

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

**Evaluation von Metallothionin 3, CXCR4, X-IAP
und IAP-2 als Progressionsmarker des invasiv duktalem
Mammakarzinoms**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Dröge, Arnold Paul Bernhard

aus Haselünne

2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. med. dent. T. Fillies

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker-
Referent: PD Dr. med. Dr. med. dent. T. Fillies
Koreferent: Prof. Dr. med. H. Bürger

Zusammenfassung

Evaluation von Metallothionin 3, CXCR4, X-IAP und IAP-2 als Progressionsmarker des invasiv duktales Mammakarzinoms.

Der häufigste maligne Tumor der Frau ist das Mammakarzinom, welches von der WHO in zweiundzwanzig invasive Karzinome unterteilt wird. Diese Arbeit untersucht Metallothionin 3, CXCR4, X-IAP und IAP-2 auf ihre Bedeutung für die Progression des invasiv duktales Mammakarzinoms, mit dem Ziel, die zugrundeliegenden Mechanismen der Karzinom-Entdifferenzierung zu entschlüsseln. In dieser Studie wurden die potenziellen Marker mit den bereits bekannten Markern MIB-1, p53, erbB-2, CK5, EGFR sowie dem Progesteron- und dem Östrogen-Rezeptor verglichen. Hierzu diente die Tissue Microarray Technik, die es, durch die Erstellung eines Tissue Microarrays aller 144 Tumore des Tumor-Kollektivs, ermöglichte, einen standardisierten Vergleich unter identischen Färbe- und Test-Bedingungen durchzuführen. Mit dem Auswertungsprogramm SPSS wurden die Ergebnisse der Analyse auf die Häufigkeit der Expression der Marker sowie auf die Korrelation der Kandidatenmarker zu den bekannten Markern untersucht.

Es ergaben sich signifikante Korrelationen von Metallothionin 3 zu CK5, von CXCR4 zu MIB-1 und EGFR sowie von X-IAP zu MIB-1 und p53. Diese Korrelationen scheinen allerdings nicht spezifische Korrelationen für schlecht-differenzierte, Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinome zu sein. Weitere pathologische und klinische Studien müssen genauere Einblicke in die Bedeutung dieser Prognosefaktoren geben.

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.02.2009

Diese Arbeit möchte ich meiner Mutter Hedwig Dröge und meinem Großvater Paul Heine widmen, ohne die Studium und Promotion nicht möglich gewesen wären.

Inhaltsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Definition	9
1.2 Epidemiologie	9
1.3 Ätiologie	11
1.4 Die Vorstufen der invasiven Mammakarzinome	12
1.4.1 Duktale Hyperplasien	12
1.4.2 Atypisch duktale Hyperplasien	12
1.5 Nicht invasive Karzinome	13
1.5.1 Duktale carcinoma in situ	13
1.5.2 Lobuläre Neoplasien	14
1.6 Klinik	15
1.6.1 Lokalisation	15
1.6.2 Metastasierung	15
1.6.3 Die internationale Klassifikation nach dem TNM-System	15
1.6.4 Grading	17
1.7 Therapie und Prognose	18
1.7.1 Chirurgie	18
1.7.2 Strahlentherapie	18
1.7.3 Pharmakotherapie	19
1.7.4 Prognose	19
1.8 Molekulargenetischer Hintergrund	20
1.9 Tumorprogressionsmodelle	21
1.10 Die Kandidatenmarker	26
1.10.1 Metallothionine	26
1.10.2 CXCR4	27
1.10.3 X-IAP und IAP-2	27
1.11 Fragestellung der Arbeit	28

2.	Material und Methode	29
2.1.	Analyse der Expression von MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP	29
2.1.1	Grundlagen der Tissue Microarray Technik	29
2.1.2	Die Erstellung des Tissue Microarrays	30
2.2	Immunhistochemische Untersuchung	33
2.2.1	Immunhistochemisches Färbeprotokoll für MT3, CXCR4 , IAP-2 und X-IAP	34
2.2.2	Immunhistochemisches Färbeprotokoll für Mib-1	37
2.3	Auswertung	40
2.4	Statistische Analyse	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Auswertung der Marker-Expression	43
3.1.1	Expression von MT3	43
3.1.2	Expression von CXCR4	44
3.1.3	Expression von X-IAP	45
3.1.4	Expression von IAP-2	46
3.1.5	Expression von MIB-1	47
3.1.6	Expression von p53	48
3.1.7	Expression von erbB-2	49
3.1.8	Expression von CK5	50
3.1.9	Expression von EGFR	51
3.1.10	Expression des Östrogenrezeptors	52
3.1.11	Expression des Progesteronrezeptors	53
3.2	Korrelation der potentiellen Marker zu den bekannten Markern	54
3.2.1	Korrelation zu MT3	54
3.2.2	Korrelation zu CXCR4	55
3.2.3	Korrelation zu IAP-2	56
3.2.4	Korrelation zu X-IAP	57

4. Diskussion	58
5. Schlussfolgerung	64
6. Literaturverzeichnis	65
7. Danksagung	86
8. Lebenslauf	87
9. Anhang	i
9.1 Reagenzien	i
9.2. Abbildungsverzeichnis	iii
9.3 Tabellenverzeichnis	iv
9.4 Abkürzungsverzeichnis	v

1. Einleitung

1.1 Definition

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau. Dieser epitheliale Tumor, der aus dem Brustdrüsenparenchym entsteht und eine heterogene Krankheitsgruppe bildet, zeigt hinsichtlich der histologischen Form sowie bei Verlauf und Prognose starke Unterschiede (25). Die histologische Klassifikation der WHO unterscheidet bereits seit 1981 drei nicht invasive Karzinome sowie zweiundzwanzig invasive Karzinome (154). Grundsätzlich werden bei den invasiven Mammakarzinomen invasiv duktales Mammakarzinome, die mit etwa 85% die häufigste Tumorgruppe darstellen, und invasiv lobuläre Mammakarzinome, die etwa 15% dieser Tumore ausmachen, unterschieden.

1.2 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit weltweit über einer Millionen Neuerkrankungen pro Jahr der häufigste bösartige Tumor der Frau (46). 10-12% aller Frauen werden in ihrem Leben einen Brustkrebs entwickeln (109). In Deutschland sind dies allein 50.000 Frauen pro Jahr, bei steigender Inzidenz (120).

Damit steht das Mammakarzinom innerhalb Deutschlands an erster Stelle in der Rangfolge der Krebsinzidenz, noch vor Darmkrebs, Leukämien und Lymphomen. Auch im Bezug auf die Mortalität ist das Mammakarzinom die häufigste Krebstodesursache, vor Darmkrebs und Bronchialkarzinomen. Der Anteil an der Tumor bedingten Mortalität beträgt 17,1 % (11). Im Gegensatz zu der bei uns etwa gleichbleibenden Mortalitätsrate ist in den USA seit Ende der achtziger Jahre ein Rückgang um etwa 20% zu beobachten (20, 99, 153).

Ferner ist ein starkes Nord-Süd-Gefälle mit geringerer Erkrankungshäufigkeit in den mediterranen Ländern im Gegensatz zu denen in Nord/West Europa und den USA auffällig.

1.3 Ätiologie

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist multifaktoriell. So lässt sich eine Erhöhung des relativen Mammakarzinomrisikos an zahlreichen Punkten festmachen.

Das Risiko erhöht sich um das Zweifache bei Patienten mit Menopause nach dem 50. Lebensjahr, Menarche vor dem 12. Lebensjahr, Nulliparität, Adipositas bei postmenopausalen Frauen und bei epithelialer Hyperplasie (89).

Um das Zwei- bis Vierfache erhöht sich das Risiko, wenn die erste ausgetragene Schwangerschaft nach dem 30. Lebensjahr erfolgt, Mammakarzinome bei Mutter oder Schwester auftreten, durch eine Kombination von Nulliparität und epithelialer Hyperplasie sowie durch vorausgegangene Ovarial-, Endometrium- oder Kolonkarzinome (89).

Um das Vierfache erhöht sich das Risiko nach behandelten Mammakarzinomen, bei Mammakarzinomen von Mutter und Schwester, bei Mastopathie mit Atypien und bei positiver Familienanamnese kombiniert mit verzögerter erster Schwangerschaft oder Nulliparität (89).

Als wichtigster individueller Risikofaktor ist die familiäre Belastung durch Verwandte ersten Grades zu nennen. Hierbei erhöht sich das Auftreten von Mammakarzinomen vor dem 35. Lebensjahr um 33% (95, 108, 133).

Dennoch weist der weitaus größte Teil der Mammakarzinomfälle (90-95%) keine positive Familienanamnese auf. Daraus ergibt sich, dass nur bei 0,3-0,4 % aller Frauen eine dominante Genmutation vorliegt, die zur Entwicklung eines Mammakarzinoms disponiert (33, 34, 77).

1.4 Die Vorstufen der invasiven Mammakarzinome

1.4.1 Duktale Hyperplasien

Bei den dukталen Hyperplasien wurden nur einige Befunde beschrieben, die Veränderungen an den Chromosomen aufwiesen, es ergab sich jedoch kein Anhalt für rekurrente Veränderungen (43, 91, 134). Nur in seltenen Fällen wurde ein Verlust der Heterozygotie beobachtet (78,103). Dennoch wiesen in einigen Fällen duktale Hyperplasien die selben chromosomalen Veränderungen auf wie die sie begleitenden atypisch dukталen Hyperplasien, die dukталen Karzinoma in situ und die invasiven Mammakarzinome (103). Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden, dass bei dukталen Hyperplasien p53 und erbB-2 nur schwach bis gar nicht ausgeprägt sind. Es wurde teilweise eine Expression von Cyclin B, cdc2, TGF-alpha, p68, SF/c-met, PLP und MR 52.000 nachgewiesen (6,53,67,73,84,106,132,147).

1.4.2 Atypisch duktale Hyperplasien

Atypisch duktale Hyperplasien werden durch den Nachweis zellulärer Monoklonalität als neoplastische Läsionen eingestuft (100,101). Ihre histologischen Diagnosekriterien weisen sie als Zwischenstufe zwischen der dukталen Hyperplasie und dem dukталen Karzinoma in situ aus.

Zur Abgrenzung der atypisch dukталen Hyperplasien gegen die dukталen Hyperplasien und dukталen Karzinoma in situ wurden Antikörper gegen hochmolekulare Zytokeratine wie CK 5 und 14 verwendet (26). DNA Analysen wiesen für die atypisch dukталen Hyperplasien sowohl diploide als auch aneuploide Zellkerne nach. Eine erhöhte Aktivität von p53 und erbB-2 konnte in mehreren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden (6,36,86,87,132,147).

Im Bezug auf Cyclin B1, cdc2, TGF-R-alpha und bcl-2 wurden vergleichbare Reaktionen wie bei den dukталen Hyperplasien festgestellt (73,106,132).

1.5 Nicht invasive Mammakarzinome

1.5.1 Das duktales Karzinoma in situ

Die duktales Karzinoma in situ wachsen langsam in den Milchgängen der Brust und stellen eine gemischte Gruppe von Tumoren dar, die sowohl histopathologisch als auch in ihrem klinisch-prognostischen Verhalten große Unterschiede aufweist (81,107). Dies wird auch durch die unterschiedlichen Klassifikationen der duktales Karzinoma in situ deutlich.

Die Nottingham-Klassifikation unterscheidet in Comedo-DCIS, DCIS mit Nekrosen und DCIS ohne Nekrosen (111). Die Van-Nuys-Klassifikation unterteilt in:

1. Non high grade ohne Nekrosen
2. Non high grade mit Nekrosen
3. High grade mit / ohne Nekrosen (128).

Daraus wurde ein prognostischer Index für therapeutische Empfehlungen des DCIS entwickelt (129), der die Karzinome in einen Scorewert von 1-3 unterteilt, in Abhängigkeit von der Größe in mm, der Breite der tumorfreen Ränder in mm und der pathologischen Klassifikation nach van Nuys.

Die Bedeutung immunhistochemischer Marker für die Progression von DCIS wurde mit dem Ergebnis einer weitgehenden Korrelation zur Kernentwicklung und histologischer Ausprägung untersucht. Zum einen ergaben sich Marker, die in allen Formen des DCIS auftraten, hier sind Cyclin D1 und pRb zu erwähnen (4,54,147). Bei den DCIS mit hohen IHC-Scorewerten wurde eine vermehrte Expression von p53, erbB-2, erbB-3 und EGFR nachgewiesen (3,22,97,98,102,115,122,144). Im Gegensatz dazu wiesen Tumore mit hohen IHC-Scorewerten eine Verringerung von ER, pS2, PR, bcl-2 und E-Cadherin auf, die bei Tumoren mit niedrigen IHC-Scorewerten deutlich ausgeprägt waren (23,56,65,110,113).

Auf chromosomaler Ebene wurden 6q, 9p, 11q, 13q, 16q, 17p und 17q als vermutlich an der DCIS-Pathogenese beteiligte Regionen mehrfach bestätigt (52,116,137).

1.5.2 Lobuläre Neoplasien

Bei den lobulären Neoplasien sind die atypische lobuläre Hyperplasie (ALH) und das lobuläre Karzinoma in situ (LCIS) zu erwähnen, die als Indikatoren für invasive Tumoren gelten. Hierzu entwickelte Lakhani ein Progressionsmodell das ALH und LCIS in Beziehung zu invasiv lobulären und invasiv duktalem Karzinomen stellt und auch eine Verbindung zu den DCIS sieht (79).

1.6 Klinik

1.6.1 Lokalisation

Das Mammakarzinom äußert sich in zahlreichen Symptomen. Als verdächtiger Tastbefund sind am häufigsten derbe schmerzlose Knoten, die zu etwa 54% im oberen axillären Viertel der Brust auftreten. Etwa 15% werden im oberen parasternalen Viertel ertastet, 10% sind im unteren axillären Viertel und 5% im unteren parasternalen Viertel vertreten. Die restlichen 16% der Tastbefunde treten in der Brustwarzenregion auf (114).

Aber auch lokale Ödeme, Einziehungen der Brustwarze oder eine schmerzhaft sezernierende Mamille können erste Anzeichen sein.

