

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

**Möglichkeiten und methodische Grenzen immunhistochemischer  
Methoden zur Therapieprädiktion des invasiven Mammakarzinoms  
am Beispiel des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Rügge, Ann-Barbara Gertrud Johanna  
aus Detmold

2006

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

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

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Horst Bürger

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Pia Wülfing

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker -  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Horst Bürger  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Pia Wülfing

### **Zusammenfassung**

Möglichkeiten und methodische Grenzen immunhistochemischer Methoden zur Therapieprädiktion des invasiven Mammakarzinoms am Beispiel des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR)

Rügge  
Ann-Barbara

*Einleitung:* Die Einführung molekular basierter Therapien in die Behandlung maligner Tumoren eröffnet neue Möglichkeiten einer gezielten Therapie. Speziell die Einführung von Herceptin bei *c-erbB-2*-überexprimierten Mammakarzinomen in die Behandlung des fortgeschrittenen, invasiven Mammakarzinoms hat zu beeindruckenden Behandlungsergebnissen geführt. Die Einführung von weiteren, molekular basierten Therapien, wie z.B. gegen den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) ist derzeit unter anderem noch durch das Fehlen von zuverlässigen, prädiktiven, diagnostischen Ansätzen behindert. Die Etablierung von diagnostischen, immunhistochemischen Algorithmen ist somit essentiell für eine zuverlässige Therapieprädiktion.

*Material und Methode:* 725 invasive Mammakarzinome wurden mittels Immunhistochemie mit 3 verschiedenen, kommerziell erhältlichen, gegen EGFR-gerichtete Antikörpern unter Verwendung von Gewebemikroarrays semiquantitativ charakterisiert. Die Expression von EGFR wurde darüber hinaus mit der Expression von 12 weiteren Markern (Östrogenrezeptor ER, Progesteronrezeptor PR, *c-erbB-2*, p53, bcl-2, Cyclin D1, Cytokeratin 5, Cytokeratin 14, Cytokeratin 8/18, Cytokeratin 19, Vimentin und Mib-1) mittels der Clusteranalyse korreliert.

*Ergebnisse:* Die Expression von EGFR schwankte in Abhängigkeit vom jeweiligen Antikörper zwischen 2 und 16%, wobei die Korrelationskoeffizienten unter den Antikörpern zwischen 0,48 und 0,71 lagen. Nur bei einem Antikörper zeigte sich eine Expression von EGFR in den Myoepithelzellen. EGFR korrelierte in allen Färbungen mit dem Tumorgrad, aber nur bei einzelnen Antikörpern mit dem Lymphknotenstatus. Eine Vergleichbarkeit der Antikörper liegt somit nicht vor. Die biomathematische Clusteranalyse zeigte ein „clustern“ aller EGFR-Antikörper mit hoch-molekularen Cytokeratinen 5 und 14, Vimentin und p53.

*Schlussfolgerung:* Die derzeit kommerziell erhältlichen EGFR-Antikörper unterscheiden sich signifikant. Der Hauptunterschied aller Antikörper liegt in erster Linie in ihrer Sensitivität. Die Resultate der biomathematischen Analyse mit der hochsignifikanten Korrelation zwischen EGFR in allen Anfärbungen mit hochmolekularen Cytokeratinen 5 und 14, Vimentin und p53 deuten auf eine vergleichbare Spezifität hin. Darüber hinaus charakterisieren diese Ergebnisse EGFR als wichtiges Molekül in der Pathogenese eines Subtyps schlecht-differenzierter, so genannter basaler Mammakarzinome und somit als mögliches Therapieziel dieser besonderen Tumorgruppe.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das invasive Mammakarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Genetischer Hintergrund	2
1.1.3	Formale und molekulare Pathogenese des Mammakarzinoms	2
1.1.4	Stadieneinteilung des Mammakarzinoms	5
<b>1.2</b>	<b>Prognosefaktoren des invasiven Mammakarzinoms</b>	<b>6</b>
1.2.1	Beurteilung prognostischer und prädiktiver Faktoren beim invasiven Mammakarzinom	7
1.2.2	Prognosefaktoren erster Klasse	8
1.2.3	Prognosefaktoren zweiter und dritter Klasse	11
<b>1.3</b>	<b><i>erb</i>-Genfamilie</b>	<b>12</b>
1.3.1	<i>EGFR</i>	12
1.3.2	Transkriptionskontrolle und Regulation von <i>egfr</i>	14
1.3.3	Einfluss einer polymorphen Sequenz im Intron 1 von <i>egfr</i> auf die Gentranskription	15
1.3.4	Amplifikationen von <i>egfr</i>	16
1.3.5	Bedeutung von EGFR in der Karzinogenese des Mammakarzinoms	16
1.3.6	Einfluss von EGFR-Expression und <i>egfr</i> -Genpolymorphismen auf chemotherapeutische Behandlungsergebnisse	17
1.3.7	Methodische Ansätze zur Bestimmung der EGFR-Expression	18
<b>1.4</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Tumorkollektiv</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Erstellung der Tissue Microarrays</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Allgemeines immunhistochemisches Färbeprotokoll</b>	<b>25</b>
2.3.1	Schnittanfertigung	25

2.3.2	Entparaffinisierung der Schnitte	25
2.3.3	Vorbehandlung	25
2.3.4	Immunhistochemisches Protokoll	26
<b>2.4</b>	<b>Verwendete Primärantikörper</b>	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>Auswertung</b>	<b>29</b>
<b>2.6</b>	<b>Biomathematische Clusteranalyse</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>63</b>

## Abbildungen

<i>Abb. 1:</i> Hypothetisches Progressionsmodell des invasiven Mammakarzinoms und seiner vermuteten Vorläuferläsionen entsprechend dem Konzept von Allred et al.	3
<i>Abb. 2:</i> Hypothetisches Progressionsmodell des invasiven Mammakarzinoms und seiner Vorläuferläsionen unter Einbeziehung der lobulär differenzierten in situ und invasiven Neoplasien entsprechend eines Vorschlags von Lakhani	4
<i>Abb. 3:</i> Überlebenswahrscheinlichkeit von Mammakarzinompatientinnen in Abhängigkeit der Anzahl tumorinfiltrierter axillärer Lymphknoten	9
<i>Abb. 4:</i> Klinische Langzeitbeobachtung von Mammakarzinompatientinnen in Abhängigkeit von der Tumorgraduierung	9
<i>Abb. 5:</i> Übersicht über die wichtigsten EGFR abhängigen Signalkaskaden	13
<i>Abb. 6:</i> 5'-Region des <i>egfr</i> -Gens	14
<i>Abb. 7:</i> Hypothetisches Modell der Regulation von EGFR	17
<i>Abb. 8:</i> Übersicht über derzeit in präklinischen und klinischen Phase I-III-Studien verwendeten anti-EGFR gerichteten Substanzen	18
<i>Abb. 9:</i> Übersicht über die verschiedenen Scoringmethoden zum immunhistochemischen Nachweis von EGFR	19
<i>Abb. 10:</i> Schematischer Aufbau von Tissue-Microarrays	23
<i>Abb. 11:</i> Detailaufbau von Tissue-Microarrays	23
<i>Abb. 12:</i> Beispielhafter Ablauf der Gewebeentnahme	24
<i>Abb. 13:</i> Aufarbeitung des Akzeptorblocks	24
<i>Abb. 14:</i> Beispiel eines Gewebemikroarrays nach vollständiger Fertigstellung	25
<i>Abb. 15:</i> Repräsentative Abbildungen von Mammakarzinomen mit fehlender Expression von EGFR, bzw. starker Expression von EGFR	35
<i>Abb. 16:</i> Repräsentative Abbildungen von Mammakarzinomen mit schwacher Expression von EGFR	36
<i>Abb. 17:</i> Darstellung der Clusteranalyse der 12 Markergene in Bezug zu den jeweiligen EGFR-Antikörpern	37

<i>Abb. 18:</i> Darstellung der Clusteranalyse der 12 Markergene in Bezug zu allen drei EGFR-Antikörpern	38
<i>Abb. 19:</i> Korrelation der EGFR-Antikörper untereinander	38

## **Tabellen**

<i>Tab. 1:</i> TNM-Einteilung des Mammakarzinoms UICC 6.Auflage	5
<i>Tab. 2:</i> Übersicht über postulierte Prognosefaktoren des invasiven Mammakarzinoms	6
<i>Tab. 3:</i> Auflistung der verwendeten Antikörper	28
<i>Tab. 4:</i> Kategorisierung der Antikörper	30
<i>Tab. 5:</i> Übersicht über die Häufigkeit der Expression von EGFR in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper	34

# 1 Einleitung

## 1.1 Das invasive Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

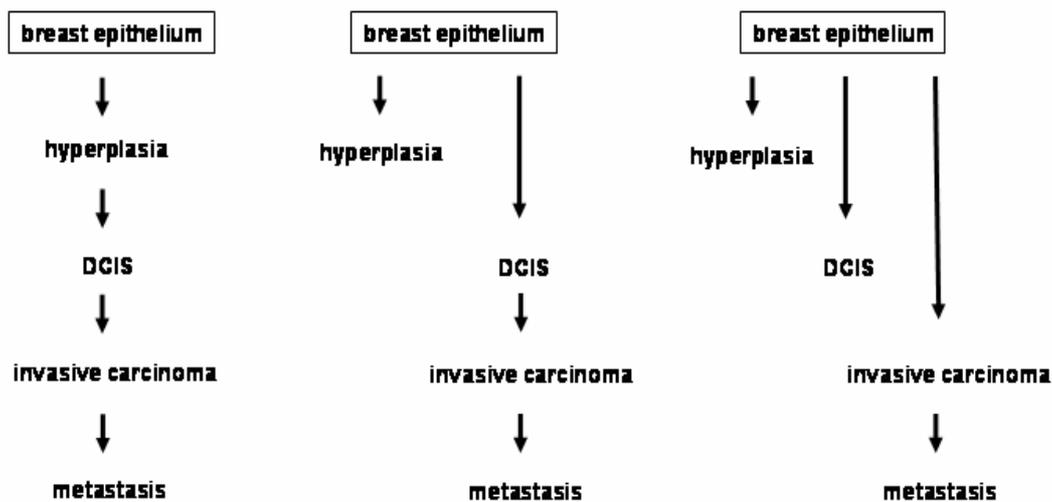
Das invasive Mammakarzinom ist eine der wichtigsten malignen Erkrankungen in der industrialisierten, westlichen Welt und eine der führenden Todesursachen bei malignen Erkrankungen. Derzeit erkrankt in Deutschland jede 10. Frau im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom<sup>102</sup>. Übertragen auf absolute Zahlen bedeutet dies, dass die Diagnose invasiver Brustkrebs bei etwa 50.000 Frauen in Deutschland pro Jahr gestellt wird. Die Inzidenzrate scheint hierbei noch zu steigen<sup>113</sup>. Interessanterweise unterscheiden sich die Inzidenzraten weltweit signifikant. Speziell in asiatischen Ländern und in Südeuropa scheint Brustkrebs 4 bis 5 mal weniger vorzukommen<sup>59,124</sup>. Als Ursachen werden genetische Ursachen aber auch Umwelteinflüsse wie z.B. Ernährungsgewohnheiten angenommen<sup>137, 138</sup>. Speziell der Einfluss von Ernährungsgewohnheiten auf die Brustkrebsinzidenz konnte durch Migrationsstudien erhärtet werden. Die Untersuchungen an Nachkommen von Bewohnern aus Ländern mit niedriger Brustkrebsinzidenz, welche in Länder mit bekannter, hoher Brustkrebsinzidenz gezogen waren, unterstützten diese Hypothese<sup>128, 140</sup>. Des Weiteren wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl endogener Risikofaktoren beschrieben: frühe Menarche, späte Menopause, späte Geburten, benigne Brustdrüsenerkrankungen, positive Familienanamnese für Brustkrebs<sup>62</sup>. Beispielsweise erhöht sich das Brustkrebsrisiko bei Frauen, bei denen ein direktes Mitglied der Familie von Brustkrebs betroffen ist, um den Faktor 2<sup>103</sup>. Derzeit ist im Gegensatz zur steigenden Inzidenz eine Abnahme der Mortalität zu vermerken. Dies wird vor allem auf die verbesserte Früherkennung von Brustkrebs und die Detektion seiner benignen und prämaligen Vorstufen im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen, wie z.B. im Rahmen eines Mammographiescreenings, zurückgeführt<sup>5</sup>.

### **1.1.2 Genetischer Hintergrund**

Weniger als 5% der invasiven Mammakarzinome sind auf den Einfluss von vererbten, dominanten Genen mit hoher Penetranz zurück zu führen (BRCA1 und BRCA2, p53, Li-Fraumeni-Syndrome, PTEN, Cowden Erkrankung<sup>34, 121, 125</sup>). Hingegen haben 10 - 15% aller Brustkrebsfälle eine positive Familienanamnese. Eine Reihe von genetischen Polymorphismen mit einer Rolle im Steroidhormonmetabolismus (CYP 17, CYP 19) oder der Detoxifikation von putativen Karzinogenen (CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, GSTT1, NAT1 und NAT2) wird für diese Fälle diskutiert<sup>31</sup>. Die exakte Rolle dieser Polymorphismen bleibt beim derzeitigen Wissensstand allerdings unklar, da die Erforschung von möglichen Gen-Gen oder Gen-Umwelt-Interaktionen großer molekular-epidemiologischer Untersuchungen bedarf. Dies betont die Bedeutung von sekundären, erworbenen genetischen Veränderungen in der Pathogenese des Brustkrebses. Diese somatischen Veränderungen umfassen Veränderungen und Beeinflussungen von Genen mit einer wichtigen Rolle in der Zellproliferation, der Apoptose, von Wachstumsfaktoren, bzw. deren Rezeptoren und einer Vielzahl anderer Regulationsmechanismen<sup>56</sup>.

### **1.1.3 Formale und molekulare Pathogenese des Mammakarzinoms**

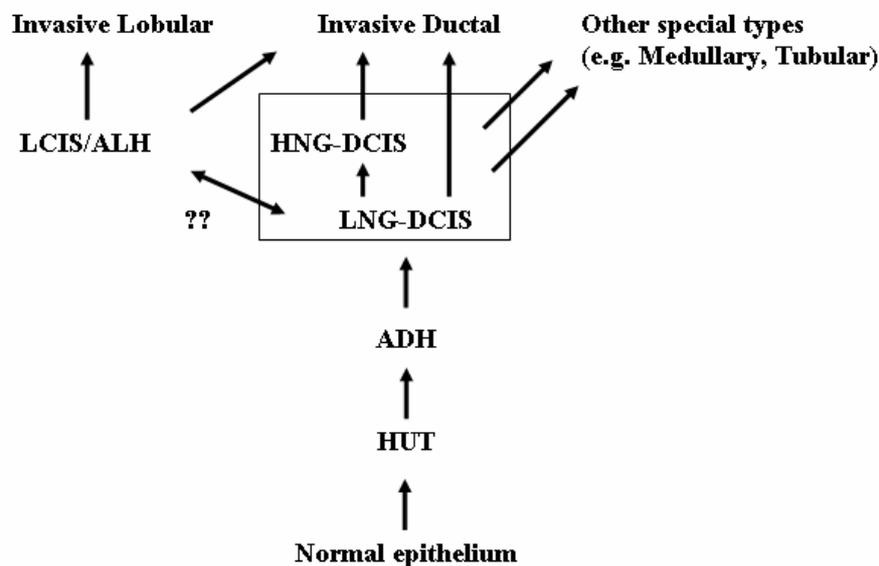
Die herkömmlichen Modelle zur formalen Pathogenese des Mammakarzinoms gehen von einer schrittweisen Tumorentdifferenzierung benigner Vorstufen, analog der Pathogenese des Kolonkarzinoms (sog. Vogelstein-Modell), aus. Hierbei werden die morphologischen Veränderungen im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz von einer schrittweisen Anhäufung genetischer Alteration begleitet<sup>39, 75</sup>. In Analogie hierzu wird die schrittweise Akkumulation genetischer Alterationen in einer normalen Brustdrüsenzelle als die treibende Kraft in der Evolution des Brustkrebs interpretiert<sup>53</sup>. Eine Vielzahl von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wurden als wichtig für die Pathogenese des Mammakarzinoms beschrieben<sup>6</sup>. Die potentielle Wichtigkeit speziell der Überexpression verschiedener Onkogene in Frühstadien und potentiellen Vorstufen wurde in verschiedensten Tiermodellen belegt<sup>87, 88, 119</sup>. Dies trifft insbesondere auf die Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. dem Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) oder c-ErbB-2 zu<sup>15, 118</sup>.



