et al., *Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary infiltrating ductal breast cancer. A sequential multivariate analysis of 1262 patients*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(8): p. 1233-40.
155. Stegner, R., *Steroidhormonrezeptoren*, in *Immunhistochemische Diagnostik gynäkologischer Tumoren*. Hsg., G.K.u.B. Lampe, Editor. 1992.
156. Teller, M.N., et al., *Biologic characteristics and chemotherapy of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced tumors in rats*. Cancer Res, 1966. 26(2): p. 245-52.
157. Tesch, M., A. Shawa, and R. Henderson, *Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor status in breast cancer*. Am J Clin Pathol, 1993. 99(1): p. 8-12.
158. Thorpe, S.M., et al., *Quantitative immunological detection of estrogen receptors in nuclear pellets from human breast cancer biopsies*. Cancer Res, 1986. 46(8 Suppl): p. 4251s-4255s.
159. Tormey, D.C., et al., *Evaluation of tamoxifen doses with and without flouxymesterone in advanced breast cancer*. Ann Intern Med, 1983. 98(2): p. 139-44.
160. Walker, K.J., et al., *Heterogeneity of oestrogen receptor expression in normal and malignant breast tissue*. Eur J Cancer, 1992. 28(1): p. 34-7.
161. Walt, A.J., et al., *The surgical implications of estrophile protein estimations in carcinoma of the breast*. Surgery, 1976. 80(4): p. 506-12.

-
162. Wander, H.E., et al., *Megestrol acetate in various doses in the treatment of metastatic breast carcinoma-clinical and endocrinologic studies*. *Klin Wochenschr*, 1985. 63(7): p. 312-8.
 163. Welsch, C.W., *Hormones and murine mammary tumorigenesis*, in *Hormonal regulation of mammary tumors*, B.S. Leung, Editor. 1982, Eden: Montreal. p. 1-9.
 164. Westerhausen, M., *Hormonabhängigkeit der Brustdrüse und Hormontherapie*, in *Mammakarzinom*, Gerhard Meuret. Hrsg. Georg Thieme Verlag, p. 56-76.
 165. Williams, M.R., et al., *Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review of 704 cases*. *Br J Cancer*, 1987. 55(1): p. 67-73.
 166. Wu, J.T. and L.W. Wilson, *Progesterone receptor: stability studies and correlation between steroid binding assay and enzyme immunoassay*. *Clin Chem*, 1988. 34(10): p. 1987-91.
 167. Würz, H., K.-D. Schulz, M. Citoler, R. Kaiser, *Verteilung von Östrogen-, Gestagen-, Androgen- u. Kortikosteroidrezeptoren*, in *Steroidhormonrezeptoren im Karzinomgewebe*, H.Maass, W. Jonat, Editor, p. 23-30.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Name</i>	Weining, geb. Cubick
<i>Vorname</i>	Christiane
<i>Geburtsdatum</i>	27. Mai 1974
<i>Geburtsort</i>	Münster-Hiltrup
<i>Familienstand</i>	verheiratet mit Dr. Gunnar Weining

Schulbildung

1980-1984	Ludgerusgrundschule in Münster-Hiltrup
1984-1993	Kardinal von Galen Gymnasium in Münster-Hiltrup
04.06.1993	Abschluss des Abiturs

Studium

1993-1999	Studium der Humanmedizin an der WWU Münster
August 1995	Physikum
August 1996	1. Staatsexamen
März 1999	2. Staatsexamen
Juni 2000	3. Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit

01.11.00 - 31.12.01	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Osnabrück
01.05.02	Approbation als Ärztin
Seit 01.01.02	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Herz-Jesu- Krankenhaus in Münster-Hiltrup