Weitere klinische Symptome sind Einziehungen der Haut oder Unverschieblichkeit über einer Verhärtung, Orangenschalenhaut infolge eines Lymphödems und das Plateauphänomen.

1.6.2 Metastasierung

Die Metastasierung erfolgt lymphogen in den regionären Lymphknoten und häufig früh hämatogen. Der Lymphabfluss aus dem oberen äußeren Quadranten erfolgt hauptsächlich in die Achsellymphknoten und in die supraklavikulären Regionen. Aus den inneren Quadranten erfolgt der Lymphabfluss in die retrosternalen Lymphknoten. Mammakarzinome bis max. 2 cm Durchmesser haben in bis zu 60% der Fälle bereits histologisch nachweisbare Lymphknotenmetastasen (114).

1.6.3 Die internationale Klassifikation nach dem TNM-System

Die internationale Klassifikation nach dem TNM-System der UICC (International Union Against Cancer) dient zur Beschreibung eines bestimmten malignen

Tumors (145,146). Die mit p versehene pTNM-Klassifikation erfolgt postoperativ nach der histopathologischen Untersuchung, sie soll genaue Daten zur Abschätzung der Prognose und zur Auswertung der Behandlungsergebnisse liefern.

pT-Primärtumor

pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pTO	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ: intraduktales Karzinom oder lobuläres Carcinoma in situ oder Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
	Anmerkung: Der Morbus Paget kombiniert mit einem nachweisbaren Tumor wird entsprechend der Größe des Tumors klassifiziert.
pT1	Tumor max. Durchmesser < 2,0 cm a) max. Durchmesser < 0,5 cm b) max. Durchmesser > 0,5 bis 1 cm c) max. Durchmesser > 1,0 bis 2 cm
pT2	Tumor max. Durchmesser > 2,0 bis 5 cm
pT3	Tumor max. Durchmesser > 5,0 cm
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand und Haut
	Anmerkung: Die Brustwand schließt die Rippen, die Intercostalmuskeln und den vorderen Serratusmuskel mit ein, nicht aber die Pektoralismuskulatur a) mit Ausdehnung auf die Brustwand b) mit Ödem (einschließlich Apfelsinenhaut), Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust c) beide obigen Kriterien (T4a und T4b) d) entzündliches Karzinom

pN-Regionäre Lymphknoten (LK)

pNX	Keine LK-Beurteilung möglich.
pNO	Keine regionären LK-Metastasen.
pN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären LK. a) Nur Mikrometastasen (< 0.2 cm) b) Metastasen in LK, zumindest eine > 0,2 cm - Metastasen in 1-3 LK, >0,2 bis < 2 cm - Metastasen in > 4 LK, > 0,2 bis < 2 cm - Ausdehnung der Metastasen über die LK- Kapsel hinaus, max. Durchmesser < 2 cm

- Metastasen in LK. max. Durchmesser > 2 cm

pN2	Metastasen in ipsilateralen axillären LK, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
pN3	Metastasen in LK entlang der A. mammaria interna
pM-Fernmetastasen	
pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pMO	Keine Fernmetastasen
pMI	Fernmetastasen

Tab.1 TNM-System der UICC

1.6.4 Grading

Zur Beurteilung des Malignitätsgrades invasiver Mammakarzinome, die im Rahmen der Arbeit betrachtet wurden, hat sich ein histo- und zytomorphologisches Grading etabliert, das auf Bloom und Richardson basiert (21). Im Rahmen des Grading werden Tubulusbildung, Kernpleomorphie und die Mitoserate betrachtet, aus denen ein Score-Wert ermittelt wird. Dieser Wert führt zur Graduierung der Tumoren in:

G1	Gut differenziert
G2	Mäßig
G3	Schlecht

Daraus ergibt sich eine deutliche Korrelation zwischen Differenzierungsgrad des Karzinoms, der Frequenz von Rezidiven, dem Nodalstatus und der Mortalität (14,37,40,48,118,127,142).

1.7 Therapie und Prognose

Die aktuellen Therapiekonzepte basieren auf zwei lokalen und zwei systemischen Verfahren, die je nach Art und Stadium des Tumors kombiniert werden.

1.7.1 Chirurgie

Standard ist heute die brusterhaltende Therapie, bei der eine Tumorexstirpation im Gesunden und gleichzeitig eine gleichseitige Axilladissektion mit Entfernung von mindestens 10 Lymphknoten der Level 1 und 2 angestrebt wird. Entscheidend ist hier das Verhältnis zwischen der Brustgröße und dem Tumorumfang. Sollte die Entfernung des Tumors nur mit großer Defektbildung möglich sein, sollen Formveränderungen wie Reduktions- und Lappenplastiken erwogen werden. Ist die brusterhaltende Therapie nicht möglich, wird eine modifizierte radikale Mastektomie mit Axilladissektion durchgeführt, an die sich eine Sofort- oder Intervall-Brustrekonstruktion anschließt. Diese kann durch Einlage von Silikonimplantaten oder bei reduziertem Gewebeangebot durch die temporäre Einlage von Gewebeexpandern erfolgen, die dann eine permanente Implantation ermöglichen (41).

1.7.2 Strahlentherapie

In der Regel wird im Rahmen der brusterhaltenden Therapie eine homogene Hochvolttherapie der Brust ohne Einbeziehung der Lymphabflussgebiete mit einer Strahlendosis von ca. 56 Gy. oder eine Boost-Bestrahlung von 10 Gy. bei erfolgter homogener Basisbestrahlung mit 50 Gy.. Nach einer Mastektomie erfolgt nur dann eine Nachbestrahlung, wenn der Tumor nicht im Gesunden entfernt werden konnte oder eine Lymphangiosis der Haut vorliegt.

1.7.3 Pharmakotherapie

Die Auswahl der Pharmakotherapie erfolgt Tumor- und Patientenabhängig. Bei Mammakarzinomen ohne Fernmetastasen erfolgt zuerst die Zytostatikatherapie. In den letzten Jahren werden vor allem Taxane und anthrazyklinhaltige Therapieschemata verwendet.

1.7.4 Prognose

Für die prognostische Beurteilung des Tumors ist die Abschätzung des Malignitätsgrades Voraussetzung, der aufgrund von pathomorphologischen Daten zu ermitteln ist. Daraus ergibt sich die Beurteilung des prospektiven Krankheitsverlaufs mit Aussagen über die Chancen eines rezidivfreien Überlebens bzw. des Gesamtüberlebens.

Mit zunehmender TumorgroÙe sowie mit zunehmender Metastasierung und auch mit später Diagnosestellung sinkt die Überlebensrate (32).

1.8 Molekulargenetischer Hintergrund

Nur etwa 5% der Mammakarzinomfälle sind mit den derzeit bekannten familiär brustkrebs-prädisponierenden Genen verbunden.

Diese dominant vererbten prädisponierenden Gene sind auf den Chromosomen 13 und 17 zu finden. Sie kommen vermutlich durch eine Anhäufung von Defekten zustande, die Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert (9). Die bekanntesten sind das BRCA-1 Gen [breast cancer susceptibility gen], das auf dem Chromosom 17 in der Region q21 zu finden ist (51,77,148) und das BRCA-2 Gen, das auf dem Chromosom 13 lokalisiert ist. Dieses Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 13 in der Region q12-13. In seiner mutierten Form wurde dieses Gen auch bei Männern gefunden, die ein Mammakarzinom mit familiärer Vorgeschichte aufwiesen (16,45,77,80). TP 53 wurde auf dem Chromosom 17 entdeckt und ist auch für das Li-Fraumeni-Syndrom ursächlich (82,148).

1.9 Tumorprogressionsmodelle

Zur Zeit existieren zahlreiche Progressionsmodelle, die serielle, schrittweise, stufenweise und spontane Veränderungen beinhalten. Trotzdem bleibt die genaue Progression und Bedeutung der einzelnen Faktoren weiter unklar.

Allred beschrieb bereits 1993 für das Mammakarzinom ein stufenweises Progressionsmodell, das aber ohne nähere Zuordnung der beteiligten Faktoren bleibt (7).

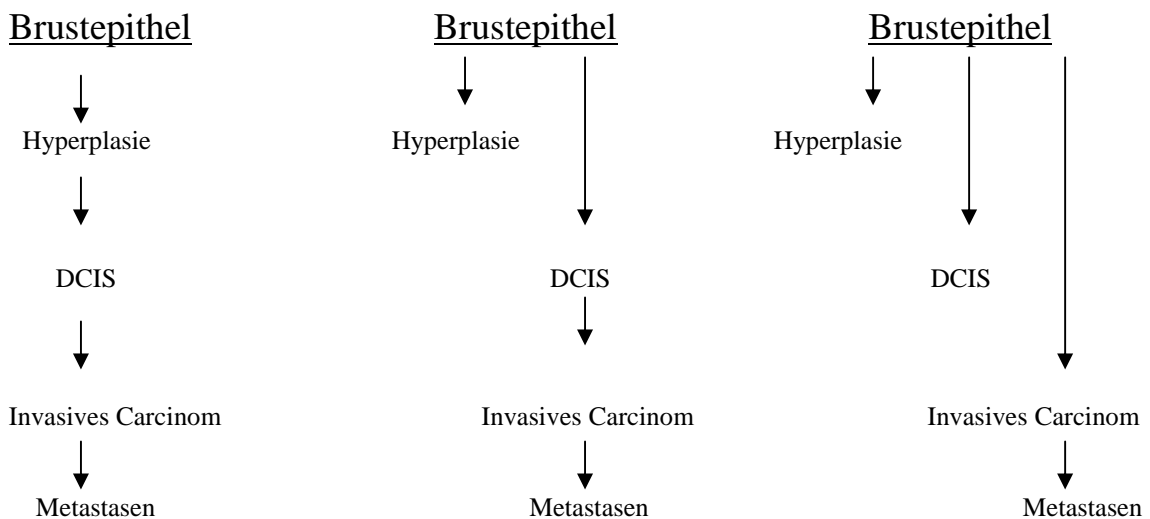


Abb.1 Stufenweises Progressionsmodell des Mammakarzinoms (7)

Ein von Beckmann et al. 1997 vorgeschlagenes Mammakarzinom-Progressionsmodell bezieht zwar einige Progressionsfaktoren mit ein, bleibt aber sehr allgemein (15).

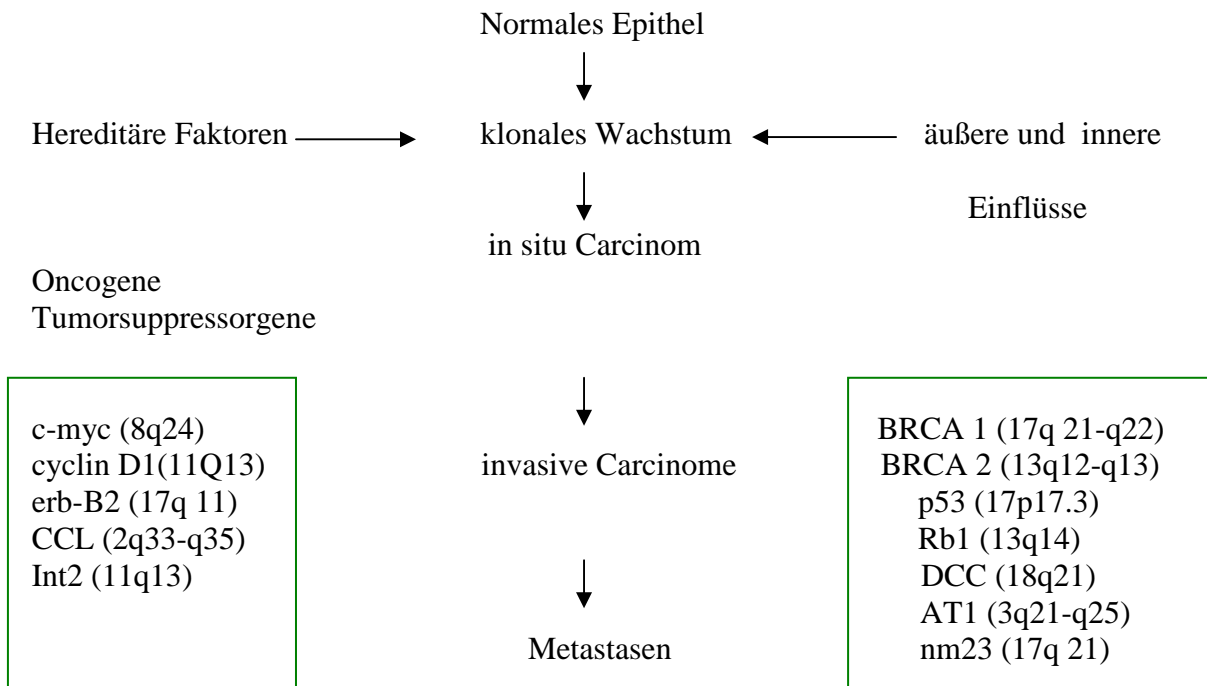


Abb.2 Progressionsmodell nach Beckmann (15)

Lakhani schlug 1999 ein Progressionsmodell unter Berücksichtigung der Kern-Veränderungen vor, das LCIS und ALH besonders mit einbezieht (79).