**Abb. 1:** Hypothetisches Progressionsmodell des invasiven Mammakarzinoms und seiner vermuteten Vorläuferläsionen entsprechend dem Konzept von Allred et al. <sup>1</sup>. Die verschiedenen Modelle zeigen theoretisch denkbare Verbindungen zwischen den einzelnen Progressionsstufen des Mammakarzinoms auf. Insbesondere wird die Bedeutung der hyperplastischen Läsionen hinterfragt (Vorläuferläsion oder Risikoindikator?).

Eine Reihe von Arbeitsgruppen konnte in den vergangenen Jahrzehnten zeigen, dass eine Vielzahl von benignen, proliferativen Brustdrüsenläsionen mit einem signifikant erhöhten Brustkrebsrisiko einher gehen <sup>32, 33, 66, 127</sup>. Die einfache duktale Hyperplasie war mit einem 2-fachen erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Im Gegensatz hierzu war die atypische duktale Hyperplasie bereits mit einem 4-fach erhöhten Risiko verbunden. Das duktale Carcinoma in situ (DCIS) war sogar mit einem 8-10-fach erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Ein noch höheres Risiko (10-11-fach) wurde für das Carcinoma lobulare in situ (CLIS) beschrieben. Die Übertragung dieser mehrfach reproduzierten, epidemiologischen Ergebnisse führte zur Annahme, dass diese tumorösen Veränderungen Vorläuferläsionen des Mammakarzinoms darstellen <sup>84, 97</sup>. Diese Hypothese wurde zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt, dass diese Veränderungen gehäuft in Brustdrüsenparenchym neben invasiven Mammakarzinomen vorkommen <sup>68</sup>. Die klinische Interpretation dieser Befunde ist umstritten, da das Brustkrebsrisiko bei der dukталen Hyperplasie, der atypischen dukталen Hyperplasie und dem CLIS gleichmäßig auf beide Brüste verteilt ist <sup>38</sup>. Hingegen ist beim DCIS das

erhöhte Risiko auf die biopsierte Brust beschränkt<sup>96</sup>. Infolge dessen wurden speziell die duktale Hyperplasie, die atypische duktale Hyperplasie und das CLIS als Marker eines generell erhöhten Risikos statt einer direkten Vorläuferläsion beschrieben<sup>11, 96</sup>. Als Folge dieser verschiedenen, divergenten Forschungsergebnisse wurde unter Berücksichtigung molekularer und epidemiologischer Ergebnisse eine Vielzahl unterschiedlicher, teils konkurrierender Progressionsmodelle für das invasive Mammakarzinom postuliert. Neueste Forschungsergebnisse weisen zudem auf die Bedeutung physiologischer Brustdrüsen-spezifischer Stammzellen hin<sup>10, 29</sup>.



**Abb. 2:** Hypothetisches Progressionsmodell des invasiven Mammakarzinoms und seiner Vorläuferläsionen unter Einbeziehung der lobulär differenzierten in situ und invasiven Neoplasien entsprechend eines Vorschlags von Lakhani<sup>81</sup>. Basierend auf diesem Modell sollte das lobuläre in situ Karzinom nicht nur als Risikoindikator sondern vielmehr als unmittelbare Vorläuferläsion des invasiv lobulären Karzinoms betrachtet werden.

HUT= duktale Hyperplasie, so genannter usual type, ADH= atypische duktale Hyperplasie, DCIS= duktales Carcinoma in situ, LNG= low nuclear grade (geringer Kernmalignitätsgrad), HNG= high nuclear grade (hoher Kernmalignitätsgrad), LCIS= lobuläres Carcinoma in situ, ALH= atypische lobuläre Hyperplasie.

### 1.1.4 Stadieneinteilung des Mammakarzinoms

Für die pathologisch-anatomische Deskription, das Staging und die Therapieplanung hat sich die an Tumorgröße und Ausbreitung orientierende TNM-Klassifikation der Union international contre le cancer etabliert. Das Präfix p- zeigt hierbei die histologische, mikroskopische Absicherung des Befundes an.

<b>pT</b>	<b>Primärtumor</b>
pTx	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm und <5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe
pT4a	mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut derselben Brust
pT4c	Kriterien von 4a und 4b sind beide erfüllt
pT4d	inflammatorisches Karzinom
<b>pN</b>	
<b>Regionäre Lymphknoten</b>	
pNx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
pN0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN2	Metastasen in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
pN3	Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
<b>pM</b>	
<b>Fernmetastasen</b>	
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
pM1	Nachweis von Fernmetastasen

Tab. 1: TNM-Einteilung des Mammakarzinoms UICC 6.Auflage

## 1.2 Prognosefaktoren des invasiven Mammakarzinoms

Der individuelle klinische Verlauf und damit die Prognose des invasiven Mammakarzinoms sind nach wie vor nur sehr eingeschränkt zu prädikieren. Dementsprechend werden nach den heutigen Empfehlungen der Fachgesellschaften fast alle Mammakarzinompatientinnen adjuvant chemotherapeutisch behandelt <sup>51</sup>. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Faktoren beschrieben, welche eine bessere Prognoseabschätzung und damit assoziiert auch eine verbesserte, individuellere Therapieplanung ermöglichen sollten. Die Wertigkeit dieser verschiedenen Prognosefaktoren wird sehr kontrovers diskutiert. Die amerikanische Fachgesellschaft für Mammapathologie hat im Jahre 1999 erstmals eine Wertung der Prognosefaktoren vorgenommen. Es wurde eine Wertung in drei, nach unterschiedlichem Evidenzlevel unterteilte Kategorien vorgeschlagen <sup>42</sup>.

*Klasse 1: prognostisch relevant und bewiesen*

**TNM-Einteilung**

**Histologisches Grading**

**Histologischer Typ**

**Anzahl der Mitosefiguren**

**Hormonrezeptorstatus**

*Klasse 2: ausgiebig biologisch und klinisch untersucht,  
statistisch robuste Studien fehlen*

**c-erbB2**

**p53**

**Proliferationsmarker (Ki-67)**

**Lymphgefäß- und Blutgefäßinvasion**

*Klasse 3: kein sicherer prognostischer Wert*

**DNA-Ploidiestatus, Mikrogefäßdichte, EGFR, TGF-alpha,  
bcl-2, pS2, Cathepsin D.**

Tab. 2: Übersicht über postulierte Prognosefaktoren des invasiven Mammakarzinoms <sup>42</sup>

### **1.2.1 Beurteilung prognostischer und prädiktiver Faktoren beim invasiven Mammakarzinom**

Die Verwendung von prognostischen Markern in der Onkologie muss sich an Gesichtspunkten der Praktikabilität sowie der therapeutischen und klinischen Sinnhaftigkeit richten (klare Aussagen zur Prognose). Dies betrifft insbesondere die Tatsache, dass ein entsprechendes Testsystem sowohl finanzierbar als auch zeitnah und schnell einsetzbar sein muss.

Mit einem verbesserten Verständnis um die Wirksamkeit von verschiedenen Chemotherapien beim invasiven Mammakarzinom, vor allem nach der Einführung von molekulargerichteten Therapien, rückt heutzutage zunehmend die Vorhersage eines möglichen Therapieerfolges durch die Verwendung von so genannten prädiktiven Faktoren ins Zentrum des Interesses. Eine Reihe dieser Marker besitzen eine prognostische und prädiktive Wertigkeit, wobei sich der jeweilige Wert teilweise über die vergangenen Jahrzehnte geändert hat <sup>63</sup>. Es ist jedoch wichtig darauf hinzuweisen, dass bislang beim Mammakarzinom kein Marker beschrieben wurde, welcher eine prädiktive, aber keine prognostische Bedeutung hat. Speziell für den Östrogen- und Progesteronrezeptor war eine prädiktive Wertigkeit vor der prognostischen Bedeutung bekannt. Eine Sonderrolle nimmt c-ErbB-2 ein. In seiner Erstbeschreibung war es als prognostischer Faktor beschrieben worden <sup>120</sup>, später als Marker einer Resistenz gegen konventionelle Chemotherapien <sup>7, 129</sup>. Erst mit der Einführung eines humanisierten, anti-c-ErbB-2 Antikörpers bekam es seine derzeitige prädiktive Bedeutung <sup>64</sup>. Das Beispiel von c-ErbB-2 als auch der Hormonrezeptoren macht deutlich, dass die entsprechenden Faktoren eine zentrale Rolle in der Biologie und Progression des Mammakarzinoms einnehmen. Speziell c-ErbB-2 macht aber auch deutlich, dass die Definition <sup>42</sup> von Schwellenwerten für die Therapieprädiktion schwierig ist. In der immunhistochemischen Untersuchung stellen sich die meisten Marker als teilweise sehr heterogen in ihrem Anfärbeverhalten dar. Eine komplette Positivität oder Negativität findet sich sehr selten. Die „Positivität“ ist damit als kontinuierliche Variable zu betrachten und die Definition eines entsprechenden „cut-off-points“ kann die Aussagekraft der entsprechenden Studie stark beeinträchtigen. Dies beinhaltet noch

nicht die Beeinflussung des Ergebnisses durch Faktoren wie Materiallagerung und Aufbereitung<sup>67</sup>.

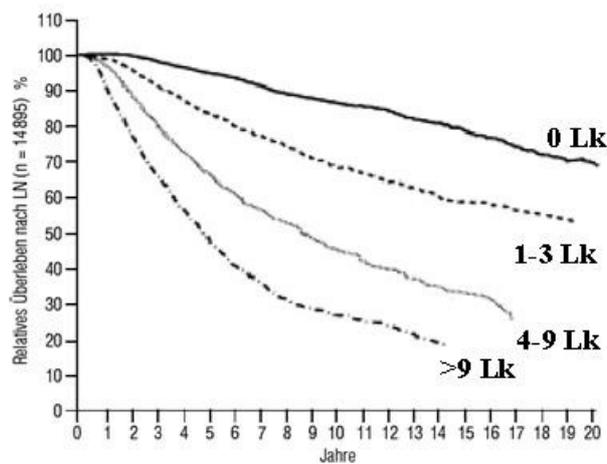
## **1.2.2 Prognosefaktoren erster Klasse**

### **Tumorgröße**

Die Größe des Tumors ist einer der wichtigsten Prognoseparameter des invasiven Mammakarzinoms<sup>40, 134</sup>. Eine Größenbestimmung sollte mindestens in zwei, nach den Leitlinien der Europäischen Fachgesellschaften in allen drei Dimensionen histologisch verifiziert erfolgen. Mit der Einführung des flächendeckenden Mammographiescreenings in Deutschland ist mit einer Zunahme von prognostisch günstigen, vorwiegend nodal negativen T1-Tumoren zu rechnen, welche generell mit einer Langzeitprognose von mehr als 90% 10-Jahresüberleben einhergehen<sup>93</sup>.

### **Lymphknoteninfiltration**

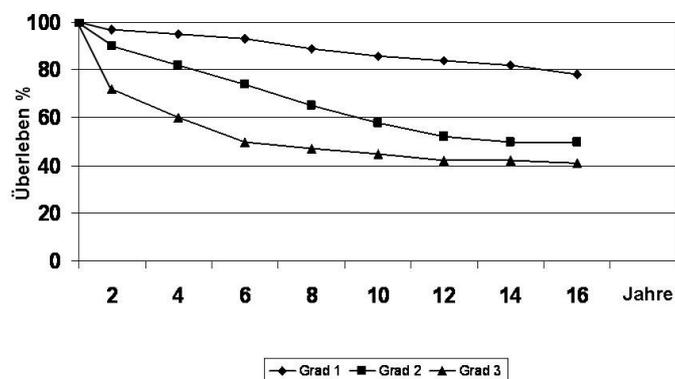
Der Tumorbefall von Lymphknoten stellt den wichtigsten, isolierten Prognoseparameter dar. Nur ein Drittel aller primär nodal negativen Mammakarzinompatientinnen entwickelt in einer Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren ein Rezidiv. Hingegen sind 70% aller primär nodal positiven Mammakarzinompatientinnen von einem Tumorrezidiv mit konsekutiver Verschlechterung der Gesamtprognose betroffen<sup>41, 141</sup>. Das Risiko eines Rezidivs steigt hierbei mit der absoluten Anzahl der tumorinfiltrierten Lymphknoten an. Für viele Jahre war die radikale axilläre Lymphonodektomie das Standardverfahren zur Klärung des axillären Nodalstatus. Die Einführung und Etablierung der Sentinel-Lymphknotentechnik ermöglicht heute schon eine wesentlich schonendere Klärung dieses wichtigen Prognoseparameters<sup>12</sup>. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der genauen anatomischen Kenntnis von Lymphabflusswegen und der Definition so genannter „Wächterlymphknoten“, welche den ersten Lymphknoten im Abflussgebiet eines Karzinoms darstellen. Neue Studien haben die Effizienz und Zuverlässigkeit der Methode aufgezeigt und zu einer signifikanten Senkung der Komplikationsrate nach radikaler Axilladisektion gezeigt<sup>46, 135</sup>.



**Abb. 3:** Überlebenswahrscheinlichkeit von Mammakarzinompatientinnen in Abhängigkeit der Anzahl tumorinfiltrierter axillärer Lymphknoten, unabhängig von der Tumorgroße (Tumormanual München, 2001)

### Tumorgrad / Histologischer Typ

Die Differenzierung eines Mammakarzinoms ist ein wichtiger, histologisch zu erhebender Prognosefaktor. Das derzeit gebräuchlichste Verfahren ist die Tumorgraduierung nach Elston und Ellis <sup>35</sup>. Als einzelne Faktoren gehen in den Gesamtscore die Mitoserate, der Anteil tubulärer (glandulärer) Strukturen sowie die nukleäre Pleomorphie ein. Insgesamt werden drei Grade (G1-G3) unterschieden. Der histologische Typ bleibt bei diesem Ansatz unberücksichtigt.



**Abb. 4:** Klinische Langzeitbeobachtung von Mammakarzinompatientinnen in Abhängigkeit von der Tumorgraduierung <sup>98</sup>

Darüber hinaus sind jedoch mehrere histologische Subtypen des invasiven Mammakarzinoms mit einer guten Prognose assoziiert worden. Dazu gehören insbesondere das invasiv tubuläre Karzinom, das invasiv muzinöse und das medulläre Mammakarzinom<sup>21, 24, 77, 91, 95, 101</sup>.

### **Mitoserate**

Die Tumorphiliferation kann mit verschiedensten Möglichkeiten gemessen werden. Das einfachste und kostengünstigste Verfahren stellt hierbei die histologische Quantifizierung von Mitosefiguren an einem HE-Schnitt dar. Es werden 10 Gesichtsfelder bei 40-facher Vergrößerung in der Region mit der aktivsten Proliferation ausgezählt und als absolute Zahl angegeben. Bei strikter Einhaltung der allgemeinen Empfehlungen sind die Reproduzierbarkeit und damit die prognostische Verwertbarkeit sehr hoch<sup>35, 36</sup>. Alternativ stehen immunhistochemische oder flowzytometrische Verfahren zur Verfügung<sup>114</sup>. Diese können jedoch vor allem auf Grund ihrer starken Beeinflussbarkeit durch technische Variablen und damit einer begrenzten Reproduzierbarkeit bislang nur als Prognosefaktoren 2. und 3.Klasse angesehen werden<sup>42</sup>. Auf Grund des hohen technischen und finanziellen Aufwandes wurden sie bislang auch nur an vergleichsweise kleinen Patientinnenkollektiven getestet.

### **Hormonrezeptorstatus**

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor) gehört inzwischen zum Standardaufbereitungsverfahren beim invasiven Mammakarzinom. Seine Wertigkeit beim in situ Karzinom ist derzeit Gegenstand klinischer Studien.

Allerdings ist inzwischen seine Wertigkeit als prädiktiver Faktor in den Vordergrund gerückt. Zwar beruhen die meisten Daten auf den Resultaten eines biochemischen Ligandenbindungsassays, doch auf Grund der sehr hohen Korrelation zwischen biochemischer und immunhistochemischer Analyse ist die Einordnung dieses Faktors als Prognosefaktoren 1.Klasse unabhängig von der Nachweismethode gerechtfertigt. Es wird generell die prozentuale Anzahl der positiven Zellkerne angegeben. Der derzeit gebräuchlichste Schwellenwert liegt bei 10%<sup>60</sup>. Gestützt wird diese Einschätzung auch durch klinische Behandlungsergebnisse. Nur wenige Therapieverfahren der vergangenen

Jahrzehnte haben statistisch so signifikant zu einer Verbesserung des adjuvanten Therapieerfolges beigetragen wie die antihormonelle Therapie bei Hormonrezeptorpositiven Mammakarzinompatientinnen. Im deutschen Sprachraum wird zudem oftmals noch ein immunhistochemischer Score nach Remmele angegeben<sup>112</sup>. Dieser setzt sich aus der Anzahl der positiven Zellen und der Färbeintensität zusammen. Eine letztendlich bessere Aussage im Vergleich zu dem oben genannten Schwellenwert konnte allerdings bis heute nicht aufgezeigt werden.

### 1.2.3 Prognosefaktoren zweiter und dritter Klasse

Die Mitglieder dieser Prognosefaktorengruppen setzen sich aus unterschiedlichsten Faktoren mit den unterschiedlichsten biologischen Hintergründen zusammen.

**p53** ist ein Protein, welchem als so genannter „Wächter des Genoms“ eine wichtige Funktion bei der Instandhaltung der Integrität der DNA zugeordnet wird. Die Überexpression von p53 ist oftmals mit einer Mutation in verschiedenen Exons von p53 assoziiert. Eine Mutation (Punktmutation, Deletion) führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und darüber konsekutiv zu einer verlängerten Halbwertszeit. Die Überexpression wird somit als Surrogatmarker einer zu Grunde liegenden Mutation interpretiert. Eine Überexpression ist vor allem in schlecht differenzierten Mammakarzinomen nachweisbar. Die prognostische Relevanz wurde insbesondere in nodal negativen Mammakarzinomen beschrieben. Möglicherweise ist die Expression von p53 mit einer Chemotherapieresistenz assoziiert.

Eine **Gefäßinvasion** (Lymph- und Blutgefäßinvasion) wurde von zahlreichen Gruppen immer wieder als prognostisch relevant beschrieben, wenngleich eine eindeutige, reproduzierbare Unterscheidung zwischen Lymph- und Blutgefäßen nicht immer möglich war<sup>52, 105</sup>. Auch unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Methoden konnte keine verbesserte Unterscheidung erreicht werden. Der englische Sprachraum kennt aus diesem Grund auch nur den Begriff der Gefäßinvasion. Mit der Einführung der Brust erhaltenden Therapie bekommt der Nachweis einer Gefäßinvasion zudem einen unmittelbar chirurgisch-therapeutischen Aspekt. Junge Patientinnen mit einer Gefäßinvasion in der diagnostischen Stanzbiopsie werden in vielen Zentren unmittelbar per Mammaablatio therapiert.

**DNA-Messungen** im Sinne der Bestimmung der DNA-Ploidie wurden ebenfalls immer wieder als prognostisch relevant beschrieben<sup>30, 45</sup>. Eine Bestätigung dieser Beschreibung in einem multivarianten Testansatz, im Sinne eines unabhängigen Prognoseparameters liegt jedoch noch nicht vor.

Weitere Faktoren mit prognostischer Relevanz betreffen die Tumorangiogenese, Faktoren der Apoptose und des extrazellulären Matrix-abbauenden Systems (UPA/PAI, Cathepsin D) sowie die Proteine der *erb*-Genfamilie.

## 1.3 *erb*-Genfamilie

### 1.3.1 *EGFR*

Die Produkte der *erb*-Genfamilie sind Rezeptortyrosinkinasen und bestehen aus 4 Mitgliedern: EGFR (ErbB-1), ErbB-2 (Her2), ErbB-3 und ErbB-4. Alle sind an der Zelloberfläche im Sinne von allosterischen Enzymen lokalisiert und enthalten eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne. EGFR, ErbB-2, und ErbB-4 besitzen zudem jeweils eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. Für EGFR sind 6 Liganden bekannt: EGF, TGF- $\alpha$ , Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin und Heparin bindendes EGF<sup>22, 106</sup>. Die Bindung des Liganden an den extrazellulären Teil des Rezeptors führt zu einer Dimerisierung und Aktivierung der intrazellulären Signalwege. Zumeist ist ErbB-2 der bevorzugte Heterodimerisierungspartner von EGFR. In den letzten Jahrzehnten konnten drei große Signalkaskaden mit grundlegender Bedeutung für die Karzinomentstehung und Karzinomprogression identifiziert werden. Der erste Signalweg führt über eine Phospholipase C-gamma1 Phosphorylierung zu einer PIP2-abhängigen Aktinreorganisation. Der zweite Weg führt über Grb2 zu einer Aktivierung von p21<sup>ras</sup> mit Vorantreiben des Zellzyklus. Die Aktivierung von AKT mit Hemmung der Apoptose über Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) stellt eine weitere Alternative dar.

In den meisten Zelltypen ist EGFR mit einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  Rezeptoren pro Zelle vorhanden. Eine EGFR-Expression wurde zudem in einer Reihe von organspezifischen Stamm- oder Progenitorzellen gefunden<sup>26, 28</sup>. Dies führte zur Hypothese, dass EGFR ein Protein darstellt, welches die Unreife von Zellen erhält. Die



### 1.3.2 Transkriptionskontrolle und Regulation von *egfr*

Das 5'-Ende von *egfr* enthält einen GC-reichen Promotor ohne bekannte Konsensussequenz wie TATA oder CAAT-Boxen. Aus diesem Grund startet die Transkription an multiplen „Initiationssites“ in der Promotorregion <sup>65</sup>. Ein Enhancerelement ist in direkter Nähe zum Promotor gelegen. Zwei andere zeigen ein kooperierendes Verhalten: ein Enhancerelement ist in direkter Nähe zum Promotor im Intron 1 mit Bezug zu einem CA-Wiederholungsmotiv angeordnet (+1788 - 2318), kann aber nur in Kombination mit einem weiteren Element in Nähe des Promotors (-1409 - 1109) seine Funktion wahrnehmen. Aus diesem Grund ist von einer hochkomplexen, basalen Transkriptionsregulation für *egfr* auszugehen. Diese Vermutung wird zudem durch Transkriptionsfaktorbindungsstudien an der 5'-Region unterhalb des Enhancers im Intron 1 V gestützt .

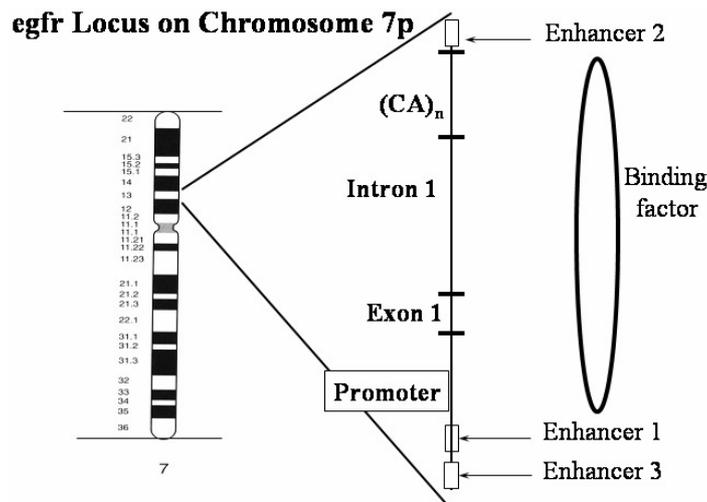


Abb. 6: 5'-Region des *egfr*-Gens <sup>48</sup>

Die basale Transkriptionsregulation wird durch Sp1 vermittelt. Zusätzlich ist ein funktionaler Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) an der Sp1-Erkennungsstelle bekannt (216G/T). Der Ersatz des G durch T bei Position -216 erhöhte die Promotoraktivität um 30% <sup>83</sup>. Dieser Befund hat möglicherweise einen Einfluss auf die Anwendung von anti-EGFR gerichteten Karzinomtherapien.

Studien zur Bedeutung der Transkriptionsfaktorexpression in Korrelation zu einem Ansprechen auf Chemotherapien wurden bislang nicht durchgeführt.

### **1.3.3 Einfluss einer polymorphen Sequenz im Intron 1 von *egfr* auf die Gentranskription**

Für *egfr* konnte wie auch für andere Gene gezeigt werden, dass das erste Intron eine zentrale Rolle in der Regulation des Gens hat <sup>13, 19</sup>. Speziell einer hoch polymorphen Sequenz mit einem CA-Wiederholungsmotiv von 14 bis 21 Wiederholungen kommt hierbei eine zentrale Rolle zu. Variationen in der Anzahl der CA-Wiederholungen in diesem Bereich waren mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen assoziiert. Die in vitro Transkriptionsaktivität nahm mit zunehmender Anzahl der CA-Wiederholungen ab. Als Erklärung wurde ein räumlicher Block durch ein „stem loop“ Strukturmotiv der DNA im Intron 1 diskutiert. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch in vitro die Länge des CA-Wiederholungsmotivs im Sinne einer allel-abhängigen Transkriptionsmodulation eine wichtige Rolle spielt. Mammakarzinome mit einer kurzen CA-Dinukleotidsequenz wiesen im Gegensatz zu Mammakarzinomen mit längeren CA-Sequenzen im Intron 1 von *egfr* eine signifikant höhere EGFR-Expression auf <sup>17, 48</sup>. Gleichsinnige Resultate wurden auch bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gefunden <sup>37</sup>.

Die Länge dieser polymorphen Sequenz zeigt jedoch starke, statistisch hoch signifikante Unterschiede in unterschiedlichen ethnischen Subgruppen <sup>82</sup>. In der Mikrosatellitenanalyse wiesen japanische Mammakarzinompatientinnen signifikant längere Allele auf (67% trugen Allele mit einer Länge von mehr als 18 CA-Wiederholungen). In Übereinstimmung mit den in vitro Daten hatten japanische Mammakarzinompatientinnen im Karzinom einen signifikant geringeren EGFR Gehalt (65 versus 36 fmol/mg Membranprotein) im Vergleich zu den deutschen Karzinompatientinnen <sup>18</sup>.

### 1.3.4 Amplifikationen von *egfr*

Amplifikationen von ganzen Genen oder Genabschnitten sind häufig gesehene Mechanismen in der Initiation und Progression von malignen Tumoren. Mit der Akquisition einer erhöhten Gendosis in Tumorzellen kann die Regulation der basalen Transkriptionsaktivität umgangen und ein Selektionsvorteil erworben werden. Eine erhöhte Expression des Genproduktes ist fast immer mit einer Genamplifikation, speziell auch bei *egfr*, und einer schlechten Prognose verbunden<sup>17, 74</sup>. Interessanterweise wurden *egfr* Amplifikationen, im Sinne von Amplifikationen von Intron 1-Sequenzen, als erste, initiale genetische „Hits“ beschrieben, da sie bereits auch im morphologisch normalem Gewebe (epithelial und stromal) neben Mammatumoren detektiert werden konnten<sup>72</sup>. Ob eine so genannte „fragile site“ im Bereich des genetischen Locus von *egfr* pathogenetisch hierbei eine Rolle spielt, ist derzeit noch unklar<sup>130</sup>.

Im interethnischen Vergleich konnte jedoch gezeigt werden, dass die Inzidenz von *egfr* Amplifikationen von der Länge des oben beschriebenen Polymorphismus abhängt. Japanische Mammakarzinompatientinnen zeigten eine signifikant höhere Amplifikationsinzidenz (7% gegen weniger als 1% in der FISH-Analyse)<sup>18, 74</sup>.

Neuere Arbeiten konnten zudem zeigen, dass Amplifikationen von *egfr* und *c-erbB-2* beim invasiven Mammakarzinom nicht synchron vorkommen<sup>109</sup>. Amplifikationen von *egfr* waren in seltenen metaplastischen Mammakarzinomen nachweisbar, sie betrafen allerdings nur umschriebene Regionen von *egfr*.

### 1.3.5 Bedeutung von EGFR in der Karzinogenese des Mammakarzinoms

Brandt et al. konnten zeigen, dass die konstitutive Überexpression von EGFR in einem Mausmodell mit der Entwicklung eines Mammakarzinoms assoziiert ist<sup>15</sup>. Aufgrund dieser Daten ist EGFR nicht nur als Progressionsmarker, sondern auch als Initiationsmarker zu verstehen. Bislang liegt erst eine Studie vor, welche die Länge des oben beschriebenen CA-Polymorphismus im Intron 1 von *egfr* mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziieren konnte. Der Nachweis von 2 Allelen mit einer Länge von  $\geq 19$  CA-Wiederholungen war mit einem signifikant erhöhten Karzinomrisiko in Mammakarzinompatientinnen mit einem familiären Hintergrund assoziiert. Auch

konnte ein Zusammenhang mit Ernährungsgewohnheiten beobachtet werden <sup>14</sup>. Dieser Befund wurde zuvor interessanterweise auch schon in einem Rattenmodell beschrieben

16.

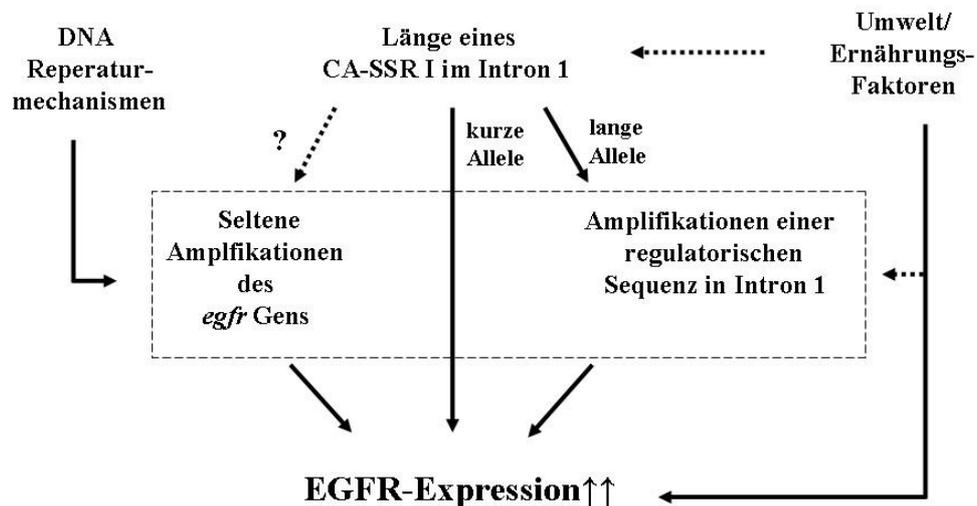


Abb. 7: Hypothetisches Modell der Regulation von EGFR in Abhängigkeit einer polymorphen Sequenz im Intron 1 von *egfr* und der Präsenz von Amplifikationen von oder im *egfr*-Gen <sup>18</sup>

### 1.3.6 Einfluss von EGFR-Expression und *egfr*-Genpolymorphismen auf chemotherapeutische Behandlungsergebnisse

In ersten Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von EGFR in Mammakarzinomen mit einem Versagen der anti-hormonellen Therapie assoziiert war <sup>58</sup>. Mit der Entwicklung von anti-EGFR gerichteten Behandlungsstrategien wurde jedoch sehr schnell offensichtlich, dass die bisherige Evaluation des EGFR-Proteinexpressionstatus nur sehr eingeschränkt Rückschlüsse auf ein mögliches Ansprechen auf die gerichtete Therapie zulassen. In einer Vielzahl von klinischen Phase II-Studien (Mammakarzinome, Ovarialkarzinome, Lungenkarzinome, Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereichs, Kolon- und Pankreaskarzinome) konnte teilweise auch eine Tumorregression in EGFR-negativen Karzinomen nachgewiesen werden <sup>23</sup>.