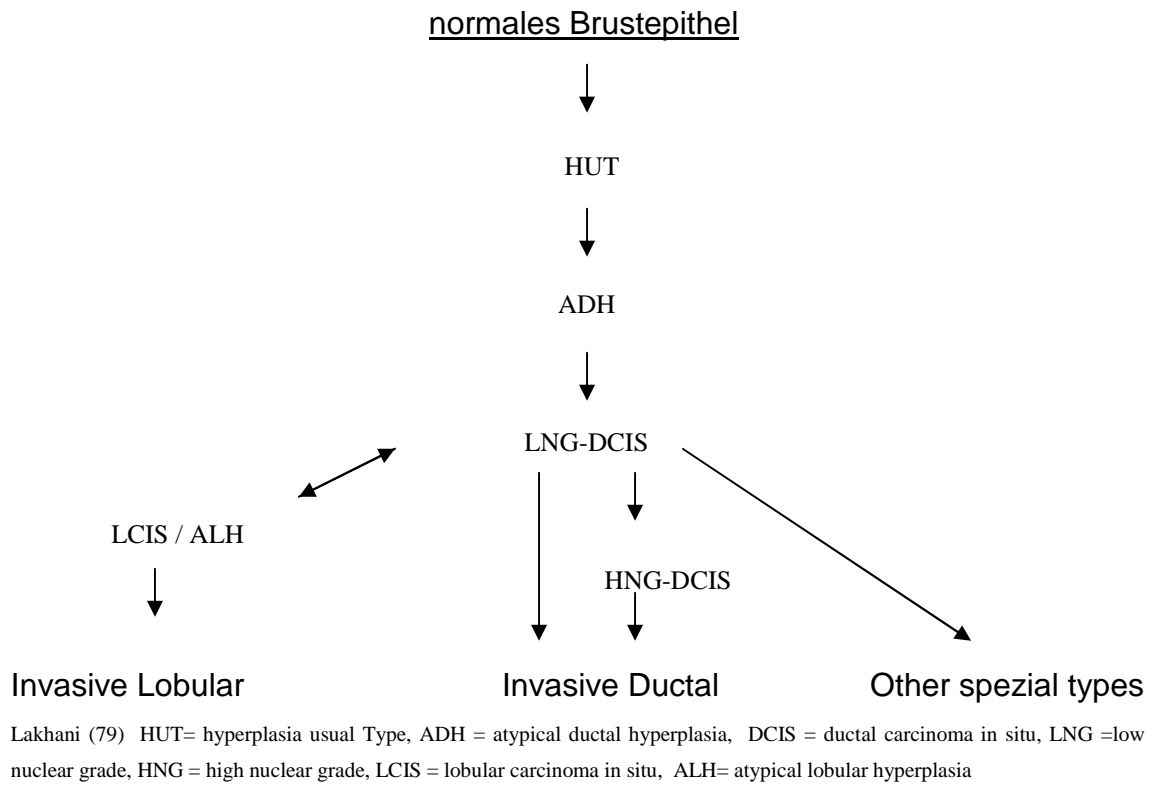


Abb.3 Progressionsmodell nach Lakhani (79)

Im Weiteren wurde versucht die Progression für bestimmte Tumorformen in Abhängigkeit von bekannten Markern zu unterteilen und für diese ein separates Progressionsmodell zu entwickeln. Hier ein Beispiel aus Korsching et al. (44):

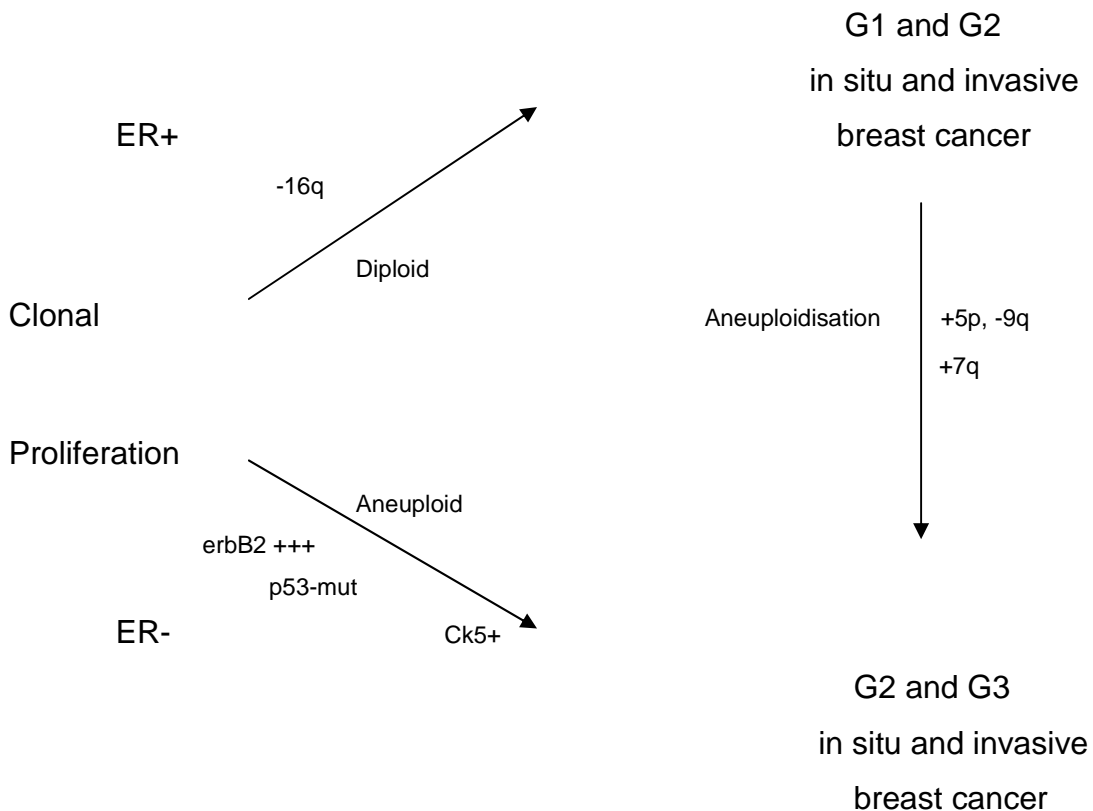


Abb.4 Progression Modell nach Korsching et al. (44).

Es wird angenommen, dass sich ER+ (Östrogenrezeptor+) Tumore vornehmlich bei Verlust von 16q zu G1- und G2-Karzinomen entwickeln, wo hingegen andere vornehmlich ER- Tumore sich zu G2- und G3-Karzinomen entwickeln, sich also stärker entdifferenzieren.

Dies verhält sich analog zu der Annahme, dass sich ein Tumor aus Brustepithel, zu einer Vorläuferläsion, zu einem Tumor in situ und dann zu einem invasiven Karzinom entwickelt.

Korsching et al. untersuchten solche G3-Karzinome, die in fast 70% der Fälle einen 16q Verlust aufwiesen sowie mit dem Verlust von 5p und 9q und dem Zugewinn von 7p eine sehr hohe zytogenetische Instabilität aufwiesen und potentiell als schlecht differenzierte Tumoren aus gut differenzierten Tumoren durch Entdifferenzierung entstanden sind.

1.10 Kandidaten Marker

Die Arbeitsgruppe Mammapathologie am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Universität Münster untersuchte Mammakarzinome mit dem Ziel die zugrundeliegenden Mechanismen der Progression Östrogenrezeptor-positiver Mammakarzinome zu entschlüsseln. Hierbei fanden sich die potenziellen Marker MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP, welche im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Korrelation mit den bereits bekannten Markern MIB-1, p53, erbB-2, CK5, EGFR sowie dem Östrogen- und dem Progesteronrezeptor untersucht werden sollen.

1.10.1 Metallothionine

Metallothionine sind niedermolekulare Proteine mit 6-7 kDa. Sie bestehen in etwa zu 30% aus Cystein-Resten und nicht aromatischen Aminosäuren. Bei Menschen wurden zehn Isoformen von Metallothioninen entdeckt, die auf dem Chromosom 11q13 angeordnet sind (152). Die entschlüsselten Proteine werden in vier Gruppen unterteilt: MT-1, MT-2, MT-3 und MT-4, die sich wiederum in MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H und MT-1x und MT-2a aufteilen. MT-3 tritt am häufigsten bei neuralem Gewebe auf (92,105,136).

Alle Metallothionine weisen eine charakteristische Abfolge von cys-x-cys, cys-x-y-cys und cys-cys Sequenzen auf, hierbei stehen x und y jeweils für nicht Cystein Amino-Säuren. Es wird angenommen, dass die mammilären MT's sieben bivalente Metallionen in zwei separaten Clustern binden (70).

Pro Molekül werden sieben Atome Cadmium und / oder Zink gebunden, die Proteinbildung wird durch andere Metalle, Hormone und Zytokine aktiviert, so dass das Protein vermehrt im Rahmen einer allgemeinen Stressantwort gebildet wird (88). In der Brust scheinen jedoch die Zink-Metallothionine eine vorherrschende Stellung einzunehmen (140).

1.10.2 Der CXCR4 Chemokinrezeptor

CXCR4 ist einer der Rezeptoren für Chemokine. Als Chemokine bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine, die von zahlreichen Zelltypen, u.a. von Phagozyten und dendritischen Zellen, aber auch von Gewebezellen sezerniert werden können. Chemokine können Leukozyten anlocken und aktivieren, sie spielen daher eine entscheidende Rolle als Mediatoren bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung und der dadurch ausgelösten Entzündungsprozesse. Die Einwanderung der Leukozyten in ein Entzündungsgebiet wird durch Chemokin-Gradienten im Gewebe gelenkt. Weiterhin greifen Chemokine direkt in die Adhäsionsvorgänge am Endothel ein und fördern somit die transendotheliale Migration der Leukozyten. CXCR4 ist der einzige Rezeptor für SDF-1. SDF-1 ist der chemotaktische Regulator der menschlichen Stammzellchemotaxis (121).

1.10.3 X-IAP und IAP-2

X-IAP und IAP-2 gehören zur IAP-Familie, die zusammen mit der Bcl-2-Familie die wichtigsten intrazellulären Regulatoren der Apoptose darstellt.

Die IAP (inhibitor of apoptosis)-Familie hemmt die Apoptose auf zwei verschiedene Arten. Zum einen bindet sie an Procaspasen, und verhindert so deren Aktivierung. Zum anderen bindet sie an Caspasen und hemmt ihre Aktivität (2). X-IAP und IAP-2 sind direkt an der Hemmung der Caspase 3, der Caspase 7 sowie der Procaspase 9 beteiligt (42). Für IAP-2 ist bekannt, dass es in die Signaltransduktion von membranständigen Rezeptoren, beispielsweise dem TNF-Rezeptor 2 (TNFR2)-Komplex, involviert ist (94). Diese Proteinfamilie ist zu einem interessanten onkologischen Untersuchungsobjekt geworden, da Tumorzellen mit der Hilfe der Apoptose-Inhibierung ihre Vitalität so steigern, dass sie gegenüber immunologischen und zytotoxischen Therapien resistent werden (151).

1.11 Fragestellung der Arbeit:

Östrogenrezeptorpositive, invasive Mammakarzinome gelten im Allgemeinen als prognostisch günstige Tumore. Dies liegt nicht zuletzt an der Möglichkeit, diese höher differenzierten Tumore mit einer antihormonellen Begleittherapie zu behandeln. Einige dieser östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinome sind jedoch sehr schlecht differenziert und weisen eine deutlich schlechtere Prognose auf. Ähnlich den unterschiedlichen Progressionsmodellen liegt auch dieser Progressionsvorgang samt seiner genetischen Abfolge im Dunkeln.

Korsching et al. charakterisierten eine Untergruppe dieser östrogenrezeptorpositiven invasiv-duktalem Mammakarzinome des Grades 3, die in Verbindung mit einer schwachen Expression von erbB-2, p53 und EGFR eine hohe Proliferationsrate sowie eine hohe zytogenetische Instabilität aufwiesen (44).

Basierend auf Voruntersuchungen von Helms et al. konnte eine Reihe von Markern gefunden werden, welche eine mögliche Bedeutung in der Progression östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome haben. Speziell fanden sich die potenziellen Marker MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Korrelation mit den bereits bekannten Markern MIB-1, p53, erbB-2, CK5, EGFR sowie dem Östrogen- und dem Progesteron-Rezeptor untersucht werden sollen.

2. Material und Methode

Analyse der Expression von MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP

Die Analyse der Expression von MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP für invasive Mammakarzinome erfolgte mit der Tissue Microarray Technik.

2.1.1 Grundlagen der Tissue Microarray Technik

Die Tissue Microarray Technik basiert auf dem von Hector Battifora 1986 beschriebenen „Multitumor Gewebeblock“, welcher noch wesentlich größere und unstrukturiertere Gewebeproben als die heutigen TMA-Blöcke enthält.

Durch den Einsatz eines Stanzgerätes von Beecher Instruments konnte eine größere Probenanzahl präziser in einen Paraffinblock eingebracht und somit ein genormtes Probenraster aus zylindrischen Stanzen erstellt werden. Dies ermöglichte theoretisch einen einzigen Tumor 90.000 Analysen zu unterziehen (27,135).

Die Erstellung eines Tissue Microarrays läuft wie folgt ab:

Bei den zu untersuchenden Paraffinblöcken wird das zu stanzende Areal mittels eines Hämatoxilin-Eosin Schnittes bestimmt und markiert. Diese Paraffinblöcke werden „donor“ (dt.: Geber) genannt. Mittels des Stanzgerätes, das aus zwei dünnwandigen Hohladeln und einem Stempel besteht, wird zunächst aus einem neuen und leeren Paraffinblock, „recipient“ (dt.: Empfänger), Paraffin entnommen. Dieses Paraffin wird aus der Stanze mittels des Stempels entfernt und verworfen. Dann wird mittels der zweiten, etwas dünneren Nadel aus den markierten Arealen des Geberblocks eine Probe entnommen und mittels des Stempels im Hohlraum des Empfängerblocks platziert. Im Laufe der Zeit konnten die Probendurchmesser von anfänglich 3 mm auf 0,6 mm gesenkt werden, da sich herausstellte, dass Stanzen von 0,6 mm Durchmesser ausreichend sind, um die morphologischen Eigenschaften des Gewebes beurteilen zu können (64). Zur Beurteilung der Gewebe können nicht nur klassische Färbungen wie Hämatoxilin-Eosin, sondern auch die modernen

Analyseverfahren wie die in situ Fluoreszenz Hybridisation, die in situ RNA Hybridisation oder die Immunohistochemie zum Einsatz kommen. Neben der Vielzahl von Testmöglichkeiten eines einzelnen Tumors ermöglicht dies auch einen standardisierten Vergleich vieler Tumoren unter identischen Färbe- und Test-Bedingungen, der zudem sehr wirtschaftlich ist (27,71,76).