Kürzlich wurde ebenfalls von ersten Daten zu einer Korrelation des *egfr*-Polymorphismus im Intron 1 mit einem Ansprechen auf eine anti-EGFR gerichtete Therapie in kolorektalen Karzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs berichtet. Als Surrogatmarker wurde hierbei die Inzidenz von Hautausschlägen als Reaktion auf eine anti-EGFR Therapie herangezogen, welche bei Patienten mit kurzen Allelen deutlich häufiger auftraten <sup>2</sup>. Interessanterweise konnte eine Korrelation zwischen dem chemotherapeutischen Ansprechen und der Polymorphismuszusammensetzung auch bei der Anwendung einer konventionellen Chemotherapie nachgewiesen werden <sup>139</sup>.

### Ansatzpunkte anti-EGFR-gerichteter Therapien

<b>EGFR</b>	monoklonale Antikörper	chimär Erbitux <sup>®</sup> , humanisiert h-R3, Ratte EMD 55700
	synthetische, reversible Tyrosinkinaseinhibitoren	ZD1839 Iressa <sup>®</sup> , OSI774 Tarceva <sup>®</sup>
<b>EGFR</b>	synthetische, reversible Tyrosinkinaseinhibitoren	PKI 166, GW 572016
<b>c-erbB2</b>		
<b>c-erbB4</b>	synthetische, irreversible Tyrosinkinaseinhibitoren	CI 1033
<b>EGF- Immunisierung</b>	rekombinante EGF-Vakzine	EGF-P64K
<b>präklinische Studien</b>		
Antikörper gegen mutiertes EGFR, bispezifische Antikörper, toxin-konjugierte Liganden, „antisense“-Strategien		

**Abb. 8: Übersicht über derzeit in präklinischen und klinischen Phase I-III-Studien verwendeten anti-EGFR gerichteten Substanzen <sup>23</sup>**

### 1.3.7 Methodische Ansätze zur Bestimmung der EGFR-Expression

Zur Bestimmung des EGFR-Expressionsstatus wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von methodischen Ansätzen beschrieben. Hierbei muss grundsätzlich zwischen in situ Methoden und so genannten extraktiven Methoden unterschieden werden. In situ Methoden wie die Immunhistochemie oder die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) haben hierbei den Vorteil, dass sie an Gewebsschnitten (Paraffin- oder

Frischmaterial) durchgeführt werden können und somit auch eine intratumorale Heterogenität erfassen können. Der Vorteil von extraktiven Methoden wie einem Western- und Northern-Blot Verfahren, der RT-PCR, der ELISA-Technik und der Durchflusszytometrie ist in einer besseren Quantifizierbarkeit der EGFR-Expression zu sehen. Allerdings werden die Vorteile durch eine immense technische Komplexität und die Begrenzung auf Frischmaterial eingeschränkt. Letzteres ist speziell bei klinischen Multicenter-Studien als Limitation zu betrachten. Vor diesem Hintergrund wird derzeit der immunhistochemische Nachweis von EGFR als wichtigste Methode zur Bestimmung des EGFR-Expressionsstatus betrachtet, wengleich auch mit dieser Methode viele ungelöste Probleme verbunden sind. Ein wesentliches Problem ist in der fehlenden Standardisierung der immunhistochemischen Färbung sowie der Quantifizierung der Ergebnisse zu sehen. Für EGFR wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von immunhistochemischen „Scores“ postuliert. Dies ist letztendlich auch als Schwäche der publizierten Studien einzustufen, denn die damit verbundene schlechte Vergleichbarkeit weist auf grundlegende, ungelöste Probleme in der Bestimmung der EGFR-Expression hin<sup>25</sup>.

Reference	Proportion of stained cells	Intensity of staining	Overall score
Cunningham [15]	<ul style="list-style-type: none"> <li>≤10%</li> <li>&gt;10–≤20%</li> <li>&gt;20–≤35%</li> <li>&gt;35%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Faint</li> <li>Weak or moderate</li> <li>Strong</li> </ul>	None given
Hirsch [12]	Continuous variable from 0% to 100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>Negative or trace = 1</li> <li>Weak = 2</li> <li>Moderate = 3</li> <li>Strong = 4</li> </ul>	Proportion of positive cells multiplied by intensity to give range of 0–400, with expression classified as: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0–200 negative or low</li> <li>• 201–300 intermediate</li> <li>• 301–400 high</li> </ul>
Kersemaekers [11]	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 no positive tumour cells</li> <li>1 (1–25%)</li> <li>2 (26–50%)</li> <li>3 (51–75%)</li> <li>4 (76–100%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 no staining</li> <li>1 weak staining</li> <li>2 moderate staining</li> <li>3 strong staining</li> </ul>	Scores for proportion and intensity added to give range 0 and 2–7 and classified as: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 negative</li> <li>• 2–3 weak</li> <li>• 4–5 moderate</li> <li>• 6–7 strong</li> </ul>
Scartozzi [13]	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;1% of tumour cells with membrane staining</li> <li>≥1% of tumour cells with membrane staining</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Weak, faint brown = 1+ Moderate, brown of intermediate darkness = 2+</li> <li>Strong, dark brown/black = 3+</li> </ul>	Positive or negative based only on the proportion of stained cells classification
Spano [14]	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grade 0 (none)</li> <li>Grade 1 (1–25%)</li> <li>Grade 2 (25–50%)</li> <li>Grade 3 (&gt;50%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Negative = 0</li> <li>Weak = 1</li> <li>Moderate = 2</li> <li>Strong = 3</li> </ul>	Grade multiplied by intensity to give range of 0–9: <ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;6 low expression</li> <li>• &gt;6 high expression</li> </ul>

**Abb. 9: Übersicht über die verschiedenen Scoringmethoden zum immunhistochemischen Nachweis von EGFR<sup>25</sup> und ihre stark differierenden Auswertestrategien**

Die oben aufgeführten, teilweise stark differierenden, immunhistochemischen Auswertungsscores zur Evaluation der EGFR-Expression erklären teilweise die unterschiedlichen Ergebnisse. Darüber hinaus geben sie aber auch einen Hinweis darauf, dass die verschiedenen verwendeten Antikörper große Unterschiede aufweisen. Ob dies mit unterschiedlichen Vorbehandlungsprotokollen, einer differierenden Gewebsvorbehandlung oder variierenden Antikörpersensitivitäten beziehungsweise Antikörperspezifitäten zusammenhängt, ist derzeit noch eine ungeklärte Frage. Erste vergleichende Daten von Sauter et al. an einer Vielzahl von Tumorentitäten weisen aber darauf hin, dass der Klärung dieser Frage in der Zukunft eine sehr wichtige Rolle zukommen wird. So konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass bei einzelnen Tumorarten Antikörper-abhängige Expressionsraten von bis zu 50% Unterschied auftraten<sup>115</sup>. Die gesundheitsökonomische Konsequenz und die damit verbundene Unsicherheit in der Therapieprädiktion sind offensichtlich.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die Expression von EGFR ist sowohl beim invasiven Mammakarzinom als auch einer Vielzahl weiterer Karzinome mit einer schlechten Prognose assoziiert. Mit der Einführung von molekular basierten Therapieschemata, wie synthetischen Hemmstoffen oder eines humanisierten Antikörpers, ist die Bestimmung des EGFR-Gehalts in einer Tumorprobe in der Zukunft ein wichtiger prognostischer und prädiktiver Parameter. Die derzeitigen immunhistochemischen Verfahren sind nicht standardisiert und beruhen auf den Ergebnissen verschiedener Antikörper.

In dieser Arbeit soll:

- die Expressionshäufigkeit mittels dreier verschiedener kommerziell erhältlicher EGFR-Antikörper getestet werden,
- eine Korrelation mit konventionellen klinisch-pathologischen Parametern gezogen werden
- eine Korrelation der EGFR-Expression mit der Expression weiterer Differenzierungs- und Prognoseparameter gezogen werden, um in
- einem weiteren Schritt mittels der biomathematischen Clusteranalyse einen neuen Ansatz der Spezifitätsbestimmung zu evaluieren.

Es ist Ziel der Arbeit, Hinweise auf die Sensitivität und Spezifität verschiedener Antikörper zu bekommen, um damit langfristig Grundlagen für die Etablierung eines robusten immunhistochemischen Evaluationsprotokolls zu schaffen.

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Tumorkollektiv**

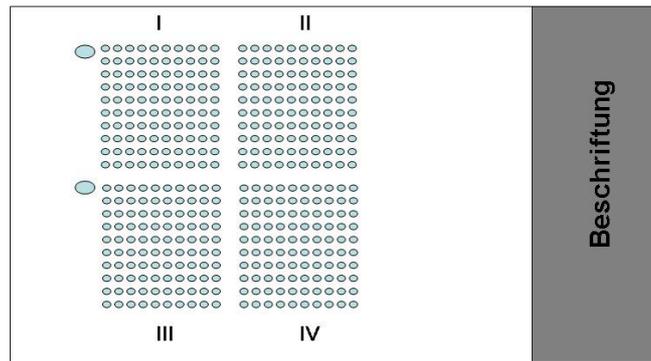
Es wurde das in Paraffin eingebettete Tumorgewebe von 725 Patienten mit invasivem Mammakarzinom untersucht. Das Paraffinmaterial wurde vom Institut für Pathologie am Städtischen Klinikum Osnabrück (Chefarzt Prof.Dr. Krech) zur Verfügung gestellt. Die Proben dieser Patienten wurden am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster erneut begutachtet (Prof.Dr. Bürger).

Die Tumorklassifikation und Tumorgraduierung erfolgte analog der TNM-Klassifikation der UICC, beziehungsweise dem Graduierungsschema von Elston und Ellis.

Insgesamt handelte es sich um 146 Grad 1, 345 Grad 2 und 234 Grad 3 Karzinome. In 378 Fällen lag ein T1, in 271 Fällen ein T2, in 36 Fällen ein T3 und in 39 Fällen ein T4-Stadium vor. Eine Lymphknotenbeteiligung fand sich in 334 Fällen.

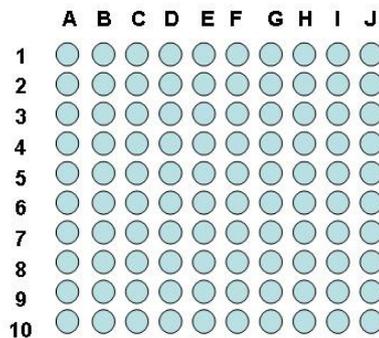
### **2.2 Erstellung der Tissue Microarrays**

Von allen Blöcken wurde ein neuer, aussagekräftiger HE-Schnitt angefertigt. In einem weiteren Schritt erfolgte die Kennzeichnung des tumortragenden Gewebeanteils mittels eines Markierstiftes auf dem Objektträger durch einen erfahrenen Pathologen (Prof.Dr. Bürger). Die Journalnummern der Blöcke, bzw. HE-Schnitte wurden nach Jahreszahlen und numerischer Reihenfolge angeordnet und anschließend in eine Excel-Datenmaske übertragen. Die Feldbezeichnung folgte dabei dem folgendem Schema:



**Abb. 10: Schematischer Aufbau von Tissue-Microarrays**

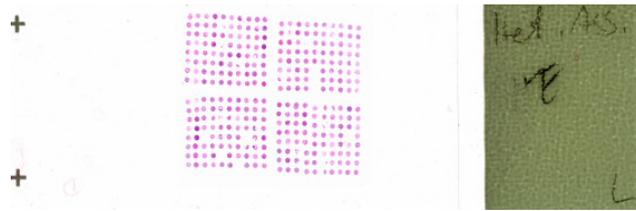
Jeder Akzeptorblock enthielt maximal vierhundert Biopsien. Diese wurden in vier Segmente mit jeweils einhundert Biopsien untergliedert und mit römischen Ziffern (I-IV) durchnummeriert. In den ersten Biopsien (A1) der I. und III. Blöcke wurde zur besseren Orientierung ein Kontrollgewebe aufgebracht. Die Segmentblöcke setzten sich aus jeweils 10 mal 10 Feldern zusammen. Hierbei wurden die horizontalen Reihen alphabetisch (A-J), die vertikalen Spalten numerisch (1-10) gekennzeichnet.



**Abb. 11: Detailaufbau von Tissue-Microarrays mit exemplarischem Koordinatensystem**

Pro Primärtumor wurden zwei Stenzen mit einem Durchmesser von jeweils 0,6 mm entnommen. Diese 2 Biopsien wurden benachbart in den jeweiligen Akzeptorblock eingebracht. Der Abstand zwischen den einzelnen Stenzen betrug 0,8 mm. Bei 725 Tumorproben ergaben sich insgesamt 1450 Stenzen. Für die Erstellung der Arrays





**Abb. 14:** Beispiel eines Gewebemikroarrays nach vollständiger Fertigstellung. Die Verlustrate einzelner Stanzen ist schon in der Übersicht über den gesamten Block sehr gering.

## **2.3 Allgemeines immunhistochemisches Färbeprotokoll**

### **2.3.1 Schnitthanfertigung**

Der erste Schritt besteht aus der Anfertigung von 3-4 µm dicken Gewebsschnitten an einem Rotationsmikrotom und einem Aufbringen der Schnitte in einem Wasserbad auf Glasobjektträger (Super Frost Plus Objektträger).

### **2.3.2 Entparaffinisierung der Schnitte**

Die Entparaffinisierung dient der Freilegung der Epitope für die weitergehende immunhistochemische Prozedur.

Sie besteht aus den folgenden Schritten:

- einer Inkubation für 2 x 10 min in Xylol,
- einer Inkubation für 2 x 1 min in 99%igem Alkohol,
- einer Inkubation für 1 x 1 min in 96%igem Alkohol,
- einer Inkubation für 1 x 1 min in 80%igem Alkohol,
- einer Inkubation für 1 x 1 min in 70%igem Alkohol,
- der dreimalige Spülung mit Aqua dest.

### **2.3.3 Vorbehandlung**

Die Vorbehandlung mittels Hitze oder Enzymen soll eine Freilegung der Antigenepitope, speziell nach vorheriger Formalindenaturierung fördern.

Generell wurden zwei verschiedene, Antikörper-abhängige Vorbehandlungsverfahren gewählt (siehe *Tab. 3*: Auflistung der verwendeten Antikörper):

1. Hitzevorbehandlung: Dies beinhaltet eine Inkubation für 30 Minuten in einem Dampfgerät, dem so genannten Steamer ( Firma Braun ) im Citratpuffer bei einem pH von 6,0. Es erfolgt ein Abkühlen der Gewebsschnitte bei Raumtemperatur und ein anschließendes Spülen im Puffer.
2. Enzymatische Vorbehandlung: Dies besteht aus einer 10-minütigen Inkubation der Gewebsschnitte im Gerät bei Verwendung der Proteinase K, bzw. 6-minütiger Inkubation der Schnitte mit Protease 1.

#### **2.3.4 Immunhistochemisches Protokoll**

Als Färbemethode wurde die LSAB/AP-Methode im Dako Autostainer gewählt. Diese Methode beruht auf einem indirekten Streptavidin-Biotin-Verfahren, welches eine hohe Sensitivität aufweist. Der biotinylierte, sekundäre Antikörper reagiert sowohl mit den Immunglobulinen von der Maus als auch von denen des Kaninchens. Das sekundäre Antikörper-Reagenz ist durch einen Spacerarm aus 7 Atomen optimal mit Biotin markiert. Jedes biotinylierte Antikörpermolekül kann somit mit mehreren mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidin-Molekülen reagieren.

Die einzelnen Arbeitsschritte setzen sich wie folgt zusammen:

1. Primärer Antikörper (Ak): Inkubation für 25 min mit anschließendem Spülen mit Puffer
2. Sekundärer Ak ( Link/AP ): Inkubation für 20 min mit anschließendem Spülen mit Puffer
3. Sekundärer Ak ( Strept/AP)(Dako): Inkubation für 20 min mit anschließendem Spülen mit Puffer
4. Chromogen, Fast Red (Dako): Inkubation für 2x8 min, anschließend Spülen Aqua dest. und Puffer. Die endogene alkalische Phosphatase wird durch Zugabe von Levamisol blockiert
5. Die manuelle Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer erfolgt für 2-5 min
6. Nachfolgend werden die Schnitte gebläut und anschließend für 5 min gewässert.

7. Nachfolgend werden die Schnitte in Aqua dest. nochmals kurz gewässert und dann durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol gezogen:
  - 1x 70% Alk.,
  - 1x 80% Alk.,
  - 1x 96% Alk.,
  - 2x 99% Alk.,
  - 2x Xylol
8. Das Eindeckeln der Schnitte zur dauerhaften Konservierung erfolgt aus dem Xylol heraus mit Vitro Clud.

### **Immunhistochemisches Protokoll EGFR Ventana**

Bei dem Antikörper handelt es sich um einen „ready-to-use“-Antikörper (Klon 3C6) mit vorgegebener Verdünnung auf dem Ventanafärbemodul des Ventana Benchmark.

Das Protokoll ist maschinell vorgegeben und beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

1. mit I-View INHIBITOR für 4 min inkubieren
2. Objektträger waschen
3. mit Protease 1 für 6 min inkubieren
4. Objektträger waschen
5. Primärantikörper EGFR für 32 min inkubieren
6. Objektträger waschen
7. mit I-VIEW BIOTIN Ig für 8 min inkubieren
8. Objektträger waschen
9. mit I-VIEW SA-HRP für 8 min inkubieren
10. Objektträger waschen
11. mit I-VIEW DAB und I-VIEW H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 8 min inkubieren
12. Objektträger waschen
13. I-VIEW COPPER für 4 min inkubieren
14. Objektträger waschen

Die Objektträger werden mit Hämatoxylin gegen gefärbt und konventionell eingedeckt.

## 2.4 Verwendete Primärantikörper

Folgende Primärantikörper wurden verwendet: (Aufgeführt sind der Marker, die Bezugsquelle, der Klon, die Verdünnung sowie die Vorbehandlung)

Marker	Bezugsquelle	Klon	Verdünnung	Vorbehandlung
<b>Ck5/6</b>	Dako	D5/16B4	1:50	Hitzevorbehandlung
<b>Ck14</b>	Dianova	LL002	1:50	Hitzevorbehandlung
<b>Vimentin</b>	Dako	V9	1:5000	Hitzevorbehandlung
<b>p53</b>	Dako	DO-7	1:2000	Hitzevorbehandlung
<b>c-ErbB-2</b>	Dako	polyclonal	1:2000	Hitzevorbehandlung
<b>bcl-2</b>	Dako	124	1:500	Hitzevorbehandlung
<b>CyclinD1</b>	DCS	SP4	1:25	Hitzevorbehandlung
<b>EMA</b>	Dako	E29	1:2000	Hitzevorbehandlung
<b>Ck19</b>	Quartett	KS19.1	1:500	Hitzevorbehandlung
<b>Ck8/18</b>	Dianova	5D3	1:40	Hitzevorbehandlung
<b>ER</b>	Dako	1D5	1:100	Hitzevorbehandlung
<b>PR</b>	Dako	PgR636	1:2000	Hitzevorbehandlung
<b>EGFR</b>	Dako	H11	1:200	Enzymatische Vorbehandlung
<b>EGFR</b>	Zytomed	H11	1:100	Enzymatische Vorbehandlung
<b>EGFR</b>	Ventana	3C6	ready-to-use	Siehe immunhistochemisches Protokoll EGFR Ventana

**Tab. 3: Auflistung der verwendeten Antikörper**

Die Austestung der EGFR-Antikörper erfolgte an einem Plattenepithelkarzinom. Sowohl die Optimierung der Vorbehandlungsprotokolle als auch der Antikörperkonzentration erfolgte mit dem Ziel für alle drei Antikörper eine vergleichbare Anzahl positiver Tumorzellen und gleiche Immunoreaktivität zu erreichen.

## 2.5 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte semiquantitativ an einem Olympus-Mikroskop (BX51) bei zehnfacher (10x) und zwanzigfacher (20x) Vergrößerung. Die entsprechenden Kategorisierungen sind unten dargestellt.

	Kategorisierung nach dem Prozentsatz positiver Zellen			
Antikörper	0	1	2	3
CK 5/6	negativ	0,5- 10,5%	11- 50,5%	51- 100%
CK 8/18	negativ	0,5- 30,5%	31- 70,5%	71- 100%
CK 14	negativ	0,5- 10,5%	11- 40,5%	41- 100%
CK 19	negativ	0,5- 30,5%	31- 70,5%	71- 100%
ER	negativ	0,5- 10,5%	11- 50,5%	51- 100%
PR	negativ	0,5- 10,5%	11- 50,5%	51- 100%
bcl-2	negativ	0,5- 50,5%	51- 90,5%	91- 100%
Cyclin D1	negativ	0,5- 30,5%	31- 60,5%	61- 100%
Ki-67 (Mib-1)	negativ	0,5- 10,5%	11- 100%	
EMA	negativ	0,5- 30,5%	31- 70,5%	71- 100%

	Kategorisierung nach der Anfärbeintensität			
Antikörper	0	1	2	3
c-ErbB-2	negativ	schwach	mittel	stark

		Kategorisierung nach dem Prozentsatz positiver Zellen und nach der Anfärbeintensität			
Antikörper		0	1	2	3
p53	Prozentsatz	0- 9,5%	10- 30%	30,5- 60%	60,5- 100%
	Anfärbung	negativ	schwach	mittel	stark

**Tab. 4: Kategorisierung der Antikörper**

Weil für EGFR nur postulierte, bisher jedoch nicht validierte immunhistochemischen (IHC)-Scores vorliegen, wurde für die biomathematische Clusteranalyse die Kategorisierung der drei gewählten EGFR Antikörper nur in positiv bzw. negativ unterschieden. Als positiv wurde jegliche membranöse Reaktion in mindestens 1% der Zellen betrachtet. Eine darüber hinaus in der 10-fachen Vergrößerung erkennbare Membranreaktion wurde als stark positiv definiert.

Die generelle Problematik eines IHC-Scores für EGFR wird im Ergebnis-Teil diskutiert.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Chi<sup>2</sup>-Test und der Korrelationsanalyse (Auswertungsprogramm SPSS für Windows, Release 11.0.1 der Firma SPSS Inc.).

## 2.6 Biomathematische Clusteranalyse

Die biomathematische Clusteranalyse erfolgte in enger Kooperation mit Herrn Dr. Korsching, Molekularpathologisches Labor des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie. Die immunhistochemischen Daten wurden anhand der oben beschriebenen immunhistochemischen Scores gesammelt und in ein Excel-Datenblatt übertragen. Anschließend wurden sie kategorisiert, um eine biomathematische Analyse zu ermöglichen. Die ursprünglichen immunhistochemischen Scores reichten von 0 bis 3, bzw. 0 und 1 und wurden in 1-4, bzw. 1 und 2 transferiert, um die Zahl 0 in der biomathematischen Analyse zu vermeiden. Fehlende immunhistochemische Daten (9% aller Daten) wurden mit dem spezifischen Median des jeweiligen Markers ersetzt. Die Kontrolluntersuchungen zeigten, dass diese Herangehensweise ein robustes Verfahren darstellt und ein Bias der Ergebnisse nicht stattfindet. Die hierarchische Clusteranalyse basiert generell auf der Abstandsmessung der Korrelationskoeffizienten. Die Clusteranalyse wurde auf der Statistikplattform SPlus6-r2 durchgeführt. Eine Visualisierung der Ergebnisse erfolgte graphisch mittels Dendrogrammen der untersuchten Marker<sup>79</sup>.

### **3 Ergebnisse**

Die drei verschiedenen EGFR-Antikörper wiesen ein zum Teil deutlich differierendes Färbeverhalten auf. Bei allen Antikörpern wurde ein vorwiegend membranöses Färbemuster gesehen. In einzelnen Fällen (<5%) konnte auch eine intrazytoplasmatische Färbung gesehen werden. Hierbei bestand aber in allen Fällen ein vergleichsweise starker unspezifischer Hintergrund.

#### **Dako**

Nur 2.1% aller Mammakarzinome waren positiv für EGFR. Weit weniger als 1% aller Karzinome zeigte eine starke Immunoreaktion. Ein EGFR-Nachweis in Myoepithelzellen des normalen Brustdrüsengewebes oder in einem DCIS wurde in keinem der Fälle gesehen.

#### **Zymed**

5.7% aller Fälle wiesen eine Positivität für EGFR auf. (4.0% schwach, 1.7% stark positiv). Myoepithel- und Stromazellen waren konstant negativ.

#### **Ventana**

10.1% aller Fälle waren schwach positiv für EGFR, 5.8% zeigten eine starke Immunoreaktivität für EGFR. Zudem konnte eine variierende EGFR-Expression in Myoepithelzellen und in stromalen Myofibroblasten detektiert werden. Allerdings zeigte eine Vielzahl der Fälle eine vergleichsweise starke, unspezifische Hintergrundfärbung.

#### **Vergleich der verschiedenen Antikörper**

62 Fälle mit fehlender Immunoreaktivität für EGFR unter Verwendung des Dako-Antikörpers zeigten eine Immunoreaktivität bei Gebrauch des Ventana-Antikörpers (schwach n=55, stark n=7). 18 Fälle mit fehlendem EGFR-Nachweis unter Verwendung des Zymed-Antikörpers waren positiv unter Gebrauch des Ventana-Antikörpers. (schwach n=16, stark n=2). Alle Fälle, die bei Dako als stark positiv gewertet wurden, waren auch unter Verwendung der beiden anderen Antikörper stark positiv.

Interessanterweise zeigten zwei komplett negative Fälle bei Dako eine starke Immunoreaktivität bei Zymed and Ventana.

In keinem der Fälle wurde bei Negativität für EGFR im Ventana-Test eine wie auch immer geartete Reaktivität für EGFR unter Verwendung der beiden anderen Antikörper gesehen.

Für alle Antikörper konnten hoch signifikante inverse bzw. positive Korrelationen zwischen der EGFR-Expression und dem Östrogenrezeptor ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.0001$  für Ventana;  $r = -0.41$ ,  $p < 0.0001$  für Zymed and  $r = -0.27$ ,  $p < 0.0001$  für Dako), bzw. Cytokeratin 5 ( $r = 0.53$ ,  $p < 0.0001$  für Ventana;  $r = 0.44$ ,  $p < 0.0001$  für Zymed;  $r = 0.36$ ,  $p < 0.0001$  für Dako) gesehen werden.

### **Klinisch-pathologische Korrelationen**

Die Expression von EGFR war bei keinem der Antikörper mit der Tumorgröße (T der TNM Klassifikation) korreliert.

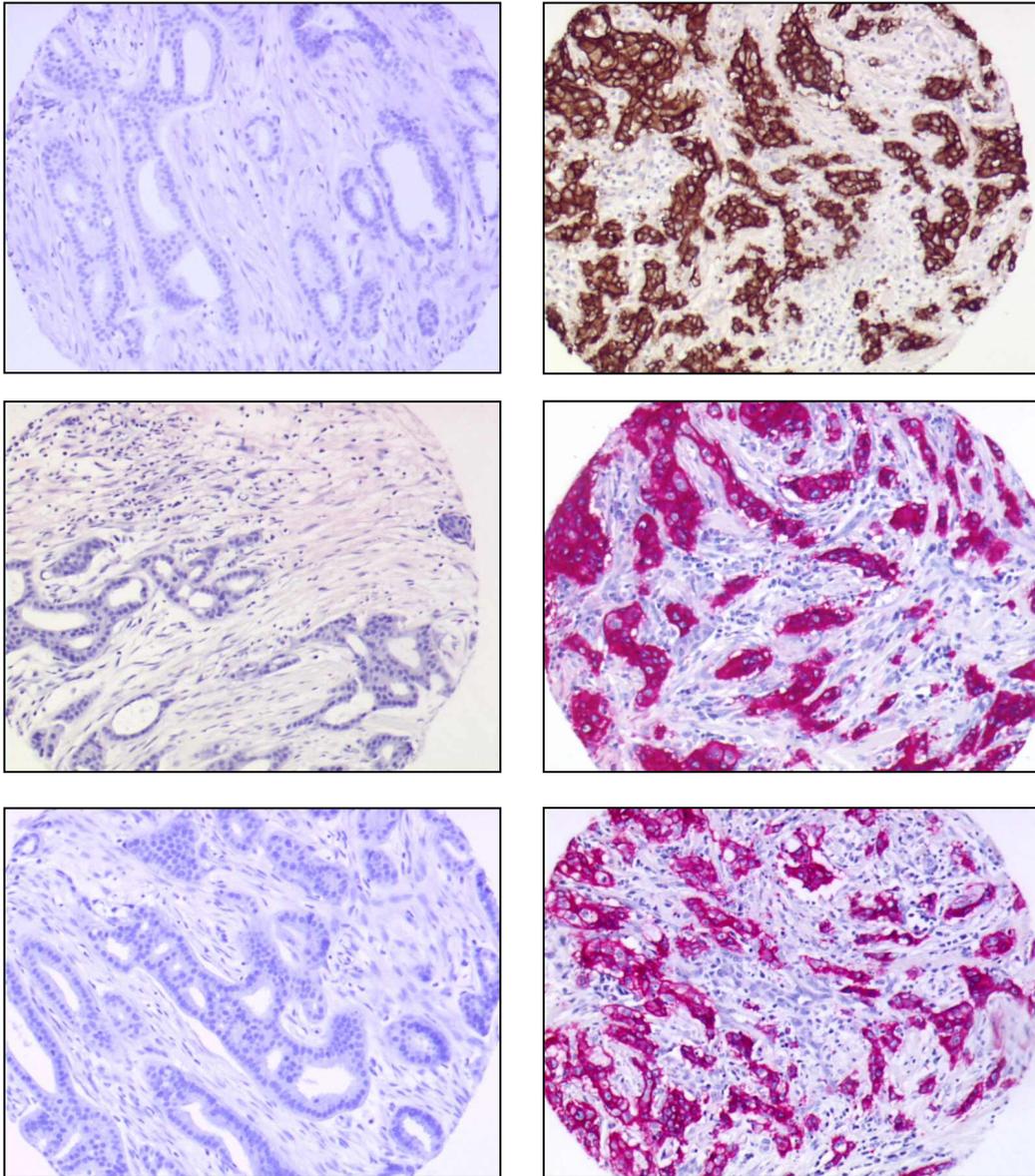
Im Gegensatz hierzu zeigte die Korrelation des EGFR mit der Lymphknoteninfiltration (N-Kategorie der TNM Klassifikation) eine Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper. Es konnte keine Korrelation für den Ventana-Antikörper nachgewiesen werden ( $p = 0.06$ ). Hingegen zeigte EGFR bei Dako ( $p = 0.002$ ) und Zymed ( $p = 0.02$ ) eine Korrelation mit dem Lymphknotenstatus.

Für das Tumorgrading konnte eine hoch signifikante Korrelation mit dem Ventana-Antikörper gesehen werden ( $p < 0.0001$ ). Zwar signifikant, doch mit einem höheren p-Wert assoziiert, korrelierten der Dako- und der Zymed-Antikörper ( $p < 0.04$  bzw.  $p < 0.01$ ).