2.1.2 Die Erstellung des Tissue Microarrays

Zur Untersuchung der Korrelation von MT3, X-IAP, IAP-2 und CXCR4 mit den bekannten Progressionsmarkern Mib-1, p53, erbB-2, CK5, EGFR, Östrogenrezeptor und dem Progesteronrezeptor wurde ein Tissue Microarray mit Biopsien von 144 invasiven Mammakarzinomen erstellt. Hierfür wurden aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Münster Gewebeproben invasiver Mammakarzinome ausgewählt. Diese Gewebeproben waren bereits gemäß den Standardverfahren des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie in gepuffertem vierprozentigem Formaldehyd fixiert und dann in Paraffin eingebettet worden. Aus diesem Tumorkollektiv wurden die für die Konstruktion des Tissue Microarrays interessanten Tumorareale wie folgt ermittelt:

Von jeder Gewebeprobe wurde, falls dies noch nicht im Rahmen der Voruntersuchung am Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie geschehen ist, ein in Hämatoxylin-Eosin gefärbtes Schnittpräparat angefertigt. Diese Schnitte wurden anschließend durch Prof. Dr. med. H. Bürger lichtmikroskopisch untersucht. Hierbei markierte er die für die Untersuchung interessanten Tumorareale aus der infiltrativen Front des Mammakarzinoms. Die markierten Schnitte wurden als Schablone über den Geberblock gelegt und so wurde das zu stanzende Areal markiert. Aus den Geberblocks wurden mittels der Stanze der Firma Beecher Instruments (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, Maryland, USA) Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm entnommen. Hierzu dienen die beiden Hohladeln des Edelstahl-instruments. Mit der ersten wird aus dem Empfängerblock Paraffin gestanzt,

welches verworfen wird, dann wird mit der zweiten Nadel aus dem Geberblock Tumormaterial entnommen und in das zuvor gestanzte Loch im Empfängerblock positioniert. Um anschließend an die immunhistochemische Untersuchung die Gewebezyylinder den Ergebnissen zuordnen zu können, wurde eine Datenmaske erstellt, nach der die Gewebezyylinder auf dem Tissue-Microarray den Geberblöcken und den Ergebnissen eindeutig zugeordnet werden konnten. Anschließend erfolgte eine Aufteilung in die Blöcke römisch I und römisch II. Diese Blöcke bestehen jeweils aus zehn Reihen die aus jeweils zehn, bzw. einmal aus vier, Gewebezyindern im Abstand von einem mm bestehen. Den Reihen wurden vertikal die Buchstaben a-j zugeordnet und in diesen Reihen wurden die Gewebezyylinder horizontal mit den Zahlen 1-10 markiert. Anschließend konnte eine Zuordnung nach dem Schema Block (I - II), Reihe (a-j), Gewebezyylinder (1-10) vorgenommen werden. Diese Zuordnung wurde in einer Excel Tabelle mit den Daten der Journalnummern verbunden. Dies ermöglichte eine schnelle und übersichtliche Bearbeitung, wie das folgende Schema veranschaulicht.

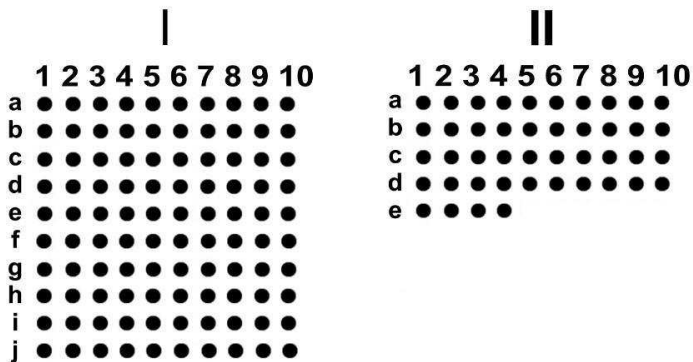
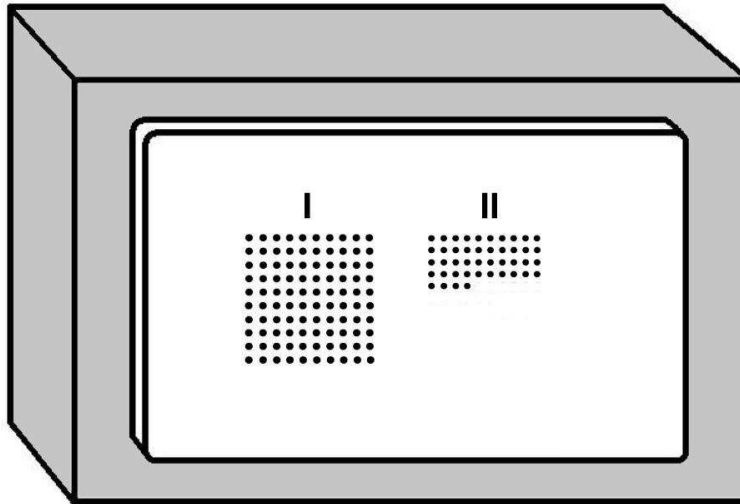


Abb.5 TMA Modell

Die erforderliche Genauigkeit dieser Zusammenstellung wurde durch eine Präzisionssteuerung erreicht, die die Platzierung und die Abstände zwischen den Gewebezylindern genau überprüft. Im Anschluss an die Entnahme und Zusammenstellung der Gewebezylinder wurde der neue Block mit Paraffin abgedeckt und auf 50°C erwärmt. Durch diese Erwärmung wird eine Homogenisierung des neuen Blocks erreicht. Von diesem neuen Tissue Microarray können nun mit einem Mikrotom zahlreiche Schnitte angefertigt werden, die für die nun folgende immunhistologische Untersuchung erforderlich sind.

2.2 Immunhistochemische Untersuchung

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden mittels eines Mikrotoms 4µm dicke Schnitte angefertigt.

Die Expression von MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP wurde mit den bekannten Markern Mib-1, p53, erbB-2, ck5, EGFR, sowie dem Östrogen- und dem Progesteron-Rezeptor verglichen.

Hierzu dient mit Ausnahme von Mib-1 die APAAP- (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) Methode. Hierbei machen mehrere Antikörper durch eine Antigen-Antikörperreaktion die Marker im Gewebe sichtbar.

Zur Bestimmung vom Mib-1 diente die LSAB/AP-Methode (LSAB = labeled streptavidin biotin –alkaline phosphatase). Bei dieser Methode wird die Affinität von Streptavidin, einem Glykoprotein des Bakteriums *Streptomyces avidinii*, zu Biotin, dem wasserlöslichen Vitamin H, ausgenutzt.

2.2.1 Immunhistochemisches Färbeprotokoll für MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP

I. Anfertigung der Objektträger:

Nach Kühlung der TMA-Blöcke wurden 4µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom erstellt und im Wasserbad auf Objektträger gegeben. Diese wurden in einem Trockenschrank bei konstanten 60°C über Nacht getrocknet.

II. Beschichtung mit Poly-L-Lysin

1. eintauchen in 0,25 M NH₄-AC-Lösung
2. trocknen bei konstant 60°C, über Nacht
3. inkubieren in 50mg/ml Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur für 30min
4. trocknen bei Raumtemperatur, über Nacht

III. Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol und Rehydrierung mit Alkohol

1. inkubieren für 2 x 10 min mit Xylol
2. inkubieren für 2 x 5 min in 99% Alkohol
3. inkubieren für 1 x 5 min in 96% Alkohol
4. inkubieren für 1 x 5 min in 80% Alkohol
5. inkubieren für 1 x 5 min in 70% Alkohol
6. zweimal spülen mit Aqua destilata

IV. Vorbehandlung zur Antigendemaskierung

1. inkubieren für 10 min im Autoklaven mit Citratpuffer bei pH 6,0
2. bei Raumtemperatur abkühlen lassen
3. spülen mit Puffer

V. Färbung nach der APAAP-Methode

1. blockieren der endogenen Peroxidase mit 1,5% Wasserstoffperoxid für 15 min
2. inkubieren mit den Primärantikörpern für 45 min bei 20°C
3. Spülung mit Tris-Puffer
4. Sekundärer Antikörper (Brückenantikörper) :

Inkubation in einer Lösung der Antikörper, in RPMI und Humanserum, für 30 min.

5. Spülung mit Tris-Puffer

6. APAAP Komplex

Inkubation für 60 min im APAAP- Komplex

7. Spülung mit Tris-Puffer

8. Chromogen – Substratlösung

In Neofuchsin -Lösung für 30 min auf dem Rüttler

9. Spülung mit Trispuffer

10. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 2 min

11. fünfminütiges Wässern zum Bläuen

VI. Wässriges Eindecken aus frischem Aqua destilata mit Kaiser's Glycerin Gelatine

Aufstellung der verwendeten Antikörper:

MT3 (Metallothionin) Monoclonaler Antikörper der Firma R&D Systems.

CXCR4 Monoclonaler Maus-Antikörper der Firma R&D Systems.

IAP-2 Polyclonaler Kaninchen-Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology.

X-IAP Monoclonaler Maus IgG1 Antikörper der Firma BD Biosciences.

Verdünnung in RPMI-Lösung :

MT3 1: 50.000

CXCR4 1: 50

IAP-2 1: 200

X-IAP 1: 50

2.2.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll für Mib-1 nach der LSAB/AP-Methode

I. Anfertigung der Objektträger:

Nach Kühlung der TMA-Blöcke wurden 4µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom erstellt und im Wasserbad auf Objektträger gegeben. Diese wurden in einem Trockenschrank bei konstanten 60°C über Nacht getrocknet.

II. Beschichtung mit Poly-L-Lysin

1. eintauchen in 0,25 M NH₄-AC-Lösung
2. trocknen bei konstant 60°C, über Nacht
3. inkubieren in 50 mg/ml Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur für 30 min
4. trocknen bei Raumtemperatur, über Nacht

III. Entparaffinierung der Schnitte mit Xylol und Rehydrierung mit Alkohol

1. inkubieren für 2 x 10 min mit Xylol
2. inkubieren für 2 x 5 min in 99% Alkohol
3. inkubieren für 1 x 5 min in 96% Alkohol
4. inkubieren für 1 x 5 min in 80% Alkohol
5. inkubieren für 1 x 5 min in 70% Alkohol
6. zweimal spülen mit Aqua destilata

IV. Vorbehandlung zur Antigendemaskierung

1. inkubieren für 30 min im Autoklaven mit Citratpuffer bei pH 6,0
2. bei Raumtemperatur abkühlen lassen
3. spülen mit Puffer

V. Färbung nach der LSAB/AP-Methode

1. Inkubation mit dem Primärantikörper bei 20°C für 25 min
Verwendeter Antikörper: Klon Mib-1 von Dako, monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane Antigen Ki 67 in der Verdünnung 1:100 mit der Antibody Diluent Dako Real TM Lösung der Firma Dako aus Dänemark
2. Spülung mit Waschpuffer DCS Labline
3. Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper
 1. Link-AP für 20 min
 2. 3 mal spülen mit Waschpuffer
 3. Streptavidin/AP für 20 min
4. 3 mal spülen mit dem Waschpuffer DCS Labline
5. Auftragen des Enzym-Substrat-/ Chromogengemisches
 1. Inkubation für 8 min
 2. Spülen
 3. Inkubation für 8 min
6. 3 mal spülen mit dem Waschpuffer DCS LabLine
7. Kerngegenfärbung nach Mayer für 10 sec. Mit anschließendem Bläuen unter Leitungswasser für 5 min

VII. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol

VIII. Eindecken der Präparate aus dem Xylol heraus mit Vitro-Clud

IX. Trocknen der Schnitte bei 20°C

2.3 Auswertung:

Die Auswertung der Markerandidaten erfolgte semi-quantitativ durch Prof. Dr. H. Bürger und Dr. J. Packeisen, Facharzt für Pathologie des Klinikums Osnabrück.

Die Auswertung erfolgte nach den folgenden Schemata:

MT 3	1 = keine Färbung 2 = Färbungen in < 10% der Zellen 3 = Färbungen in > 10% und < 25% der Zellen 4 = Färbungen in > 25% der Zellen
X-IAP	1 = keine Färbung 2 = Färbungen in < 10% der Zellen 3 = Färbungen in > 10% und < 25% der Zellen 4 = Färbungen in > 25% der Zellen
IAP-2	1 = keine Färbung 2 = Färbungen in < 10% der Zellen 3 = Färbungen in > 10% und < 25% der Zellen 4 = Färbungen in > 25% der Zellen
CXCR4	1 = keine Färbung 2 = jede Färbung
Östrogenrezeptor	1 = keine Färbung 2 = jede Färbung
Progesteronrezeptor	1 = keine Färbung 2 = jede Färbung

Mib-1	<p>1 = keine Färbung</p> <p>2 = Färbungen in < 10% der Zellen</p> <p>3 = Färbungen in > 10% und < 25% der Zellen</p> <p>4 = Färbungen in > 25% der Zellen</p>
p53	<p>1 = keine Färbung</p> <p>2 = Färbungen in < 10% der Zellen</p> <p>3 = Färbungen in > 10% und < 25% der Zellen</p> <p>4 = Färbungen in > 25% der Zellen</p>
erbB-2	<p>1 = keine Färbung</p> <p>2 = Färbungen in < 10% der Zellen</p> <p>3 = Färbungen in > 10% und < 25% der Zellen</p> <p>4 = Färbungen in > 25% der Zellen</p>
EGFR	<p>1 = keine Färbung</p> <p>2 = Färbungen in < 10% der Zellen</p> <p>3 = Färbungen in > 10% und < 25% der Zellen</p> <p>4 = Färbungen in > 25% der Zellen</p>
CK 5/6	<p>1 = keine Färbung</p> <p>2 = jede Färbung</p>

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und die Korrelation der Marker untereinander erfolgte mit dem Programm SPSS 12.0 für Windows.

Für die Analyse der Korrelation wurde der Pearson Test verwandt. Für die Ermittlung der Korrelation und der Häufigkeit wurden die Variablen in 1 für Negativ und 2 für positiv umkodiert.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der Marker-Expression

Für die vier potentiellen Marker MT3, CXCR4, X-IAP und IAP-2 sowie für die bekannten Marker MIB-1, p53, erbB-2, CK5, EGFR, Östrogen- und Progesteronrezeptor wurde die Häufigkeit der Expression untersucht. Hierzu wurde das Auswertungsprogramm SPSS verwendet.

3.1.1 Expression vom Metallothionin (MT3)

In 39 Fällen wurde positiv auf das Metallothionin (MT3) getestet, 87 Fälle wurden negativ getestet und 18 waren nicht auswertbar .

MT3

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	87	60,4	69,0	69,0
	2	39	27,1	31,0	100,0
	Gesamt	126	87,5	100,0	
Fehlend	System	18	12,5		
Gesamt		144	100,0		

Tab.2 Häufigkeitstabellen für MT3

Hieraus ergibt sich eine Verteilung von 69% negativer Tumoren und 31% Metallothionin-positiver Tumore und somit eine leicht negative Verschiebung in unserem Tumorkollektiv.

3.1.2 Expression des Chemokinrezeptors CXCR4

62 Fälle konnten positiv auf den Chemokinrezeptor CXCR4 getestet werden, 55 Fälle wurden negativ getestet und 27 waren nicht auswertbar.

CXCR4

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	55	38,2	47,0	47,0
	2	62	43,1	53,0	100,0
	Gesamt	117	81,3	100,0	
Fehlend	System	27	18,8		
Gesamt		144	100,0		

Tab3 Häufigkeitstabelle für den Chemokinrezeptor CXCR4

Hieraus ergibt sich eine prozentuale Verteilung von 47% CXCR4 negativer Tumoren zu 53% positiven Tumoren, somit war die Expression des Chemokinrezeptor CXCR4 in unserem Tumorkollektiv etwa gleichmäßig verteilt.

3.1.3 Expression von X-IAP

In 78 Fällen wurde positiv auf X-IAP getestet, 47 der Fälle unseres Tumorkollektivs konnten negativ getestet werden und 19 unserer Fälle waren nicht auswertbar.

X-IAP

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	47	32,6	37,6	37,6
	2	78	54,2	62,4	100,0
	Gesamt	125	86,8	100,0	
Fehlend	System	19	13,2		
Gesamt		144	100,0		

Tab.4 Häufigkeitstabelle für XIAP

Somit waren 62,4% unseres Tumorkollektivs positiv für X-IAP und 37,6% negativ für das inhibitorisch antiapoptotische Protein X-IAP. In der Verteilung ist hier eine leichte Verschiebung zur Expression von X-IAP in unserem Tumorkollektiv gegeben.

3.1.4 Expression von IAP-2

Im Rahmen der Häufigkeitsauswertung für IAP-2 ergab sich in 121 Fällen ein positives Ergebnis, 2 Fälle wurden negativ getestet und 21 waren nicht auswertbar.

IAP-2

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	2	1,4	1,6	1,6
	2	121	84,0	98,4	100,0
	Gesamt	123	85,4	100,0	
Fehlend	System	21	14,6		
Gesamt		144	100,0		

Tab.5 Häufigkeitstabelle für IAP-2

Dies zeigt in unserem Tumorkollektiv eine deutliche Aktivität von IAP-2 in 98,4% aller Tumoren unseres Tumorkollektivs.

3.1.5 Expression von MIB-1

70 Fälle wurden in unsere Untersuchung positiv auf MIB-1 getestet, bei 58 Fällen unserer Untersuchung war das Ergebnis negativ und 16 unserer Fälle waren nicht auswertbar.

Mib-1

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	58	40,3	45,3	45,3
	2	70	48,6	54,7	100,0
	Gesamt	128	88,9	100,0	
Fehlend	System	16	11,1		
Gesamt		144	100,0		

Tab.6 Häufigkeitstabelle für MIB-1

Hier zeigt sich erneut eine etwa gleiche Verteilung der Expression von Mib-1 mit 45,3% negativen und 54,7% positiven Ergebnissen.

3.1.6 Expression von p53

In 13 Fällen der Tumoren konnten wir positiv auf p53 testen, bei 110 Fällen wurden negativ getestet, und 21 Fälle unseres Tumorkollektivs waren nicht auswertbar.

p53

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	110	76,4	89,4	89,4
	2	13	9,0	10,6	100,0
	Gesamt	123	85,4	100,0	
Fehlend	System	21	14,6		
Gesamt		144	100,0		

Tab.7 Häufigkeitstabelle für p53

Für das Protein p53 zeigte sich in unserem Tumorkollektiv ein deutlich negatives Testergebnis, 89,4% der Tumoren waren negativ und 10,6% konnten positiv getestet werden.

3.1.7 Expresssion von erbB-2

In 61 Fällen wurden die Mammakarzinome positiv auf erbB-2 getestet, 47 Fälle wurden negativ getestet und 36 der Mammakarzinome in unserem Tumorkollektiv waren nicht auswertbar.

erbB-2

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	47	32,6	43,5	43,5
	2	61	42,4	56,5	100,0
	Gesamt	108	75,0	100,0	
Fehlend	System	36	25,0		
Gesamt		144	100,0		

Tab. 8 Häufigkeitstabelle für erbB-2

In unserem Tumorkollektiv ergab sich für erbB-2 mit 56,5% positiven und 43,5% negativen Befunden eine etwa gleiche Verteilung der Expression von erbB-2.

3.1.8 Expression von CK5

In 13 Fällen unseres Tumorkollektivs wurde positiv auf CK5 getestet, 89 Mammakarzinome wurden negativ getestet und bei 42 der Tumoren war eine Auswertung nicht möglich.

CK5

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	89	61,8	87,3	87,3
	2	13	9,0	12,7	100,0
	Gesamt	102	70,8	100,0	
Fehlend	System	42	29,2		
Gesamt		144	100,0		

Tab.9 Häufigkeitstabelle für CK5

Mit 87,3% negativer Tumore zeigte sich eine deutliche Tendenz der fehlenden Expression von CK5 in unserem Tumorkollektiv, nur 12,7% konnten positiv getestet werden. Zu berücksichtigen bleibt in diesem Fall jedoch, das mit 42 Fällen 29,2% der Tumoren nicht auswertbar waren.

3.1.9 Expression von EGFR

Bei 52 Fällen unserer Mammakarzinome wurde positiv auf EGFR getestet, 59 der Fälle unseres Tumorkollektivs wurden negativ getestet und 33 der Tumoren waren nicht auswertbar.

EGFR

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	59	41,0	53,2	53,2
	2	52	36,1	46,8	100,0
	Gesamt	111	77,1	100,0	
Fehlend	System	33	22,9		
Gesamt		144	100,0		

Tab. 10 Häufigkeitstabelle EGFR

Daraus ergeben sich 53,2% auf EGFR negativ getestete Mammakarzinome, denen in unserem Tumorkollektiv, 46,8% positive Mammakarzinome, gegenüberstehen. Somit ist eine etwa gleiche Verteilung der Expression anzunehmen.

3.1.10 Expression des Östrogenrezeptors

64 Fälle unseres Tumorkollektivs wurden positiv auf den Östrogenrezeptor getestet, 48 Fälle wurden östrogenrezeptor-negativ getestet und 33 der Tumore waren nicht auswertbar.

ER

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
1	48	33,4	42,9	42,9
2	64	44,4	57,1	100,0
Gesamt	112	77,8	100,0	
Fehlend System	32	22,2		
Gesamt	144	100,0		

Tab.11 Häufigkeitstabelle zur Expression des Östrogenrezeptors

Damit war die Expression des Östrogenrezeptors bei den Mammakarzinomen unseres Tumorkollektivs etwa gleich verteilt.

3.1.11 Expression des Progesteronrezeptors

Bei 42 Mammakarzinomen wurde positiv auf den Progesteronrezeptor getestet, 64 der Mammakarzinome wurden negativ getestet und 38 der Tumore unseres Tumorkollektivs waren nicht auswertbar.

PR

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	1	64	44,4	60,4	60,4
	2	42	29,2	39,6	100,0
	Gesamt	106	73,6	100,0	
Fehlend	System	38	26,4		
Gesamt		144	100,0		

Tab.12 Expression des Progesteronrezeptors

Mit 60,4% Progesteronrezeptor-negativen Mammakarzinomen und 39,6% positiven Tumoren unseres Tumorkollektivs überwogen hier leicht die negativen.

3.2 Korrelation der potentiellen Marker zu den bekannten Markern

3.2.1 Korrelation zu MT3

Bei der Korrelation des Metallothionins MT3 ergab sich eine eindeutige Signifikanz nur zu CK 5 mit 0,009 unterhalb der für eine Signifikanz geforderten 0,05.

Marker	Korrelation nach Pearson	Signifikanz (2-seitig)	N
Mib-1	0,132	0,148	122
P53	0,107	0,265	111
erbB-2	0,006	0,953	100
CK 5	0,267	0,009	95
EGFR	0,061	0,537	104
ER	0,069	0,486	104
PR	0,115	0,249	102

Tab.13 Korrelation zu MT3

3.2.2 Korrelation zum Chemokinrezeptor CXCR4

Mib-1 erfüllte mit 0,037 den Wert für eine signifikante Korrelation zu CXCR4. Auch EGFR erfüllte mit 0,043 den Wert für eine statistisch signifikante Korrelation zu CXCR4.

Marker	Korrelation nach Pearson	Signifikanz (2-seitig)	N
Mib-1	0,198	0,037	111
P53	0,014	0,886	102
erbB-2	0,064	0,543	92
CK 5	0,145	0,175	89
EGFR	0,207	0,043	96
ER	0,159	0,122	96
PR	0,088	0,398	94

Tab 14 . Korrelation zu CXCR4

3.2.3 Korrelation zu IAP-2

Es ergab sich keine signifikante Korrelation zu IAP-2 .

Marker	Korrelation nach Pearson	Signifikanz (2-seitig)	N
Mib-1	0,151	0,104	118
P53	0,051	0,600	107
erbB-2	0,064	0,543	92
CK 5	0,060	0,569	93
EGFR	0,017	0,867	102
ER	0,119	0,230	103
PR	0,174	0,084	99

Tab.15 Korrelation zu IAP-2

3.2.4 Korrelation zu X-IAP

Für X-IAP konnte eine eindeutig signifikante Korrelation zu Mib-1 nachgewiesen werden. Für p53 konnte mit 0,039 eine statistisch signifikante Korrelation zu X-IAP nachgewiesen werden.

Marker	Korrelation nach Pearson	Signifikanz (2-seitig)	N
Mib-1	0,280	0,002	117
P53	0,198	0,039	109
erbB-2	0,059	0,567	98
CK 5	0,096	0,359	93
EGFR	0,017	0,867	102
ER	0,119	0,230	103
PR	0,174	0,084	99

Tab.16 Korrelation zu X-IAP

4. Diskussion

Das Mammakarzinom ist weltweit, und mit über 50.000 Neuerkrankungen pro Jahr auch in Deutschland, der häufigste maligne Tumor der Frau (120). Für die Therapie dieser sehr heterogenen Tumorgruppe ist es entscheidend, nicht nur die histologische Form zu kennen, hier unterscheidet die WHO 22 invasive Mammakarzinome sowie drei nicht invasive Mammakarzinome, sondern auch Aussagen über die Prognose und den zu erwartenden Therapieerfolg treffen zu können. Dies ist insbesondere wichtig, da die drei Säulen der Tumor-Therapie, die chirurgische Entfernung des Tumors, die Strahlentherapie und die Pharmakotherapie, in ihrer Art und Ausprägung, sowie in ihrer Reihenfolge, auf den speziellen Tumor des Patienten abgestimmt werden müssen.

Die für die Diagnostik angewandten bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Mammographie, Magnetresonanztomographie, Positronenemissionstomographie und Knochenszintigramm geben zwar Auskunft über Multifokalität und Multizentrität des Tumors, aber sie geben noch keinen Aufschluss über die Art des Tumors. Hier ist die histologische Aufbereitung von Stanzbiopsien, Vakuumbiopsien oder Operationspräparaten gefragt, die aber nur die Einteilung in die histologische Tumorform leisten kann. Für eine genaue Therapieplanung ist all dies jedoch immer noch nicht ausreichend.

Hier hat die Immunhistopathologie und die Molekulargenetik in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. So gehören heute die Erstellung eines Rezeptorstatus über das Immunoassay und die Bestimmung der Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie die immunhistologische Färbung auf den HER2/neu- Rezeptor zu den Standarddiagnostiken. Aber auch diese, nun sehr feine, Unterscheidungsmöglichkeit einer einzelnen Tumorform gibt immer noch keinen Aufschluss über die tatsächliche Progression eines einzelnen Tumors. So tauchen auch in bereits bestimmten Tumorgruppen immer wieder Untergruppen auf, die nicht in das Verhaltensmuster der Gesamtgruppe passen.

So differenzierten Korsching et al. vom Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Universität Münster (44) eine dieser Untergruppen. Die Arbeitsgruppe

untersuchte Östrogen-Rezeptor positive, invasive Mammakarzinome, die im Allgemeinen als prognostisch günstigere Tumoren gelten. Hier fanden sie einige sehr schlecht differenzierte Östrogen-Rezeptor positive Mammakarzinome, die eine deutlich schlechtere Prognose aufwiesen. Sie fanden für diese Untergruppe Östrogen-Rezeptor positiver, invasiv-duktales Mammakarzinome des Grades 3 eine hohe Proliferationsrate und eine hohe zytogenetische Instabilität in Verbindung mit einer schwachen Expression von erbB-2, p53 und EGFR.

Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte in weiteren molekularen Untersuchungen solche Karzinome mit dem Ziel, die zugrundeliegenden Mechanismen der Entdifferenzierung zu entschlüsseln. Sie fanden hierbei die potenziellen Marker MT3, CXCR4, IAP-2 und X-IAP, die im Rahmen dieser Arbeit mit den bereits bekannten Markern MIB-1, p53, erbB-2, CK5, EGFR sowie dem Östrogen- und dem Progesteron-Rezeptor untersucht und korreliert wurden.

Hierzu wurde ein Tissue Mikroarray mit 144 Biopsien invasiver Mammakarzinome, die aus dem Archiv des vom Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Universität Münster stammten, erstellt. Diese wurden dort bereits nach den Standardverfahren des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Münster in gepuffertem vierprozentigem Formaldehyd fixiert und dann in Paraffin eingebettet.

Für das Metallothionin 3 konnte im Rahmen dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zu den bekannten Markern Mib-1, p53, erbB-2, EGFR und den Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren hergestellt werden. Auffällig war jedoch, dass 69% der auswertbaren Fälle negativ waren. In der weiteren Auswertung zeigte sich eine signifikante Korrelation zu CK5 in diesem Tumorkollektiv.