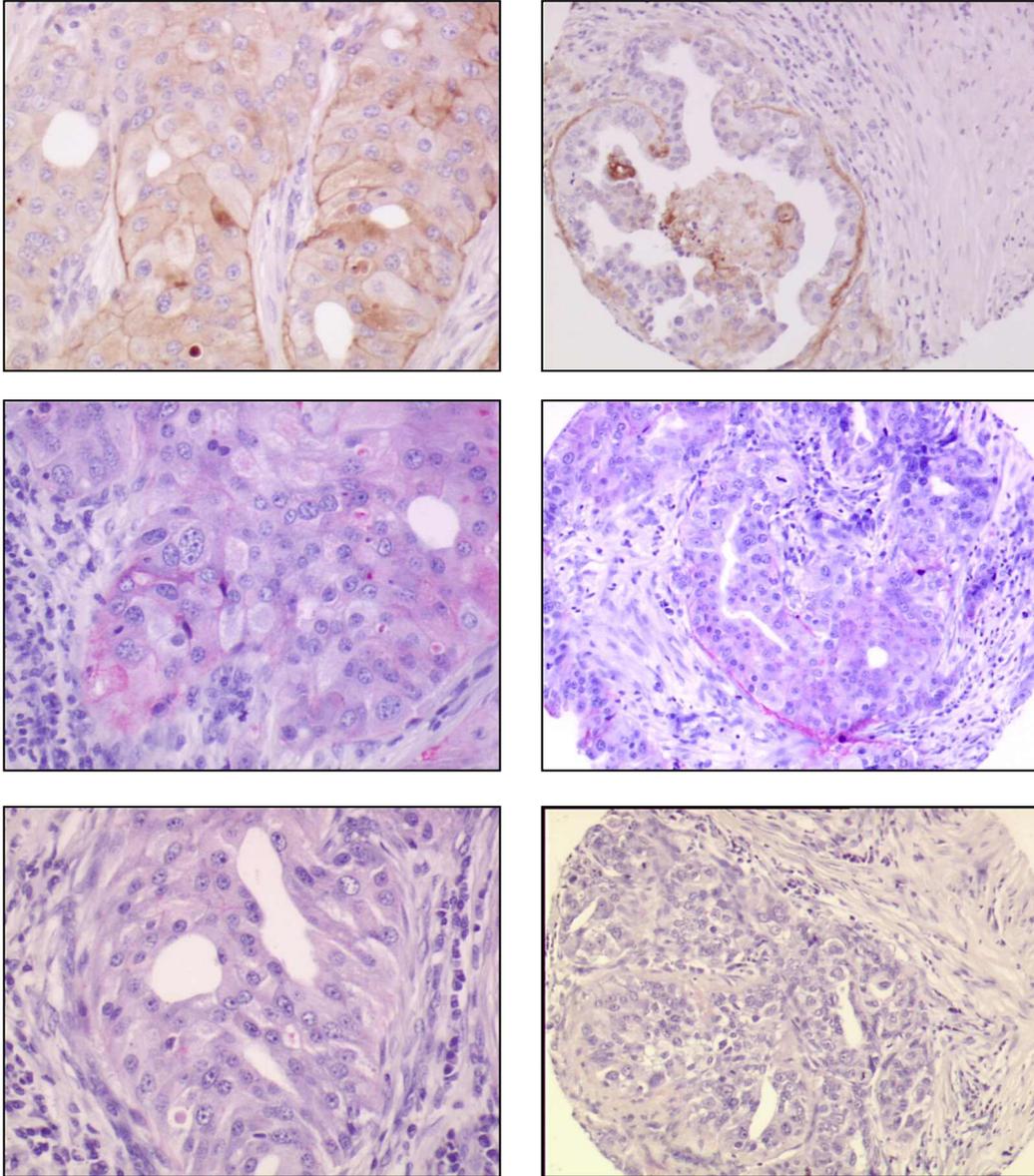
	Ventana	Zymed	Dako	Ventana	Zymed	Dako
Färbeintensität	absolut			relativ		
negativ	491/584	547/580	564/576	84.1%	94.3%	97.9%
schwach positiv	59/584	23/580	11/576	10.1%	4.0%	1.9%
stark positiv	34/584	10/580	1/576	5.8%	1.7%	0.2%

**Tab. 5: Übersicht über die Häufigkeit der Expression von EGFR in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper**

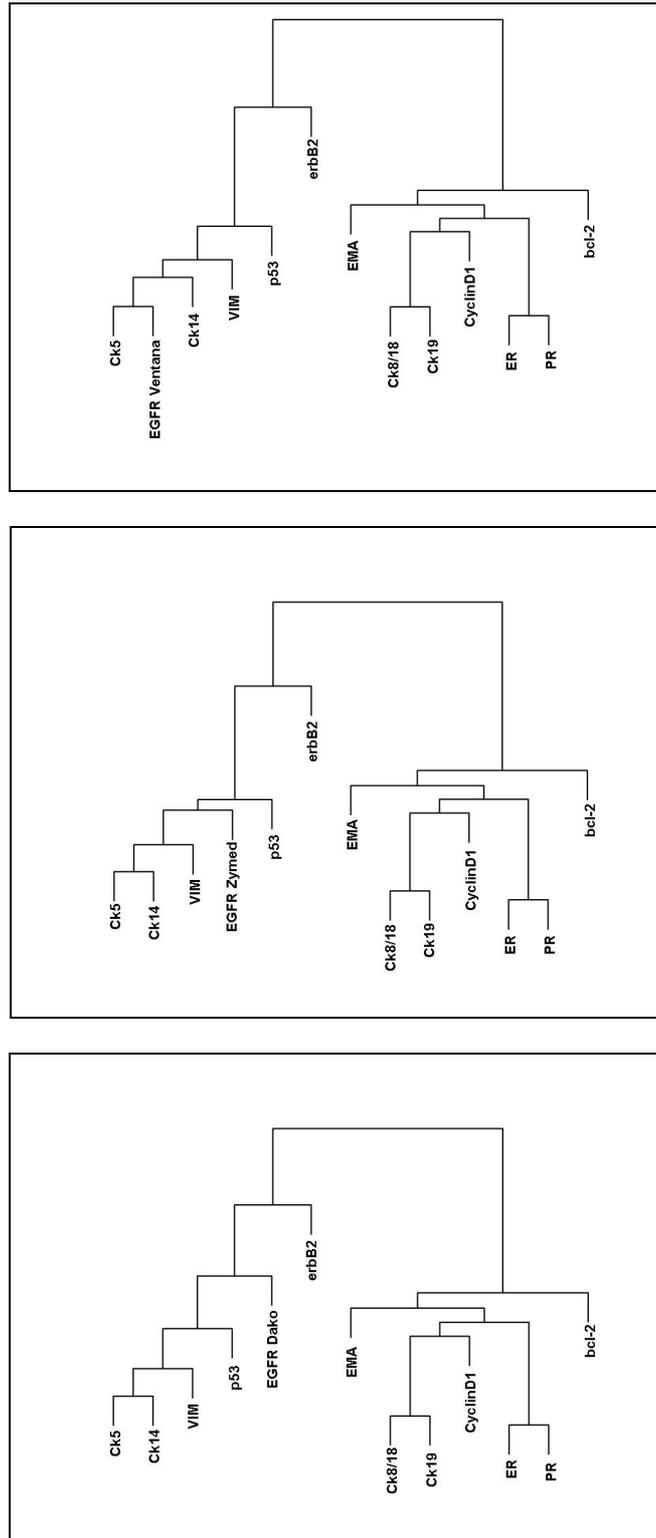
Die biomathematische Clusteranalyse ergab unter Verwendung aller drei Antikörper ein nahezu identisches Resultat. In der Einzelanalyse zeigte sich ein Clustern aller drei Antikörper mit den Markern CK 5, CK 14, p53 und Vimentin. In der Analyse aller Marker mit den drei EGFR-Antikörpern zeigten die drei EGFR-Antikörper ein unmittelbares direktes Nebeneinander zu sich als auch erneut zu CK 5, CK 14, p53 und Vimentin.



**Abb. 15:** Repräsentative Abbildungen von Mammakarzinomen mit fehlender Expression von EGFR (linke Reihe), bzw. starker Expression von EGFR (rechte Spalte). Die obere Reihe zeigt die Reaktion mit dem Ventana-Antikörper, in der mittleren Reihe der Zymed-Antikörper und unten der Dako-Antikörper.



**Abb. 16:** Repräsentative Abbildungen von Mammakarzinomen mit schwacher, aber klar erkennbarer Expression von EGFR (Ventana, obere Reihe) in zwei Fällen. Eine fokal schwache, aber membranbetonte Reaktion kann auch mit dem Zymed-Antikörper nachgewiesen werden (mittlere Reihe). Die Reaktion mit dem Dako-Antikörper fällt negativ aus (untere Reihe). Interessanterweise ist die Reaktion in den Myoepithelzellen auch bei Ventana und Zymed positiv.



**Abb. 17:** Darstellung der Clusteranalyse der 12 Markergene in Bezug zu den jeweiligen EGFR-Antikörpern. Grundsätzlich stellen sich zwei große Clusterarme dar. Die jeweiligen EGFR-Antikörper stehen in allen Ansätzen in direktem Bezug zu basalen Zytokeratinen, Vimentin und p53.

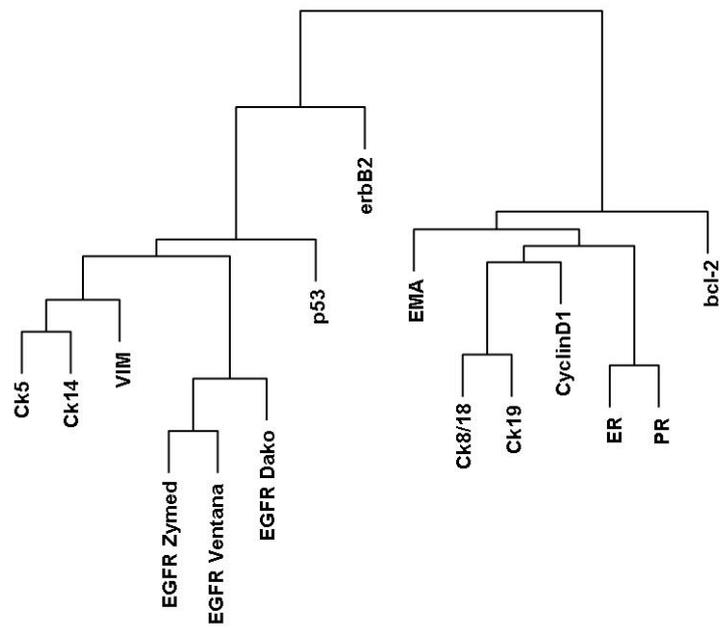


Abb. 18: Darstellung der Clusteranalyse der 12 Markergene in Bezug zu allen drei EGFR-Antikörpern. Alle drei Antikörper zeigen ein gleichsinniges Verhalten und „clustern“ in einem eigenen Arm.

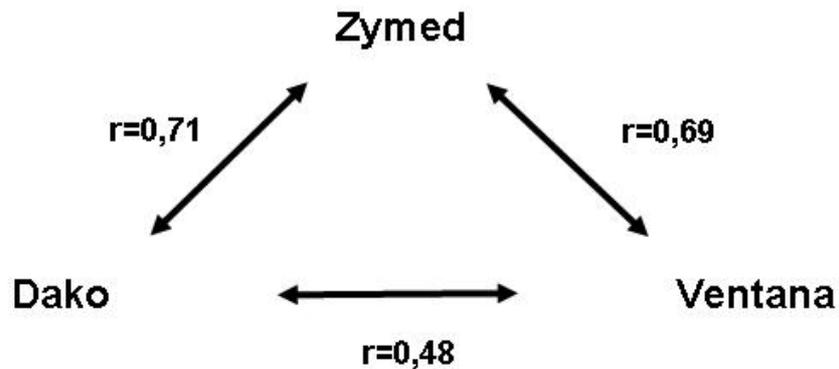


Abb. 19: Korrelation der EGFR-Antikörper untereinander. Der Korrelationskoeffizient bewegt sich in einem Bereich zwischen 0,48 und 0,71 auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0.001$ .

## 4 Diskussion

Membrangebundene Rezeptortyrosinkinasen stellen ideale Zielstrukturen für innovative, spezifische, molekular gerichtete Therapieformen für zahlreiche maligne Neoplasien dar<sup>4, 43</sup>. c-ErbB-2/HER2-neu stellt in dieser Hinsicht den Prototyp einer gerichteten, in diesem Fall Antikörper-basierten Therapieform des invasiven Mammakarzinoms dar. Der Erfolg dieser speziellen Therapieform, aber auch für alle weiteren molekular gerichteten Therapien, ist eng mit einer exakten Therapieprädiktion verbunden. Erleichtert wurde dies bei c-ErbB-2 insbesondere durch die Verfügbarkeit eines standardisierten Tests (Herceptest), bzw. eines Testalgorithmus<sup>61</sup>. Für *c-erbB-2/HER2-neu*, wurde ein Testalgorithmus etabliert, welcher in einem ersten Schritt aus einem immunhistochemischen Screening im Sinne einer Quantifizierung der Expression besteht<sup>8</sup>. Unterschieden wurden Patientinnen mit negativer (fehlende oder schwache Expression) oder positiver Expression (intermediärer oder starker Expression). Während Patientinnen mit starker Expression automatisch als Herceptin sensibel eingestuft werden, wird bei Patientinnen mit intermediärer Expression ein zweiter Verifikationsschritt angeschlossen<sup>104</sup>. Dieser besteht aus einer Gendosismessung von *c-erbB-2* mittels der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) für die Detektion von *c-erbB-2*-Amplifikationen. Mittels dieses etablierten Prädiktionsschemas konnten mittlerweile von unterschiedlichen, internationalen Arbeitsgruppen signifikante Behandlungsergebnisse erzielt werden<sup>69</sup>

Für EGFR, dem schon wesentlich länger bekannten Schwestermolekül von c-ErbB-2 stellt sich die Situation völlig unterschiedlich, derzeit unübersichtlich und kompliziert dar. Das Beispiel von EGFR zeigt geradezu exemplarisch die Hindernisse, welche sich in der Etablierung von molekular gerichteten Therapien und der damit notwendigen Therapieprädiktion ergeben<sup>43</sup>.

Basierend auf den Angaben aus der Literatur zeigt die Expression von EGFR beim invasiven Mammakarzinom eine sehr große Schwankungsbreite. Unter Verwendung eines so genannten ELISA-Tests (“enzyme-linked-immunosorbent-assay”) sind bis zu 40% aller Mammakarzinome durch eine EGFR-Überexpression charakterisiert<sup>89</sup>. Die Schwächen dieser Studien waren in nicht standardisierten Tests zu sehen, und dementsprechend schwankte der Schwellenwert teils beträchtlich. Aus diesem Grund

konzentrierten sich neuere Studien auf die Verwendung immunhistochemischer Protokolle. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten allerdings, dass EGFR-überexprimierende Mammakarzinome vergleichsweise eine Seltenheit darstellen und zudem die Häufigkeiten einer EGFR-Überexpression von den verwendeten Antikörpern abzuhängen schien<sup>49, 107</sup>. Die vorliegenden Arbeiten widmeten sich allerdings nicht der Frage über die Ursachen dieser stark variierenden Färbegergebnisse, sondern wiesen vor allem auf die klinischen (falsch-positive oder falsch-negative Therapieprädiktion) bzw. auf die gesundheitsökonomischen Konsequenzen solcher Diskrepanzen hin.

Aufbauend auf der Kenntnis der bislang vorliegenden Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt drei verschiedene, kommerziell erhältliche gegen EGFR gerichtete Antikörper unter Routinebedingungen unter Verwendung von so genannten Gewebemikroarrays getestet. In einem ersten Schritt wurden alle drei Antikörper an einem invasiven Plattenepithelkarzinom ausgetestet. Ziel dieses Vorgehens war es, an diesem Tumor eine vergleichbare, membranöse Färbung (Intensität und Anzahl der sich anfärbenden Zellen) an einem Gewebe mit identischer Vorbereitung zu erreichen und optimale Antigendemaskierungsprozeduren zu erarbeiten. Daraus erklären sich die im Weiteren verwendeten unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen.

Nach dem ersten Austestungsschritt zeigten die drei EGFR-Antikörper sehr unterschiedliche Färbereaktionen. Durch die Verwendung von seriell angefertigten, aneinander grenzenden Stufenschnitten lassen sich zumindest zwei Einflussparameter als Erklärungsversuch ausschließen. Erstens kann die beschriebene Heterogenität der EGFR-Expression im Mammakarzinom weitestgehend ausgeschlossen werden und zweitens ist ein Einfluss einer unterschiedlichen Gewebsfixation und weitergehenden Gewebsaufarbeitung auszuschließen.