Andere Arbeiten konnten in einigen Bereichen die Bedeutung der Metallothionine, die auf dem Chromosom 11q13 angeordnet sind, deutlich herausstellen (152). In fetalem Brustgewebe konnte bereits 1984 eine im Vergleich zur Erwachsenenbrust höhere Expression von Metallothionin

nachgewiesen werden (10). Bei gutartigen Tumoren wie Adenomen und Papillomen konnte eine Expression von Metallothioninen in der Brust ebenfalls nachgewiesen werden (19).

Bei in situ und bei invasiven lobulären Mammakarzinomen konnte eine schwache Expression nachgewiesen werden (19,126). Jedoch konnte bei duktalem Mammakarzinomen kein signifikantes Expressionsverhalten nachgewiesen werden (66,68,149,157).

Überexpression von MT1E und MT3 in Mammakarzinomen zeigte keinen Einfluss auf die Proliferationsrate des Tumors; für MT3 Überexpression konnte in einer Studie sogar ein geringeres Tumor-Zellwachstum nachgewiesen werden (57).

Zahlreiche Studien untersuchten auch den Einfluss von Metallothionin auf den Erfolg einer Chemotherapie, jedoch konnte nur für Ösophagus-, Urothel-, und kleinzellige Lungen-Karzinome eine leichte Verbesserung der Überlebensrate gezeigt werden (38,69,75,131).

Neuere Studien zeigen jedoch bei bestimmten Mammakarzinomen, die sich durch einen negativen Östrogenrezeptorstatus und negativen Lymphknotenbefall auszeichnen, dass die Expression von Metallothionin mit einer Abnahme der Gesamtüberlebensrate sowie mit einer Verkürzung der beschwerdefreien Intervalle einhergeht und somit die Expression von Metallothionin in dieser Untergruppe der Mammakarzinome eine deutliche Verschlechterung der Überlebenswahrscheinlichkeit für die Patienten bedeutet (50,55,58,66,149,157).

Für den Chemokinrezeptor CXCR4 konnte in unserem Tumorkollektiv eine etwa gleichwertige Verteilung mit 47% negativem und 53% positivem Rezeptorstatus ermittelt werden. Es konnte nur für Mib-1 und EGFR mit unter 0,05 eine signifikante Korrelation festgestellt werden.

Für die übrigen bekannten Marker p53, erbB-2 und den Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

In anderen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass, im Vergleich zu normalem Brustgewebe, Mammakarzinome stark CXCR4 exprimieren und dass dies auch bei den typischen Zielorganen ihrer Metastasierung der Fall ist. In den Fibroblasten der regionalen Lymphknoten, der Lunge und der Leber wurde eine erhöhte Aktivität des Liganden für CXCR4 (CXCL12) nachgewiesen (5,93). Im in-vivo-Versuch ergab sich bei einer Behandlung mit anti-CXCR4 Antikörpern eine Verringerung der Metastasenausbreitung in die bevorzugten Zielregionen der regionalen Lymphknoten, der Lunge, der Leber und des Knochenmarks (93). Es konnte gezeigt werden, dass eine sehr starke Expression des CXCR4-Rezeptors in Mammakarzinomen mit einer im Vergleich deutlich schlechteren Gesamtüberlebensrate verbunden war (83).

Ebenso wurde bei den etwa 30% aller Mammakarzinome, die eine starke Expression von Her2/neu aufwiesen, festgestellt, dass diese über die Blockierung des Abbaus von CXCR4 eine deutlich stärkere Expression von CXCR4 aufwiesen und dies ebenfalls mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate einher ging (83).

Auch bei Untersuchungen kleinerer Tumorgruppen konnte für Mammakarzinome mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus eine deutliche Korrelation zwischen starker Expression von CXCR4 und Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (123). Ähnliche Ergebnisse liegen auch aus Forschungsarbeiten an kleinzelligen Lungenkarzinomen vor, die hier eine CXCR4 induzierte Wanderung von Tumorzellen in das Knochenmark beschreiben (28,60,74).

Alles in allem lässt sich also festhalten, dass CXCR4 und sein Ligand CXCL12 als Schlüsselstelle in der Hämatopoese und der Migration von hämatopoetischen Zellen und besonders auch in der Angiogenese mit ihrer starken Expression in Lunge, Leber und Gehirn eine bedeutende Rolle in der Migration von Tumorzellen zu ihren bevorzugten Metastasierungsorten spielen (16,29,30). Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Stärke der Expression von CXCR4 in Zusammenhang mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen steht und somit ein wichtiger Hinweis für die Prognose ist.

CXCR4 stellt ebenfalls einen interessanten Ansatzpunkt für die Therapie von Patienten mit lymphknotenpositiven Mammakarzinomen dar (13,47,58,72). Diesem Ansatz folgend stellten Zhongxing Liang et al. 2007 eine mögliche Therapie zur Verhinderung der Metastasierung mittels einer miRNA, die gegen CXCR4 gerichtet war, vor (159).

Für X-IAP konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass 62,4% des Tumorkollektivs positiv und 37,6% negativ getestet wurden, es ergab sich eine mit 0,039 signifikante Korrelation zu p53 und mit 0,002 signifikante Korrelation zu Mib-1. Somit zeigt X-IAP in unserem Tumorkollektiv die stärkste Korrelation zu den bekannten Markern.

Dies zeigt die generell hohe Bedeutung von X-IAP als stärksten Vertreter der IAP (inhibitor of apoptosis)-Familie. X-IAP blockiert die Apoptose über die Bindung an die apoptosevermittelnden Caspasen. X-IAP greift hier direkt an den Caspasen 3, 7 und 9 an, und schafft es so, nicht nur den intrinsischen, sondern auch den extrinsischen Apoptoseweg zu blockieren (62,125).

Einige klinische Studien legen den Schluss nahe, dass eine hohe X-IAP Expression in deutlichem Zusammenhang mit Therapiemisserfolgen und einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit bei B-Zell-Lymphomen, bei der akuten myeloischen Leukämie von Kindern, bei der akuten myeloischen Leukämie von Erwachsenen sowie bei klarzelligen Nieren-Karzinomen steht (96,117,138,139).

Daraufhin wurden einige Medikamente entwickelt und getestet, die durch die Inaktivierung von X-IAP die Blockade der Caspasen 3, 7 und 9 aufhoben, somit den intrinsischen sowie den extrinsischen Apoptoseweg freigeben und in Verbindung mit Chemotherapeutika auch bisher resistente Tumoren auf die Therapie ansprechen ließen (24,104,125).

Auch für das Mammakarzinom gilt, dass die Effektivität aller Therapien abhängig davon ist, dass sich die Apoptose, also der gerichtete Zelltod, in den Tumorzellen aktivieren lässt. X-IAP verhindert auch hier die Apoptose, indem es die intrinsischen und extrinsischen Apoptosewege blockiert und somit die

Tumorzellen resistent gegen diese Therapien macht. Dies konnte in zahlreichen experimentellen Studien an in-vitro-Modellen menschlicher Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass die X-IAP-Expression deutlich mit der Resistenz gegen die Chemotherapie sowie die Strahlentherapie korreliert und dass die experimentelle Reduktion der X-IAP-Expression die Apoptoserate deutlich beschleunigte und die Zellresistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie deutlich erniedrigte (1,8,12,17,31,35,63, 85,90,119,124,143,156,158).

All dies stellt eindeutig die Bedeutung von X-IAP für die Therapie und Prognose des Mammakarzinoms heraus und vereinbart sich auch mit unseren Ergebnissen des Markers X-IAP für unser Tumorkollektiv.

Die Mammakarzinome unseres Tumorkollektivs wiesen zwar 98,4% der Fälle einen positiven Status IAP-2 auf, doch bestand zu keinem der untersuchten Marker eine signifikante Korrelation. IAP-2 reguliert im Vergleich zu X-IAP nur die Caspase 8. In der Literatur finden sich deshalb keine allein auf die Bedeutung von IAP-2 bezogenen Studien. Neben den Studien, die IAP-2 im Rahmen ihrer Untersuchungen an X-IAP mitbetrachteten, wurde IAP-2 nur im Zusammenhang mit der IAP Familie von Bharat et al. untersucht. Sie fanden heraus, dass Curcumin die Expression der Antiapoptoseproteine X-IAP, IAP-1, IAP-2 Bcl-2 und Bcl-xl unterdrückt. Bharat et al. konnten so an Labormäusen eine Reduzierung der Lungenmetastasen menschlicher Mammakarzinomzellen nachweisen (18). Eine andere Studie von Xufeng Chen et al. konnte für IAP-2 nur einen generellen Einfluss auf die Tumorapoptose in Verbindung mit IAP-1 nachweisen (155). So scheint IAP-2 kein spezifischer Tumormarker zu sein.

5. Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass die potentiellen, für die Progression Östrogen-Rezeptor-positiver Mammakarzinome postulierten Marker eine Reihe von signifikanten Assoziationen mit bereits bekannten Prognosemarkern wie p53 und Mib-1 aufweisen. Durch die gleichzeitig beobachtete Assoziation einzelner Marker, speziell von Metallothionin mit hoch-molekularen Zytokeratinen (Ck5), scheinen allerdings zumindest einzelne nicht spezifisch für schlecht-differenzierte, Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinome sondern auch in anderen Subgruppen der invasiv duktalem G3 Karzinome, wie z.B. dem basalen Mammakarzinom, von Bedeutung zu sein.

Eine Vielzahl von weiteren pathologischen und klinischen Studien wird in der Zukunft notwendig sein um einen genaueren Einblick in die Bedeutung neuer Prognosefaktoren zu gewinnen und damit in weiteren Schritten ein verbessertes klinisches Management in der Behandlung von Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom erreichen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Aggarwal B B, Shishodia S, Takada Y, et al. (2005) Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappa-B pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 11: 7490-7498
2. Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter (2004) *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage 2004 WILEY-VCH Kapitel 17.4
3. Albonico G, Querzoli P, Ferretti S, Rinaldi R, and Nenci I (1998) Biological profile of in situ breast cancer investigated by immunohistochemical technique. *Cancer Detect Prev*: 22 313 –318
4. Alle K M, Henshall S M, Field A S, and Sutherland R L (1998) Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 4: 847-854
5. Allinen M, Beroukhi R, Cai L et al. (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6: 17-32
6. Allred D C, O'Connell P, Fuqua S A and Osborne C K (1994) Immunohistochemical studies of early breast cancer evolution. *Breast cancer Res Treat* 32 : 13-18
7. Allred D C, O'Connell P und Fuqua S A (1993) Biomarkers in early breast neoplasia *J Cell Biochem Suppl* : 17G
8. Amantana A, London CA, Iversen PL, Devi GR. (2004) X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 3:699-707

9. Anderson DE (1992) Familial versus sporadic breast cancer. *Cancer* 70 :1740-1746
10. Andrews GK, Adamson ED, Gedamu L (1984) The ontogeny of expression of murine metallothionein : Comparison with the alpha-fetoprotein gene. *Dev Biol* 103:294-303
11. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (ed) in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (2002) Krebs in Deutschland – Häufigkeit und Trends 3. erweiterte , aktualisierte Ausgabe
12. Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ, Kaufmann SH. (2002) Synthetic Smac/ Diablo peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding X-IAP and cIAP1 in situ . *J Biol Chem* ; 277:44236-4444243
13. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM,(2002) Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 62(24):7203-7206
14. Bässler R, Böcker W, Hermanek Pet al(1992) Die gegenwärtige Situation des Gradings beim Mammakarzinom *Pathologie* 13:130-134
15. Beckmann M W, Niederacher D, Schnurch H G, Gusterson B A und Bender H G (1997) Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity *J Mol Med* 75:429-439
16. Beckmann MW, Niederacher D, Goecke T O (1996) Praktische Möglichkeiten der Beratung, genetischen Analyse und

Früherkennungsmaßnahmen für Hochrisikofamilien mit Mamma und Ovarialkarzinomen. Dt. Ärzteblatt

17. Berezovskaya O, Schimmer A D, Glinskii A B, et al. (2005) Increased expression of apoptosis inhibitor protein X-IAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 65 : 2378-2386
18. Bharat B, Aggarwal ,Shishir Shishodia, Yasunari Takada, et al. (2005) Curcumin Suppresses the Paclitaxel-Induced nuclear factor-KB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice . *Clin Cancer Res* (20) 7490-7498
19. Bier B, Douglas –Jonas A, Totsch M et al. (1994) Immunohistochemical demonstration of metallothionein in normal human breast tissue and benign and malignant breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 30:213-221
20. Blanks RG, Moss SM, Mc Gahan Ce, Quinn MJ, Babb PJ (2000) Effect of NHS breast cancer in Engand and Wales 1990 –8 comparison of observed with predicted mortality. *BMJ* 321(7262):665-669
21. Bloom HJG, Richardson WW (1957) Histologic grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 11:359-377
22. Bobrow L, Happerfield L C, Gregory W M and Millis R R (1995) Ductal carcinoma in situ assesment of necrosis and nuclear morphology and their association with biological markers. *J Pathol* 176: 333-341
23. Bobrow L G, Happerfield L C, Gregory W M, Springall R D and Millis R R (1994) The classification of ductal carcinoma in situ and its association with biological markers. *Semin. Diagn. Pathol*, 11: 199-207

24. Bockbrader KM, Tan M, Sun Y.(2005) A small molecule Smacmimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* ; 24:7381-7388
25. Böcker –Denk- Heitz- (1997) *Pathologie* Urban & Schwarzenberg S.121
26. Böcker W, Bier B, Freytag G, Brommelkamp B, Jarasch E D, Edel G, Dockhorn D B, and Schmidt K W (1992) An Immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins , alpha – smooth muscle actin, vimentin , collagen IV and laminin .Part II Epitheliosis and ductal carcinoma in situ . *Virchows Arch A Pathol Anat Histopatol*, 421 : 323-330
27. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G, (2001) Tissue microarray (TMA) technology : miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies *J Pathol* 195: 72-79
28. Burger M, Glodek A, Hartmann T, et al. (2003) Functional expression of CXCR4 on small cell Lung cancer cells mediates migration, integrin activation and adhesion to stromal cells. *Oncogene*. 22:8093-8101
29. Butcher EC, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M (1999) Lymphocyte trafficking and regional immunity . *Adv Immunol* 72:209-53
30. Campbell JJ, Butcher EC, (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*; 12(3):336-41
31. Cao C, Mu Y, Hallahan DE, Lu B.(2004) X-IAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. *Oncogene*; 23:7047-7052

32. Carter C L, Allen C, Henson De (1989) Relation of Tumor size Lymph node status and survival in 24740 breastcancer cases. *Cancer* 63:181-187
33. Chang –Claude J ,Eby N, Becker H (1994) Die Bedeutung genetischer Faktoren für die Entstehung von Brustkrebs Zentralbl Gynäkol 116:660-669
34. Chang-Claude J, Scherneck S (1995) Klonierung Klonierung des Brustkrebsgens BRCA 1 Dtsch Ärzteblatt 92:A2414-2418
35. Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ , Jakobs BS, Lindner DJ, Borden EC. (2004) Downregulation of Bcl-2,Flip or IAPS by siRNAs sensitizes resistant melanomacells to Apo2L/Trail –induced apoptosis. *Cell Death Differ* ;11:915-923
36. Chitemerere M, Andersen T I Holm R, Karlsen F, Berresen A L and Nesland J M (1996) TP53 alterations in atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast . *Breast Cancer Res Treat.*, 41 : 103 –109
37. Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Geninr J Rouesse J (1987) The importance of histologic grade in long term prognosis of breast cancer : A study of 1100 patients, uniformly treated at the Institut Gustave –Roussy . *J Clin Oncol* 5:1378-1386
38. Cree IA, Knight L, Di Ncolantonio F et al. (2002) Chemosensitization of solid tumors by modulation of resistance mechanisms . *Curr Opin Investig Drugs* 3: 634-640

39. Crissman J D, Visscher D W and Kubus J (1990) Image cytophotometric DNA analysis of atypical hyperplasias and intraductal carcinomas of the breast. Arch. Pathol. Lab. Med 114 : 1249-1253
40. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A et al., (1986) Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastases. Cancer 58:2662-2670
41. De Gruyter (2001), Pschyrembel, Therapeutisches Wörterbuch, 2. Auflage S.421
42. Devereaux Q L and Reed J C (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. Genes Dev 13, 239-252
43. Dietrich C U, Pandis N, Teixeira M R, Bardi G, Gerdes A M, Andersen J A and Heim S (2001) Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal growth. Cancer 90,1221-1228
44. E Korsching, J Packeisen, MW Helms, C Kersting, R Voss, PJ van Diest, B Brandt, E van der Wall, W Boecker and H Bürger. (2004) Deciphering a subgroup of breast carcinomas with putative progression of grade during carcinogenesis revealed by Comparative Genomic Hybridisation (CGH) and immunohistochemistry. Brit.J.of Cancer 90, 1422-1428
45. Easton DF ,Bishop DT, Ford D , Steel M (1994) The genetic epidemiology of BRCA –1 Lancet 344 : 761
46. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D, (2001) GLOBOCAN 2000 : Cancer incidence , mortality and prevalence worldwide ,Version 1.0. IARC Cancer Base No.5. IARC Press. URL: www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html.

47. Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klosel R, Gangju RK, (2004) Regulation of CXCR4 – mediated chemotaxis and Chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene*; 23(1):157-167
48. Fisher E, Redmond C, Fisher B (1980) Histologic grading of breast cancer . *Pathol Ann* 15:239-251
49. Fisher E R, Saas R, Fisher B, Wickerham L, Paik S M, (1986) Pathologic findings from the National surgical adjuvant breast project (Protocol 6) I. Intraductal carcinoma (Dcis) *Cancer* 57: 197-208
50. Fresno M, Wu W, Rodriguez JM , et al. (1993) Localization of metallothionein in breast carcinomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423: 215-219
51. Friedrichs K (1994) Genetische Aspekte des Mammakarzinoms. *Gynäkologe* 27:7-11
52. Fujii H, Szumel R, Marsh C, Zhou W and Gabrielson E (1996) Genetic progression, histological grade and allelic loss in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Res*, 56 5260-5265
53. Garcia M, Salazar R G, Pages A, Richer G, Domergue J, Pages A M Cavalie G, Martin J M, Lamarque J L, Pau B et al, (1986) Distribution of the Mr 52.000 estrogen-regulated protein in benign breast diseases and other tissues by immuohistochemistry *Cancer Res*, 46 3734-3738
54. Gillet C E, Lee A H, Millis R R, and Barnes D M, (1998) Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma in situ and atypical ductal Hyperplasia. *J Pathol*, 184: 396-400

55. Goulding H, Jasani B, Pereira H, et al.(1995) Metallothionein expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 72:968-972
56. Gupta S K, Douglas J A, Jasani B, Morgan J M, Pignatelli M and Mansel R E (1997) E-cadherin (E-cad) expression in duct carcinoma in situ (DCIS) of the breast . *Virchows Arch*, 430:23-28
57. Gurel V, Sens DA, Somji S, et al. (2003) Stable transfection and over-expression of methallothionein isoforms 3 inhibits the growth of MCF-7 and Hs578T cells but not that of T47D or MDA-MB 231 Cells . *Breast Cancer Res Treat* 80 :181-191
58. Haersley T, JacobsenGK, Zedeler K (1995) The prognostic significance of immunohistochemically detectable metallothionein in primary breast carcinomas. *APMIS* 103 : 279-285
59. Harris JR , Lippman ME Veronesi U, Willett (1992) Breast cancer (first of three parts) *N Engl J Med* 327:319-328
60. Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M. (2005) CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer cells. *Oncogene*; 24:4462-4471
61. Helzlsouer KJ (1994) Epidemiology,prevention, and erly detection of Breast cancer , *Current opinion in Oncology* 6:541-548
62. Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. (2001) XIAP apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*; 6:253-263

63. Holcik M, Yeh C, Korneluk RG, Chow T(2000)Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (X-IAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene* ;19: 4174-4177

64. Hoss, A, Cordon-Cardo, C (2001) Tissue Microarray Profiling of cancer Specimens and cell Lines : Opportunities and Limitations *Lab Invest* 81: 1331-8

65. Inaji H, Koyama H, Motomura K and Noguchi S (1996) Differential distribution of erbB-2 and pS2 proteins in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.*, 37:89-92

66. Ioachim E, Tsanou E, Briasoulis E, et al.(2003) Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. *Breast* 12: 111-119

67. Jin I, Fuchs A, Schnitt S J, Yao Y, Joseph A, Lamszus K, Park M, Goldberg I D and Rosen E M (1997) Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer* ,79 749-760

68. Jin R, Chow VT, Tan PH, et al. (2002) Metallothionein 2 A expression is associated with cell proliferation in breast cancer . *Carcinogenesis* 23:81-86

69. Joseph MG, Banerjee D, Kocha W, et al.(2001) Metallothionein expression in patients with small cell carcinoma of the Lung: correlation with other molecular markers and clinical outcome . *Cancer* 92 : 836-842

70. Kagi J H, Hunzinger P, (1989) Mamillianmetallothionein. *Biol Trace Elem Res* 21: 111-118

71. Kallioniemi O P, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001) Tissue microarray technology for highthroughput molecular profiling of cancer Hum Mol Genet 10:657-62
72. Kang H, Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG,(2005) The elevated level of CXCR4 is corellated with nodal metastasis of human breast cancer. Breast; 15(5) 360-367
73. Kawamoto H, Koizumi H and Uchikoshi T (1997) Expression of the G2-M checkpiont regulators Cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions : imminocytochemical and quantitative image analyses . Am J Pathol 150: 15-23
74. Kijima T, Maulik G, Ma PC, et al. (2002) Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. Cancer Res. 62:6304-6311
75. Kishi K, Doki Y, Miyata H, et al. (2002) Prediction of the response to Chemoradiation and prognosis in oesophageal squamous cancer. Br J Surg 89 : 597-565
76. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch M J, Sauter G, Kallioniemi O P (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens Nat Med 4:844-7
77. Krainer M, Zojer N, Huber H Mannhalter C (1995) Genetische Prädisposition für das Mammakarzinom : Übersicht über Molekulargenetischen Grundlagen einer lange bekannten epidemiologischen Beobachtung. Geburtsh Frauenheilk 55:M73 76

78. Lakhani S R, Slack D N, Hamoudi R A, Collins N, Stratton M R and Sloane J P,(1996) Detection of allelic imbalance indicates that a proportion of mammary hyperplasia of usual type are clonal, neoplastic proliferations. *Lab Invest.*, 74 129-135

79. Lakhani S R (1999) The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast *J Pathol* 187: 272-278

80. Langenbeck U (1995) Umwelt und Erbe in der Entstehung des Brustkrebses. *Dt – Ärzteblatt* 92 :c 1608 – 1611

81. Lenington W J, Jensen R A, Dalton L W ,Page D L (1994) Ductal carcinoma in situ of the breast . *Cancer* 73: 118-124

82. Li FP, Fraumeni J F, Mulvihill JJ et al (1988) A cancer family syndrom in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48: 5358-5362

83. Li Y M, Pan Y, Wei Y, et al. (2004) Upregulation of CXCR4 is essential for Her2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 459-469

84. Liapis H, Crouch E C, Grosso L E, Kitazawa S, and Wick M R (1993) Expression of parathyroidlike protein in normal proliferative and neoplastic human breast tissues . *Am J Pathol* 143: 1169 –1178

85. Lima RT, Martins LM, Guimaraes JE, Sambade C, Vasconcelos MH. (2004) Specific downregulation of bcl-2 and X-IAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*; 11:309-316

86. Lisboa B W, Vogtlander S, Gilster T., Riethdorf L., Milde L.K., and Loning T. (1997) Molecular and immunohistochemical analysis of p53

mutations in scrapings and tissue from preinvasive and invasive breast cancer. *Virchows Arch.*, 431 : 375-381

87. Lodato R F, Maguire-HC J, Greene M I, Weiner D B and Livolsi V A (1990) Immunohistochemical evaluation of c-erbB2 oncogene expression in ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia of the breast. *Mod. Pathol.*, 3. 449-454
88. Löffler Petrides, (2001) *Biochemie und Pathobiochemie* 5. Auflage Springer Verlag 22.2.11
89. Maass H (1994) Mammakarzinom : Epidemiologie . *Gynäkologe* 27:3-6
90. MC Manus DC, Lefebvre CA, Cherton-Horvat G, et al. (2004) Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics *Oncogene*; 23:8105-8117
91. Micale M A, Visscher D W ,Gulino S E and Wolman S R (1994) Chromosomal aneuploidy in proliferative breast disease. *Hum Pathol* ,25: 29 –35
92. Mididoddi S, Mc Guirt JP, Sens MA et al. (1996) Isoform –specific expression of metallothionein mRNA in the developing and adult human kidney . *Toxicol Lett* 85: 17-27
93. Müller A, Homey B, Soto H, et al. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56
94. Müller M (2004) Survivin und seine alternativen Spleißvarianten: Untersuchungen zu ihrer Bedeutung für eine Zytostatika-induzierte

Apoptose und ihren molekularen Interaktionspartnern, Dissertation,
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

95. Mulvihill JJ, Miller RW, Fraumenti JF (eds) (1977) Genetics of human of human cancer. Raven Press ,New York
96. Murriss JJ, Cillessen SA, Vos W, et al. (2005) Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. Blood;105:2916-2923
97. Naidu R, Yadav M, Nair S and Kutty K K (1998) Immunohistocamical analysis of p53 expression in primary breast carcinomas. Anticancer Res. 18: 65-70
98. Naidu R, Yadav M, Nair S and Kutty M K (1998) Expression of c-erbB-3 protein in primary breast carcinomas. Br J Cancer 78 1385-1390
99. National Cancer Institute (2002) SEER Cancer statistics review 1973-1999 . [http //www-seer.ims.nci.nih.gov](http://www-seer.ims.nci.nih.gov)
100. Noguchi S, Aihara T, Koyama H, Motomura K, Inaji H and Imaoka S (1995) Clonal analysis of benign and malignant human breast tumors by means of polsmerase chain reaktion . Cancer Lett., 90: 57-63
101. Noguchi S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, and Koyama H (1994) Clonal analysis of predominantly intraductal carcinoma and precancerous Leasions of the breast ba means of polymerase chain reaktion. Cancer Res., 54: 1849-1853
102. O`Mally F P, Vnencak-Jones C L, Dupont W D, Parl F, Manning S and Page D L (1994) p53 mutations are confined to the comedo type ductal

carcinoma in situ of the breast. Immunohistochemical and sequencing data .Lab Invest,71:67 –72

103. O'Connell P, Pekkel V Fuqua S A, Osborne C K ,Clark G M and Allred D C (1998) Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. J. Natl. Cancer Inst., 90: 697-703
104. Oost TK, Sun C, Armstrong RC, et al. (2004) Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein X-IAP for the treatment of cancer . J Med Chem; 47 : 4417-4426
105. Palmiter RD , Findley SD , Withmore TE et al, (1992) MT III ,a brainspecific member of the metallothionein gene family . Proc Natl. Acad SciUSA 89 6333-6337
106. Parham D M, and Jankowski J (1992) Transforming growth factor alpha in epithelial proliferative diseases of the breast. J clin. Pathol 45: 513-516
107. Patchefsky A S, Finkelstein S D, Schwartz G F, et al. (1989) Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast. Cancer 63: 731 741
108. Petrakis NL (1977) Genetic factors in the etiology of breast cancer. Cancer 39:2709-2715
109. Pharoah P D, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern R L, Easton D F (2002) And Ponder B A, Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention . Nat. Genet., 31 :33-36
110. Poller D N, Roberts E C, Bell J A, Elston C W, Blamey R W and Ellis I O (1993) p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. Hum. Pathol. 24: 463-468