Die beobachteten EGFR-Expressionen schwankten zwischen 2 und 16% und bewegen sich somit im Bereich der in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten beim Mammakarzinom<sup>49, 115</sup> und anderen Tumorentitäten<sup>73</sup>. Die geringste Expression wurde für den Dako-Antikörper gesehen, gefolgt von Zymed und dem Ventana-Antikörper. Interessanterweise wurde in allen Fällen eine membranöse Positivität beschrieben, die sich auch in den einzelnen Stanzarealen zum Teil heterogen darstellte. Die Detailanalyse der Ergebnisse weist in erster Linie auf Unterschiede in der Antikörpersensitivität hin, da alle Fälle, welche bei Dako als stark positiv gewertet

wurden, auch unter Verwendung der beiden anderen Antikörper stark positiv waren. Der Befund von zwei komplett negativen Fällen bei Dako und einer starken Immunoreaktivität bei Zymed und Ventana deutet, wie auch von der Arbeitsgruppe von Sauter et al. beschrieben, auf sehr ausgeprägte Unterschiede hin<sup>115</sup>. Ein weiterer Hinweis auf Sensitivitätsprobleme als Erklärung dieser Diskrepanzen ergibt sich aus dem EGFR-Expressionsprofil der teilweise miterfassten Myoepithelien in Anteilen von duktalem in situ Karzinomen oder dem Karzinom benachbartem Normalgewebe. Lediglich beim Ventana-Antikörper zeigte sich eine EGFR-Expression in den Myoepithelzellen wie auch zuvor in der Literatur beschrieben<sup>85</sup>. Es bleibt derzeit spekulativ, ob diese Sensitivitätsprobleme die wahrscheinlichste Erklärung der fehlenden Korrelation zwischen EGFR-Expression und Ansprechen auf eine EGFR-Antikörpertherapie beim kolorektalen Karzinom sind. Als Folge dieser mangelnden Sensitivität wäre im Gegensatz zu c-ErbB-2<sup>3</sup> die Etablierung eines semiquantitativen Scores nur für den Ventana-Antikörper möglich. In Folge dieser Ergebnisse wird es die Aufgabe der Zukunft sein müssen, wahrscheinlich für jeden einzelnen Antikörper, bezogen auf jede Tumorentität ein eigenes spezifisches Gewebeaufarbeitungs- und Gewebefixationsprotokoll zu definieren.

Ein Problem der Antikörperspezifität scheint auf dem Boden dieser Ergebnisse nicht vorzuliegen. Diese Annahme wird gestützt durch die starken positiven, gleichsinnigen bzw. inversen, hochsignifikanten Korrelationen für hochmolekulares Cytokeratin CK 5 bzw. den Östrogenrezeptor bei allen drei Antikörpern, aber auch die signifikanten Korrelationen zwischen  $r=0,48$  und  $r=0,71$  zwischen den einzelnen Antikörpern. Die erweiterte Clusteranalyse in unserem Analyseansatz bestätigt dies zusätzlich. Einheitlich zeigten alle Antikörper ein „cluster“ in einem Arm unter Einschluss von CK 5, CK 14, p53 und Vimentin im Gegensatz zu CK 8/18, EMA und dem Östrogenrezeptor. Es bleibt allerdings festzuhalten, dass die Korrelationskoeffizienten für diagnostische Zwecke nicht akzeptabel sind.

Die biomathematischen Ergebnisse unterstreichen somit die multiplen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Stellung von EGFR in verschiedenen Subgruppen des invasiven Mammakarzinoms<sup>110, 111</sup>. EGFR wurde in den vergangenen Jahren als Charakteristikum der so genannten basalen Mammakarzinome, einer Subgruppe der schlecht differenzierten, invasiv duktalem Mammakarzinome, beschrieben mit einem

sehr spezifischen Expressionsprofil auf der RNA- und Proteinexpressionsebene <sup>78, 99</sup>. Mit diesem Tumorsubtyp assoziierte Proteine beinhalten unter anderem Moleküle aus der Annexin-Familie, c-kit <sup>90</sup>, Vimentin <sup>80</sup> und der Neoangiogenese. Die Pathogenese dieser Karzinome und somit die Bedeutung von EGFR in dieser Tumorgruppe wird derzeit noch kontrovers diskutiert <sup>20, 70, 71</sup>. Der Vergleich des Expressionsprofils dieser Karzinome mit Expressionsprofilen physiologischer Brustdrüsenzellen scheint mit einer myoepithelialen Genese vereinbar <sup>71</sup>. Neuere Untersuchungen an physiologischen Brustdrüsen-Progenitorzellen weisen jedoch auf einen möglichen Ursprung der Karzinome aus diesen „Brustdrüsenstammzellen“ hin <sup>26, 27, 54</sup>. Hinweise auf diese These beruhen nicht zuletzt auch auf der Abhängigkeit dieser Zellen vom EGF / EGFR-Systems <sup>28, 29, 86</sup>. Bemerkenswerterweise wurde EGFR in der Vergangenheit nicht nur als Progressionsmarker beschrieben, sondern auch als Faktor, welcher Zellen in einem undifferenzierten Zustand arretiert. Der schlechte Differenzierungsgrad der Tumore könnte somit diesen physiologischen Zustand widerspiegeln <sup>92</sup>, ergäbe damit über die Hemmung von EGFR einen therapeutischen Ansatzpunkt im Sinne einer Induktion einer „Tumorzellreifung“, wie sie bei anderen Tumorentitäten wie Sonderformen der akuten myeloischen Leukämie bereits angewendet wird.

Ungeachtet dieser theoretischen Erwägungen zeigen die Ergebnisse trotzdem einen dringenden Handlungsbedarf zur Entwicklung neuer diagnostischer Algorithmen für die Therapieprädiktion für EGFR. Im Rahmen weiterer, bislang nicht publizierter Untersuchungen der Arbeitsgruppe „Mammopathologie“ am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU) Münster konnte gezeigt werden, dass die Übertragbarkeit des Wissens von c-ErbB-2 auf EGFR derzeit nicht möglich ist. Während für c-ErbB-2 eine klare Korrelation zwischen der RNA- und der Protein-Expression gezogen werden konnte, bestand keinerlei Korrelation zwischen beiden Expressionsebenen für EGFR. Auch zeigte der Vergleich der EGFR-Expression gemessen mittels ELISA und Immunhistochemie keinerlei Korrelation. Bei der Verwendung von Gewebegefrierschnitten zeigte sich allerdings eine wesentlich höhere Rate der EGFR-Expression, auch für den Dako-Antikörper (persönliche Mitteilung, Dr. Hartmut Schmidt, Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, WWU Münster). Dieser Befund verweist erneut auf die Bedeutung der Gewebsfixation mit einem Verlust wichtiger Epitope.

Alternativen neben der immunhistochemischen Detektion stellen möglicherweise DNA-basierte Methoden dar. Die Erfahrungen aus anderen Tumorentitäten, in denen eine suffiziente Therapieprädiktion mit nachfolgender molekular-gerichteter Therapie erfolgreich durchgeführt wird, scheinen dies zu unterstützen. Es gibt Hinweise, dass zum Beispiel Mutationen im *c-kit*-Gen beim gastrointestinalen Stromatumor<sup>9, 50</sup>, balancierte chromosomale Translokationen bei der chronisch myeloischen Leukämie<sup>116</sup> oder Amplifikationen von *c-erbB-2* beim invasiven Mammakarzinom<sup>57</sup> dominante Mechanismen in der Pathogenese dieser Tumoren sind und die entsprechenden Therapien nur bei Tumoren mit den entsprechenden DNA-Mutationen Erfolg haben. Für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom haben sich mittlerweile so genannte aktivierende Mutationen in den Exons 18, 19 und 21, unabhängig von der Genosis und dem EGFR-Expressionsstatus, als prädiktiv herausgestellt<sup>94, 117</sup>. Sie traten allerdings nur in einem vergleichsweise geringem Prozentsatz und vorwiegend in asiatischen Patientenkollektiven auf. Die grundlegende Bedeutung dieser Mutationen wird noch unterstrichen durch die Beschreibung der Veränderungen im morphologisch normalen Lungengewebe, welches sich in Nachbarschaft zum Karzinom befand<sup>126</sup>. Allerdings konnten solche Mutationen bislang nicht im invasiven Mammakarzinom nachgewiesen werden<sup>108</sup>. Auch sind Amplifikationen von *egfr* im invasiven Mammakarzinom sehr selten<sup>74</sup>, zeigen aber, analog zu aktivierenden *egfr*-Mutationen, beim Lungenkarzinom eine signifikant höhere Rate im asiatischen Kulturkreis<sup>18, 44</sup>. In einzelnen Publikationen wurden auch schon Deletionsvarianten für *egfr* beschrieben, dies wurde jedoch bisher nicht in größeren Studien an Tumormaterial untersucht.

In den letzten Jahren sind hingegen kleine umschriebene Amplifikationen von regulierenden Sequenzen im Intron 1 von *egfr* beschrieben worden<sup>18, 72, 74, 130</sup>. Die Bedeutung für die anti-EGFR-Therapieprädiktion bleibt derzeit unklar. Dagegen konnte ein interessanter Zusammenhang zwischen der Häufigkeit dieser Amplifikationen und einem CA-Wiederholungspolymorphismus im Intron 1 von *egfr* beschrieben werden. Speziell die Länge des Polymorphismus konnte inzwischen mit dem Ansprechen auf konventionelle Chemotherapien beim kolorektalen Karzinom und der molekular-basierten Therapie beim Plattenepithelkarzinom assoziiert werden. Weitergehende Studien an großen Patientenpopulationen werden allerdings notwendig sein, um die Signifikanz dieser Ergebnisse zu verifizieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die immunhistochemische Therapieprädiktion für EGFR, speziell beim invasiven Mammakarzinom derzeit noch mit sehr vielen Unzulänglichkeiten verbunden ist. Ein Ausweg aus dieser Problematik mag möglicherweise die Entwicklung von standardisierten Gewebeaufarbeitungs- und Färbeprotokollen unter der Verwendung von sensitiveren Antikörpern sein. Zusätzlich ist jedoch auf jeden Fall ein verbessertes, vertieftes Verständnis der Regulation der *egfr*-Transkription und der Bedeutung von *egfr*-Mutationen notwendig, um das Ziel einer Erarbeitung von diagnostischen Richtlinien in der Zukunft erreichen zu können und damit eine verlässliche Therapieprädiktion zu schaffen.

## 5 Literatur

1. Allred DC, O'Connell P, Fuqua SA. Biomarkers in early breast neoplasia. *J Cell Biochem. Suppl.* 1993;**17G**(s.u.).
2. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, *et al.* An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* 2004 Dec 15;**64**(24):9139-9143.
3. Bankfalvi A, Simon R, Brandt B, *et al.* Comparative methodical analysis of ERB2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology* 1999;**submitted**.
4. Baselga J, Seidman AD, Rosen PP, Norton L. HER2 overexpression and paclitaxel sensitivity in breast cancer: therapeutic implications. *Oncology Huntingt.* 1997 Mar;**11**(3 Suppl 2):43-48.
5. Becker N, Wahrendorf J. *Atlas of cancer mortality in Germany*. Heidelberg, Germany: Springer; 1998.
6. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J. Mol. Med.* 1997 Jun;**75**(6):429-439.
7. Berry DA, Muss HB, Thor AD, *et al.* HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J Clin. Oncol.* 2000 Oct 15;**18**(20):3471-3479.
8. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod. Pathol* 2003 Feb;**16**(2):173-182.
9. Blay JY, Bonvalot S, Casali P, *et al.* Consensus meeting for the management of gastrointestinal stromal tumors. Report of the GIST Consensus Conference of

20-21 March 2004, under the auspices of ESMO. *Ann. Oncol.* 2005 Apr;**16**(4):566-578.

10. Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif.* 2003 Oct;**36 Suppl 1**:73-84.
11. Boecker W, Buerger H, Schmitz K, *et al.* Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. *J Pathol.* 2001;**195**:415-421.
12. Borgstein PJ, Pijpers R, Comans EF, van DP, Boom RP, Meijer S. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: guidelines and pitfalls of lymphoscintigraphy and gamma probe detection. *J. Am. Coll. Surg.* 1998 Mar;**186**(3):275-283.
13. Bornstein P, McKay J, Liska DJ, Apone S, Devarayalu S. Interactions between the promoter and first intron are involved in transcriptional control of alpha 1(I) collagen gene expression. *Mol Cell Biol.* 1988 Nov;**8**(11):4851-4857.
14. Brandt B, Hermann S, Straif K, Tidow N, Buerger H, Chang-Claude J. Modification of Breast Cancer Risk in Young Women by a Polymorphic Sequence in the egfr Gene. *Cancer Res.* 2004 Jan 1;**64**(1):7-12.
15. Brandt R, Eisenbrandt R, Leenders F, *et al.* Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene* 2000;**19**:2129-2137.
16. Brown NM, Wang J, Cotroneo MS, Zhao YX, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein treatment modulates TGF-alpha, EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. *Mol. Cell Endocrinol.* 1998 Sep 25;**144**(1-2):149-165.

17. Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H, *et al.* Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and EGFR-expression. *Cancer Res.* 2000;**60**:854-857.
18. Buerger H, Packeisen J, Boecker A, *et al.* Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J Pathol* 2004 May;**203**(1):545-550.
19. Chrysogelos SA. Chromatin structure of the EGFR gene suggests a role for intron 1 sequences in its regulation in breast cancer cells. *Nucleic. Acids. Res.* 1993 Dec 11;**21**(24):5736-5741.
20. Clarke CL, Sandle J, Parry SC, Reis-Filho JS, O'Hare MJ, Lakhani SR. Cytokeratin 5/6 in normal human breast: lack of evidence for a stem cell phenotype. *J Pathol* 2004 Oct;**204**(2):147-152.
21. Clayton F. Pure mucinous carcinomas of breast: morphologic features and prognostic correlates. *Hum. Pathol* 1986 Jan;**17**(1):34-38.
22. Cohen DW, Simak R, Fair WR, Melamed J, Scher HI, Cordon CC. Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues. *J Urol.* 1994 Dec;**152**(6 Pt 1):2120-2124.
23. Dancey JE, Freidlin B. Targeting epidermal growth factor receptor--are we missing the mark? *Lancet* 2003 Jul 5;**362**(9377):62-64.
24. Dawson PJ, Ferguson DJ, Karrison T. The pathological findings of breast cancer in patients surviving 25 years after radical mastectomy. *Cancer* 1982 Nov 15;**50**(10):2131-2138.
25. Dei Tos AP, Ellis I. Assessing epidermal growth factor receptor expression in tumours: what is the value of current test methods? *Eur. J Cancer* 2005 Jul;**41**(10):1383-1392.

26. Deugnier MA, Faraldo MM, Janji B, Rousselle P, Thiery JP, Glukhova MA. EGF controls the in vivo developmental potential of a mammary epithelial cell line possessing progenitor properties. *J Cell Biol.* 2002 Nov 11;**159**(3):453-463.
27. DiRenzo J, Signoretti S, Nakamura N, *et al.* Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res.* 2002 Jan 1;**62**(1):89-98.
28. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003 May 15;**17**(10):1253-1270.
29. Dontu G, Al Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003 Oct;**36 Suppl 1**:59-72.
30. Dowle CS, Owainati A, Robins A, *et al.* Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br. J Surg.* 1987 Feb;**74**(2):133-136.
31. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1999 Oct;**8**(10):843-854.
32. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N. Engl. J Med.* 1985 Jan 17;**312**(3):146-151.
33. Dupont WD, Page DL, Parl FF, *et al.* Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N. Engl. J Med.* 1994 Jul 7;**331**(1):10-15.
34. Easton DF, Steele L, Fields P, *et al.* Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am. J. Hum. Genet.* 1997 Jul;**61**(1):120-128.
35. Ellis IO, Elston CW. Tumours of the breast. In Fletcher CDM, ed. *Diagnostic histopathology of tumours.* Churchill Livingstone; 1998. 635-689.

36. Elston CW, Ellis IO. *The breast*. 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1998.
37. Etienne-Grimaldi MC, Pereira S, Magne N, *et al*. Analysis of the dinucleotide repeat polymorphism in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in head and neck cancer patients. *Ann. Oncol.* 2005 Jun;**16**(6):934-941.
38. Eusebi V, Foschini MP, Cook MG, Berrino F, Azzopardi JG. Long-term follow-up of in situ carcinoma of the breast with special emphasis on clinging carcinoma. *Semin. Diagn. Pathol* 1989 May;**6**(2):165-173.
39. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 Jun 1;**61**(5):759-767.
40. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 1993 Apr 15;**71**(8):2507-2514.
41. Fisher ER, Sass R, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer* 1984 Feb 1;**53**(3 Suppl):712-723.
42. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, *et al*. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol Lab. Med* 2000;**127**(7):966-978.
43. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, *et al*. Final results from the phase II trial of ZD1839 (Iressa) for patients with advanced non-small-cell lung cancer (IDEAL1). 21 ed. 2002. 298a.
44. Fung LF, Wong N, Tang N, *et al*. Genetic imbalances in pT2 breast cancers of southern Chinese women. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2001;**124**:56-61.
45. Galea MH, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Node negative breast cancer prognosis and DNA ploidy [letter; comment]. *Br. J Surg.* 1992 Feb;**79**(2):181-Sigels.

46. Ganz PA, Day R, Ware JE, Jr., Redmond C, Fisher B. Base-line quality-of-life assessment in the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Breast Cancer Prevention Trial. *J Natl. Cancer Inst.* 1995 Sep 20;**87**(18):1372-1382.
47. Gasparini G, Bevilacqua P, Pozza F, *et al.* Value of epidermal growth factor receptor status compared with growth fraction and other factors for prognosis in early breast cancer. *Br. J Cancer* 1992 Nov;**66**(5):970-976.
48. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol. Chem.* 1999 May 7;**274**(19):13176-13180.
49. Gee JM, Robertson JF, Gutteridge E, *et al.* Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* 2005 Jul;**12** **Suppl 1**:S99-S111.
50. Glabbeke MV, Verweij J, Casali PG, *et al.* Predicting toxicities for patients with advanced gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib: A study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer, the Italian Sarcoma Group, and the Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (EORTC-ISG-AGITG). *Eur. J Cancer* 2006 Jul 26.
51. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann. Oncol.* 2005 Oct;**16**(10):1569-1583.
52. Goulding H, Abdul RN, Robertson JF, *et al.* Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? [see comments]. *Hum. Pathol* 1995 Nov;**26**(11):1196-1200.
53. Gray JW, Collins C, Henderson IC, *et al.* Molecular cytogenetics of human breast cancer. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1994;**59**:645-652.

54. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev.* 2002 Mar 15;**16**(6):693-706.
55. Gullick WJ, Marsden JJ, Whittle N, Ward B, Bobrow L, Waterfield MD. Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinomas. *Cancer Res.* 1986 Jan;**46**(1):285-292.
56. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;**100**:57-70.
57. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/Her2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000;**19**:6102-6114.
58. Harris AL, Nicholson S, Sainsbury JR, Farndon J, Wright C. Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. *J Steroid Biochem.* 1989;**34**(1-6):123-131.
59. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer (1). *N. Engl. J Med.* 1992 Jul 30;**327**(5):319-328.
60. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin. Oncol.* 1999 May;**17**(5):1474-1481.
61. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, *et al.* Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J Med.* 2001 Feb 22;**344**(8):539-548.
62. Henderson IC. Risk factors for breast cancer development. *Cancer* 1993 Mar 15;**71**(6 Suppl):2127-2140.

63. Henderson IC, Patek AJ. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998;**52**(1-3):261-288.
64. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol. Cell Biol* 1989 Mar;**9**(3):1165-1172.
65. Ishii S, Xu YH, Stratton RH, Roe BA, Merlino GT, Pastan I. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1985 Aug;**82**(15):4920-4924.
66. Jacobs TW, Bryne CM, Colditz GA, Connolly J, Schnitt SJ. Radial scars in benign breast-biopsy specimens and the risk of breast cancer. *N. Engl. J Med.* 1999;**340**:430-436.
67. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 1996 Aug 7;**88**(15):1054-1059.
68. Jensen HM, Rice JR, Wellings SR. Preneoplastic lesions in the human breast. *Science* 1976 Jan 23;**191**(4224):295-297.
69. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, *et al.* Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N. Engl. J Med.* 2006 Feb 23;**354**(8):809-820.
70. Jones C, Ford E, Gillett C, *et al.* Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin. Cancer Res* 2004 Sep 15;**10**(18 Pt 1):5988-5997.
71. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, *et al.* Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 2004 May 1;**64**(9):3037-3045.

72. Kersting C, Kuijper A, Schmidt H, *et al.* Amplifications of the epidermal growth factor receptor gene (egfr) are common in phyllodes tumors of the breast and are associated with tumor progression. *Lab Invest* 2006 Jan;**86**(1):54-61.
73. Kersting C, Packeisen J, Leidinger B, *et al.* Pitfalls in immunohistochemical assessment of EGFR expression in soft tissue sarcomas. *J Clin. Pathol* 2006 Jun;**59**(6):585-590.
74. Kersting C, Tidow N, Schmidt H, *et al.* Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest* 2004 Mar 15.
75. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996 Oct 18;**87**(2):159-170.
76. Klijn JG, Look MP, Portengen H, Alexieva-Figusch J, van Putten WL, Foekens JA. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994 Jan;**29**(1):73-83.
77. Komaki K, Sakamoto G, Sugano H, Morimoto T, Monden Y. Mucinous carcinoma of the breast in Japan. A prognostic analysis based on morphologic features. *Cancer* 1988 Mar 1;**61**(5):989-996.
78. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, *et al.* Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 2002 Nov;**82**(11):1525-1533.
79. Korsching E, Packeisen J, Helms MW, *et al.* Deciphering a subgroup of breast carcinomas with putative progression of grade during carcinogenesis revealed by comparative genomic hybridisation (CGH) and immunohistochemistry. *Br. J Cancer* 2004 Apr 5;**90**(7):1422-1428.

80. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, *et al.* The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 2005 Aug;**206**(4):451-457.
81. Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol* 1999;**187**:272-278.
82. Liu W, Innocenti F, Chen P, Das S, Cook EH, Jr., Ratain MJ. Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism. *Clin. Cancer Res.* 2003 Mar;**9**(3):1009-1012.
83. Liu W, Innocenti F, Wu MH, *et al.* A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 2005 Jan 1;**65**(1):46-53.
84. London SJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA* 1992 Feb 19;**267**(7):941-944.
85. Moller P, Mechtersheimer G, Kaufmann M, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor in benign and malignant primary tumours of the breast. *Virchows Arch. A. Pathol Anat. Histopathol.* 1989;**414**(2):157-164.
86. Monaghan P, Clarke CL, Perusinghe NP, Ormerod MG, O'Hare MJ. Epidermal growth factor receptor expression on human breast luminal and basal cells in vitro. *Epithelial. Cell Biol.* 1995;**4**(2):52-62.
87. Morrison BW, Leder P. neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors. *Oncogene* 1994 Dec;**9**(12):3417-3426.
88. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 1988 Jul 1;**54**(1):105-115.

89. Nicholson S, Wright C, Sainsbury JR, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990 Dec 20;**37**(6):811-814.
90. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2004 Aug 15;**10**(16):5367-5374.
91. Oberman HA, Fidler WJ, Jr. Tubular carcinoma of the breast. *Am J Surg. Pathol* 1979 Oct;**3**(5):387-395.
92. Olsson H. Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000 Nov 30;**74**(5):345-350.
93. Otten JD, Van DJ, Peer PG, *et al.* Long term breast cancer screening in Nijmegen, The Netherlands: the nine rounds from 1975-92. *J. Epidemiol. Community. Health* 1996 Jun;**50**(3):353-358.
94. Paez JG, Janne PA, Lee JC, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004 Jun 4;**304**(5676):1497-1500.
95. Page DL, Dixon JM, Anderson TJ, Lee D, Stewart HJ. Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology* 1983 Jul;**7**(4):525-536.
96. Page DL, Dupont WD. Anatomic markers of human premalignancy and risk of breast cancer. *Cancer* 1990 Sep 15;**66**(6 Suppl):1326-1335.
97. Palli D, Rosselli dT, Simoncini R, Bianchi S. Benign breast disease and breast cancer: a case-control study in a cohort in Italy. *Int. J Cancer* 1991 Mar 12;**47**(5):703-706.

98. Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, *et al.* Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology* 1995 Sep;**27**(3):219-226.
99. Perou C, Jeffrey SS, van de Rijn M, *et al.* Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;**96**:9212-9217.
100. Perou C, Sorlie T, Eisen M, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;**406**:747-752.
101. Peters GN, Wolff M, Haagensen CD. Tubular carcinoma of the breast. Clinical pathologic correlations based on 100 cases. *Ann. Surg.* 1981 Feb;**193**(2):138-149.
102. Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat. Genet.* 2002 May;**31**(1):33-36.
103. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int. J Cancer* 1997 May 29;**71**(5):800-809.
104. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J Med.* 2005 Oct 20;**353**(16):1659-1672.
105. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994 Jan;**24**(1):41-47.
106. Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog. Growth Factor. Res.* 1992;**4**(1):1-24.

107. Rampaul RS, Pinder SE, Nicholson RI, Gullick WJ, Robertson JF, Ellis IO. Clinical value of epidermal growth factor receptor expression in primary breast cancer. *Adv. Anat. Pathol* 2005 Sep;**12**(5):271-273.
108. Reis-Filho J, Pinheiro C, Lambros M, *et al.* EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol* 2006 May 31.
109. Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, *et al.* Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Breast Cancer Res* 2005;**7**(6):R1028-R1035.
110. Reis-Filho JS, Milanezi F, Paredes J, *et al.* Novel and classic myoepithelial/stem cell markers in metaplastic carcinomas of the breast. *Appl. Immunohistochem. Mol Morphol.* 2003 Mar;**11**(1):1-8.
111. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, *et al.* Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 2006 Jul;**49**(1):10-21.
112. Remmele W, Dietz M, Schmidt F, Schicketanz KH. Relation of elastosis to biochemical and immunohistochemical steroid receptor findings, Ki-67 and epidermal growth factor receptor (EGFR) immunostaining in invasive ductal breast cancer. *Virchows Arch. A. Pathol Anat. Histopathol.* 1993;**422**(4):319-326.
113. Robert-Koch-Institut Berlin. Statische Daten zur Krebsinzidenz. *Robert-Koch-Institut* 1995.
114. Rudolph P, Alm P, Heidebrecht HJ, *et al.* Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 1999 Feb 3;**91**(3):271-278.
115. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003 Dec;**2**(12):962-972.

116. Savona M, Talpaz M. Chronic myeloid leukemia: changing the treatment paradigms. *Oncology (Williston Park)* 2006 Jun;**20**(7):707-711.
117. Sellers WR, Meyerson M. EGFR gene mutations: a call for global x global views of cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 2005 Mar 2;**97**(5):326-328.
118. Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J* 1999 Apr 15;**18**(8):2149-2164.
119. Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R, Leder P. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell* 1987 May 22;**49**(4):465-475.
120. Slamon DJ, Clark GM, Wong SF, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;**235**:177-182.
121. Smith SA, Easton DF, Ford D, *et al.* Genetic heterogeneity and localization of a familial breast-ovarian cancer gene on chromosome 17q12-q21. *Am. J. Hum. Genet.* 1993 Apr;**52**(4):767-776.
122. Sorlie T, Perou C, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;**98**(19):10869-10874.
123. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003 Jul 8;**100**(14):8418-8423.
124. Stemmermann GN. The pathology of breast cancer in Japanese women compared to other ethnic groups: a review. *Breast Cancer Res. Treat.* 1991 May;**18 Suppl 1**(nur die letzten Jahre).

125. Stratton MR, Wooster R. Hereditary predisposition to breast cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996 Feb;**6**(1):93-97.
126. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, *et al.* EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res* 2005 Sep 1;**65**(17):7568-7572.
127. Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* 1990 Feb 1;**65**(3):518-529.
128. Thomas DB, Karagas MR. Cancer in first and second generation Americans. *Cancer Res.* 1987 Nov 1;**47**(21):5771-5776.
129. Thor AD, Berry DA, Budman DR, *et al.* erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 1998 Sep 16;**90**(18):1346-1360.
130. Tidow N, Boecker A, Schmidt H, *et al.* Distinct Amplification of an Untranslated Regulatory Sequence in the egfr Gene Contributes to Early Steps in Breast Cancer Development. *Cancer Res.* 2003 Mar 15;**63**(6):1172-1178.
131. Todd R, Donoff BR, Gertz R, *et al.* TGF-alpha and EGF-receptor mRNAs in human oral cancers. *Carcinogenesis* 1989 Aug;**10**(8):1553-1556.
132. Todd R, Wong DT. Oncogenes. *Anticancer Res.* 1999 Nov;**19**(6A):4729-4746.
133. van de RM, Perou CM, Tibshirani R, *et al.* Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am. J Pathol* 2002 Dec;**161**(6):1991-1996.
134. Veronesi U, Cascinelli N, Greco M, *et al.* Prognosis of breast cancer patients after mastectomy and dissection of internal mammary nodes. *Ann. Surg.* 1985 Dec;**202**(6):702-707.

135. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, *et al.* Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series. *J Natl. Cancer Inst.* 1999 Feb 17;**91**(4):368-373.
136. Wetzels RH, Kuijpers HJ, Lane EB, *et al.* Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. *Am. J. Pathol* 1991 Mar;**138**(3):751-763.
137. Wu AH, Ziegler RG, Horn RP, *et al.* Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 1996 Nov;**5**(11):901-906.
138. Wu AH, Ziegler RG, Nomura AM, *et al.* Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am J Clin. Nutr.* 1998 Dec;**68**(6 Suppl):1437S-1443S.
139. Zhang W, Stoehlmacher J, Park DJ, *et al.* A polymorphic dinucleotide repeat in intron 1 of EGFR (epidermal growth factor receptor) gene is associated with clinical response to platinum based chemotherapy in patients with advanced colorectal disease. 21 ed. 2002. 134a.
140. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, *et al.* Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl. Cancer Inst.* 1993 Nov 17;**85**(22):1819-1827.
141. Zurrida S, Morabito A, Galimberti V, *et al.* Importance of the level of axillary involvement in relation to traditional variables in the prognosis of breast cancer. *Int. J Oncol.* 1999 Sep;**15**(3):475-480.

## 6 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADH	Atypische duktale Hyperplasie
Ak	Antikörper
ALH	Atypische lobuläre Hyperplasie
AKT	Amerikanische Abk. für Proteinkinase B
CK	Cytokeratin
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HNG	High nuclear grade
HUT	duktale Hyperplasie, usual type
IHC	Immunhistochemisch
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LNG	Low nuclear grade
LSAB/AP-Methode	Labeled Streptavidin Biotin-Alkaline Phosphatase-Methode
pH	pondus Hydrogenii
PIP2	Phosphoinositol-2-Phosphat
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SNP	Single Nucleotide Polymorphismus
SPSS	Statistical Product and Service Solution
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
UICC	Union international contre le cancer

## **7 Lebenslauf**

## **8 Danksagung**

Danken möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Horst Bürger für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine konstruktive Betreuung sowie für die vielen wertvollen, fachlichen Anregungen und methodischen Hinweise.

Bei Herrn Professor Dr. med. Werner Boecker bedanke ich mich für die Möglichkeit diese Arbeit am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie durchführen zu dürfen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, die mir beim Erstellen dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere Herrn Dr. Jens Packeisen für seine Hilfe bei der Erlernung der Gewebemikroarraytechnik, Frau Inka Buchroth für Ihre Unterstützung bei der Durchführung der Immunhistochemie und Herrn Dr. Eberhard Korsching für die Anleitung und Beratung bei der biomathematischen Analyse.