111. Poller D N, Silverstein M J, Galea M et al (1994) Ductal carcinoma in situ of the breast: A proposal for a new simplified histological classification association between cellular proliferation and c-erb B-2 Protein expression. *Mod Pathol* 7: 257-262
112. Poller D N, Silverstein M J, Galea M, Locker A P, Elston C W, Blamey R W, and Ellis I O (1994) Ideas in pathology of Ductal carcinoma in situ of the breast : a proposal for a new simplified histological classification association between cellular proliferation and c-erbB-2 protein expression. *Pathol*, 8:255-260
113. Poller D N, Snead D R, Roberts E C, Galea M, Bell J A, Gilmour A, Elston C W, Blamey R W and Ellis I O (1993) Oestrogen receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: relationship to flow cytometric analysis of DNA and expression of the c-erbB-2 oncoprotein. *Br. J Cancer* ,68: 156 –161
114. Pschyrembel (2002) Seite: 1021
115. Quinn C M, Ostrowski J L, Harkins L, Rice A J and Loney D P (1998) Loss of bcl-2 expression in ductal carcinoma in situ of the breast relates to poor histological differentiation and to expression of p53 and c-erbB-2 proteins. *Histopathology* 33: 531 –536
116. Radford D M, Fair K L, Phillips N J, Ritter J H, Steinbrueck T, Holt M S and Donis K H (1995) Alleloyping of ductal carcinoma in situ of the breast: deletion of loci on 8p, 13q, 16q, 17p and 17q *Cancer Res.*, 55: 3399-3405
117. Ramp U, Krieg T, Caliskan E, et al. (2004) X-IAP expression is an independent prognostic marker in clear.cell renal carcinomas. *Jum Pathol*; 35:1022-1028

118. Rank F, Dombernowsky P, Jespersen NCB et al. (1987) Histologic malignancy grading of invasive ductal breast carcinoma. *Cancer* 60 : 1299-1305
119. Roa WH, Chen H, Fulton D, Gulavita S (2003) X-linked inhibitor regulating TRAIL –induced apoptosis in chemoresistant human primary glioblastoma cells. *Clin Invest Med*; 26:231-242
120. Robert-Koch –Institut Berlin (1995) Statistische Daten zur Krebsinzidenz. Robert Koch Institut
121. Rosu-Myles M, Gallacher L, Murdoch B, Hess D A, Keeney M, Kelvin D Dale L, Furguson S S, Wu D, Fellows Fand Bhatia M. (2000) The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14626-14631
122. Rudas M, Neumayer R, Gnant M F, Mittelbock M, Jakesz R, and Reiner A (1997) p53 protein expression , cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular in situ carcinomas of the breast. *Eur. J. Cancer* 33 : 39 – 44
123. Sang UK Woo, MD,PhD , Jeoung Won Bae, MD PhD, Chul Hwan Kim, MD PhD et al.(2007) A Significant Correlation between Nuclear CXCR4 Expression and Axillary Lymph Node Matastasis in Hormonal Rezeptor Negative Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology* DOI 10.1245/s10434-007-9595-1
124. Sasaki H, Sheng Y, Kotsuji F, Tsang BK. (2000) Down-regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res.*; 60:5659-5666

125. Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ (2006) Targeting X-IAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ* 13: 179-188
126. Schmid KW, Ellis IO, Gee JM, et al (1993) Presence and possible significance of immunocytochemically demonstrable metallothionein over-expression in primary invasive ductal carcinoma of the breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 422: 153-159
127. Schnürch HG, Ellerbrok, Bender HG, Beck I (1989) Vergleichende Untersuchung zum Prognoseverhalten von Grading und Morphometrie bei Mammakarzinomen. *Pathologe* 10:97 –102
128. Silverstein M J, Poller D N, Waisman J R et al (1995) Prognostic classification of breast ductal carcinoma in situ. *Lancet* 345. 1154-1157
129. Silverstein M J, Lagios M D, Craig P H et al (1996) A Prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 77 : 2267 -2274
130. Silverstein M J, Waisman I R, Gamagami P et al. (1990) Intraductal carcinoma of the breast (208 cases) clinical factors influencing treatment choice. *Cancer* 66:102-108
131. Siu LL, Banerjee D, Khurana RJ, et al. (1998) The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and Mib 1 in muscle invasive urothelial transitional cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4: 559-565
132. Siziopikou K P, Prioleau J E, Harris J R and Schnitt S J (1996) bcl-2 expression in the spectrum of preinvasive breast lesions. *Cancer* 77: 499-506
133. Sluyser M(ed) (1987) Growth factors and oncogenes in breast cancer. Ellis Horwood, Chichester (England)

134. Sneige N, Sahin A, Dinh M, and El N A (1996) Interphase cytogenetics in mammographically detected breast lesions. *Hum. Pathol*, 27 330-335
135. Spyro M, Kallioniemi A, Kauraniemi P, Elkahloun A, Kallioniemi O P (1998) Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays. *Pathol* 85, 285-291
136. Stennard FA , HollowayAF , Hamilton J at al (1994) Characterisation of six additional human metallothionein genes. *Biochim Biophys Acta* 1218: 357-365
137. Stratton M.R., Collins N., Lakhani S.R. and Sloane J.P. (1995) Loss of heterogosity in ductal carcinoma in situ of the breast. *J. Pathol.* 175: 195-201
138. Tamm I , Richter S, Oltersdorf D, et al. (2004) High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* ; 10: 3737-3744
139. Tamm I , Richter S, Scholz F, et al. (2004) X-IAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis.*J.Hematol* ;5:489-495
140. Tapiero H ,Tew KD (2003) Trace elements in human physiology and pathologie : zinc and metallothioneins . *Biomed Pharmacother* 57: 399-411
141. Teplitz R.L., Butler B.B., Tesluk H.,Min B.H., Russell L.A., Jensen H. M., and Hill L.R. (1990) Quantitative DNA Patterns in human preneoplastic breast lesions . *Anal Quant. Cytol.Histol.*, 12 98-102

142. Theissig F, Haroske G, Kunze KD Meyer W,(1991) Morphologische Möglichkeiten zur Objektivierung der Prognose des invasiven duktales Karzinoms der Mamma zentralbl Pathol 137:242-248

143. Tong QS, Zheng LD, Wang L, et al. (2005) Downregulation of X-IAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric Cancer cells. Cancer Gene Ther ; 12:509-514

144. Tsuda H., Iwaya K., Fukutomi T. and Hirohashi S.(1993) p53 mutations and c-erbB2 amplification in intraductal and invasive breast carcinomas of high histologic grade Jpn. J. Cancer Res., 84 394-401

145. UICC (1993) A commentary on uniform use. Hermanek P, Henson DE, HutterRVP ,Sobin LH (eds.) Springer , Berlin Heidelberg New York Tokyo

146. UICC (1992) TNM-Klassifikation maligner Tumoren 4.Auflage 2. Rev. Hrsg. Hermanek P, Scheibe O, Spiessl B, Wagner G, Springer Berlin Heidelberg NewYork Tokyo

147. Umekita Y., Takasaki T., and Yoshida H. (1996) Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, non-invasive and invasive mammary carcinoma : an immunohistochemical study. Virchows Arch., 424 : 491-494

148. Van Rensburg EJ, Ponder BAJ (1995) Molecular genetics of familial breast –ovarian cancer. J clin Pathol 48: 789-795

149. Vazquez-Ramirez FL, Gonzalez-Campora JJ, Hevia-Alvarez E, et al. (2000) P-glycoprotein, metallothionein and NM23 protein expressions in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 196: 553-559
150. Visscher D.W. Wallis T.L. and Crissman J.D. (1996) Evaluation of chromoson aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics *Cancer* 77: 315-320
151. Vucic D et.al. (2000) ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas., in *Curr Biol*, 10/2000, S.1359-66
152. West AK , Stallings R, Hildebrand CE et al. (1990) Human Metallothioneins genes: structure of the functional locus at 16q13 *Genomics* 8: 513-518
153. WHO (2002) Incidence mortality and survival database . <http://www5.who.int/cancer/main/cfm?p=0000000466>
154. WHO 1.Ausgabe (1968) 2.Auflage 1981(Kapitel 2 Mamma r. Bässler)
155. Xufeng Chen, Karthikeyen, Kandasamy and Rakesh K. (2003) Differential roles of Re1A(p65) and c-Rel subunits of nuclear factor KB in Tumor necrosis factor-related Apoptosis- inducing Ligand Signaling. *Cancer Research* 63 1059-1066
156. Yang L, Cao Z, Yan H, Wood WC (2003) Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells implication for cancer specific therapy. *Cancer Gene Ther* ; 63:6815-6824

157. Zhang R,Zhang H, Wei H,et al. (2000) Expression of metallothionein in invasive ductal breast cancer in relation to prognosis . J Environ Pathol Toxicol Oncol 19: 95-97
158. Zhang Y, Wang Y, Gao W, et al. (2006) Transfer of si RNA against X-IAP induces apoptosis and reduces tumorcells growth potential in human breast cancer in vitro and in vivo. Breast Cancer Res Treat ; 96:267-277
159. Zhongxing Liang, Hui Wu, Santosh Reddy, Aizhi Zhu, Sijia Wang, et al. (2007) Blockade of invasion and Metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial micro RNA. Biochemical and Biophysical Research Communications 363 542-546
160. Zlotnik A,(2004) Chemokines in neoplastik progression. Semin Cancer Biol 14(3) 181-185

7. Danksagung

Prof. Dr. Werner Böcker für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie.

Besonders herzlicher Dank gilt PD Dr. Dr. Thomas Fillies und Herrn Prof. Horst Bürger für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Inka Buchroth für die Hilfestellung bei der TMA-Technik und den immunhistochemischen Färbungen.

Dr. rer. nat. Christoph Neugebauer für die statistische Beratung und die Hilfestellungen im Umgang mit dem statistischen Auswertungsprogramm SPSS.

8. Lebenslauf

9. Anhang

9.1 Reagenzien

9.1.1 Citratpuffer

Stammlösung A	0,1 M Citronensäure 10,5 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (Zitronensäuremonohydrat) auf 500 ml Aqua dest. auffüllen
Stammlösung B	0,1 M Natriumcitrat 29,41 g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ (Natriumcitrat-Dihydrat) auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen
Gebrauchslösung	18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B mischen, pH 6,0 einstellen Diese Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen = 10mM Citratpuffer

9.1.2 TRIS-Puffer (Spülpuffer bei APAAP-Methode)

Stammlösung	36 g TRIS 274 g TRIS-HCl 351 g NaCl auf 4000 ml mit Aqua dest. auffüllen pH 7,4 – 7,6
Gebrauchslösung	1:10 mit Aqua dest. Verdünnen

9.1.3 RPMI-Lösung

50 ml RPMI-1640

450 ml Aqua bidest.

50 ml Bovineserum (inaktiviert)

0,5 g Natriumazid

lösen, pH 7,4 – 7,6 täglich einstellen

9.1.4 Neofuchsin-Lösung

Stammlösung 5 % Neofuchsinlösung in 2 N HCl

Puffer 17,4 g NaCl
 3,0 g Tris-HCl
 9,8 g Tris
 in 2000 ml Aqua bidest. gelöst

Propandiol 21 g Propandiol in 1000 ml Aqua bidest. gelöst

Gebrauchslösung a) 0,125 ml Stammlösung
 0,3 ml 4 % Na-Nitrit
 unter Abzug 60 sec reagieren lassen
 b) 0,025 g Levamisol
 44 ml Entwicklungspuffer
 16 ml Propandiol
 c) 0,0316 g Naphtol-AS-Bi-Phosphat
 0,4 ml N,N-Dimethylformamid
Lösung a), Lösung b) und Lösung c) mischen pH mit 2 N
HCl auf 8,8 einstellen und filtrieren
Schnitte 25 min auf dem Rüttler inkubieren

9.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1 stufenweises Progressionsmodell des Mammakarzinoms:
Allred D.C., O'Connell P. und Fuqua S.A. Biomarkers in early
breast neoplasia J Cell Biochem. Suppl., 17G:1993
- Abb.2 Progressionsmodell nach Beckmann
Beckmann M.W., Niederacher D., Schnurch H.G., Gusterson B.A.
und Bender H.G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and
tumour heterogeneity J.Mol.Med. 75:429-439 1997
- Abb.3 Progressionsmodell nach Lakhani : Lakhani S.R., The transition
from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast J Pathol 187 :
272-278 1999
- Abb.4 Progressionsmodell nach Korsching et al. : E Korsching, J
Packerisen, MW Helms, C Kersting, R Voss, PJ van Diest, B
Brandt, E van der Wall, W Boecker and H Bürger. Deciphering a
subgroup of breast carcinomas with putative progression of grade
during carcinogenesis revealed by Comparative Genomic
Hybridisation (CGH) and immunohistochemistry Brit.J.of Cancer
2004 90, 1422-1428
- Abb.5 TMA Modell

9.3 Tabellenverzeichnis

Tab.1	TNM System der UICC
Tab.2	Häufigkeitstabellen für MT3
Tab.3	Häufigkeitstabelle für den Chemokinrezeptor CXCR4
Tab.4	Häufigkeitstabelle für X-IAP
Tab.5	Häufigkeitstabelle für IAP-2
Tab.6	Häufigkeitstabelle für MIB-1
Tab.7	Häufigkeitstabelle für p53
Tab.8	Häufigkeitstabelle für erbB-2
Tab.9	Häufigkeitstabelle für CK5
Tab.10	Häufigkeitstabelle EGFR
Tab.11	Häufigkeitstabelle zur Expression der Östrogenrezeptors
Tab.12	Häufigkeitstabelle zur Expression des Progesteronrezeptors
Tab.13	Korrelation zu MT3
Tab.14	Korrelation zu CXCR4
Tab.15	Korrelation zu IAP-2
Tab.16	Korrelation zu X-IAP

9.4 Abkürzungsverzeichnis:

ADH	atypical duktal hyperplasia
ALH	atypical lobular hyperplasia
APAAP	alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase
BRCA	breast cancer susceptibility gene
CK	Zytokeratin
DCIS	duktal carcinoma in situ,
IHC	immunohistochemistry
HNG	high nuclear grade
HUT	hyperplasia usual Type
LCIS	lobular carcinoma in situ
LNG	low nuclear grade
Lsg.	Lösung
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MT3	Methallothionin 3
RNA	Ribonucleic Acid
TGF	Transforming Growth Factor
TNM	Tumorsize Node Metastasis
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WHO	world health organisation