

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

**Untersuchung zur Bedeutung der Expression von
Vimentin im invasiven Mammakarzinom**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Brunsing, Oliver

aus Beckum

2009

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

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2009

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

Zusammenfassung

Untersuchung zur Bedeutung der Expression von Vimentin im invasiven Mammakarzinom

Brunsing, Oliver

Die vorliegende Studie untersucht die Bedeutung von Vimentin im invasiven Mammakarzinom. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit 366 Mammabiopsien mit invasiven Tumorkomponenten auf die Expression von Vimentin und die Expression von 15 weiteren Markern untersucht. Fast alle Vimentin-positiven Fälle (19/21) waren invasiv duktales Mammakarzinome vom Grad 3. Die Expression von Vimentin konnte bei diesen Proben aber nicht nur im invasiven Anteil des Karzinoms nachgewiesen werden, sondern auch in der enthaltenen in-situ-Komponente.

Material und Methode: Für Vimentin und die weiteren 15 Marker wurde eine immunhistochemische Untersuchung an 366 Gewebeproben invasiver Mammakarzinome mittels der Tissue-Microarray-Technik durchgeführt, um Korrelationen zwischen Vimentin und den 15 weiteren Markern sowie dem Tumorgrad herzustellen. Die Expression der Marker wurde hierfür mit immunhistochemischen Methoden dargestellt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Signifikante Ergebnisse: Die Expression von Vimentin korrelierte signifikant mit dem Tumorgrad sowie mit der Expression von SMA, p53, EGFR, CK 5, CD10 und Mib-1. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Vimentin-Expression in einem invasiven Mammakarzinom nicht allein mit einer epithelialen-mesenchymalen Transition oder einer myoepithelialen Histogenese erklärt werden kann. Es muss daher angenommen werden, dass noch ein weiterer Entstehungsweg dieser Vimentin-positiven Mammakarzinome existiert. Denkbar wäre hier die alternative Theorie, dass Vimentin-exprimierende Brusttumore aus Progenitorzellen mit bilinearem Differenzierungspotential entstehen könnten.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2009

Meiner Frau und meinen Eltern gewidmet

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Mammakarzinom	1
1.1.1	Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klinik.....	2
1.1.3	Stadieneinteilung	3
1.1.4	Prognoseparameter	5
1.1.5	Diagnostik.....	9
1.1.6	Therapie	10
2	Pathologie des Mammakarzinoms	11
2.1	Unterschiedliche Entstehungstheorien des Mammakarzinoms	11
2.2	Die duktale Hyperplasie (UDH)	13
2.3	Die atypische duktale Hyperplasie (ADH)	13
2.4	Das duktale Carcinoma in situ (DCIS).....	14
2.5	Charakteristik und Nachweis von Progenitorzellen	14
3	Überblick über die in der Studie angewandten	
	Tumormarker	17
3.1	Vimentin	17
3.2	Zytokeratine	17
3.3	Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR).....	18
3.4	c-erbB2 (HER2/neu).....	19
3.5	p53 und p63	20
3.6	Mib-1.....	20
3.7	CD10	21
3.8	SMA	21
3.9	EGFR.....	22
4	Fragestellung der Arbeit.....	23

5	Material und Methode	24
5.1	Untersuchung der Expression von Vimentin und 15 weiteren Markern im Gewebe invasiver Mammakarzinome anhand von Tissue Microarrays....	24
5.1.1	Das Prinzip der Tissue Microarray (TMA) Methode	24
5.1.2	Die Herstellung der TMA´s.....	25
5.1.3	Immunhistochemische Analyse.....	29
5.2	Immunhistochemisches Färbeprotokoll	31
5.3	Lichtmikroskopische Analyse.....	34
5.4	Statistische Analyse	35
6	Ergebnisse	36
6.1	Häufigkeit der Expression der untersuchten Marker.....	36
6.1.1	Progesteron	36
6.1.2	Östrogen	37
6.1.3	CK 1.....	37
6.1.4	CK 5/6	38
6.1.5	CK 8/18	38
6.1.6	CK 10.....	39
6.1.7	CK 19.....	39
6.1.8	CK 14.....	40
6.1.9	Vimentin	40
6.1.10	SMA	41
6.1.11	EGFR.....	41
6.1.12	p63	42
6.1.13	CD10.....	42
6.1.14	p53	43
6.1.15	Ki-67 (Mib-1)	43
6.1.16	c-erbB2	44
6.2	Coexpression von Vimentin mit anderen untersuchten Tumormakern ..	45
6.2.1	Coexpression von Vimentin und Progesteron	46
6.2.2	Coexpression von Vimentin und Östrogen.....	46
6.2.3	Coexpression von Vimentin und CK 1.....	47
6.2.4	Coexpression von Vimentin und CK 5/6.....	47
6.2.5	Coexpression von Vimentin und CK 8/18.....	48

6.2.6	Coexpression von Vimentin und CK 10.....	48
6.2.7	Coexpression von Vimentin und CK 19.....	49
6.2.8	Coexpression von Vimentin und CK 14.....	49
6.2.9	Coexpression von Vimentin und SMA.....	50
6.2.10	Coexpression von Vimentin und EGFR.....	50
6.2.11	Coexpression von Vimentin und p63.....	51
6.2.12	Coexpression von Vimentin und p53.....	51
6.2.13	Coexpression von Vimentin und Mib-1.....	52
6.2.14	Coexpression von Vimentin und CD10.....	52
6.2.15	Coexpression von Vimentin und c-erbB2.....	53
6.3	Korrelationen.....	54
6.4	Zytogenetische Ergebnisse.....	55
7	Diskussion.....	58
7.1	Schlussfolgerung.....	65
8	Literaturverzeichnis.....	66
9	Danksagung.....	77
10	Lebenslauf.....	78
11	Anhang.....	i
11.1	Abbildungsverzeichnis.....	i
11.2	Tabellenverzeichnis.....	ii
11.3	Abkürzungen.....	iii

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Neoplasie der Frau. Statistisch gesehen erkrankt jede 8. Frau an einem bösartigen Tumor der Mamma, die Rate der Neuerkrankungen liegt bei ca. 46000 Frauen pro Jahr allein für Deutschland, weltweit sind es ca. 500000. In Deutschland sterben jährlich 17000-18000 Frauen an den Folgen eines bösartigen Mammatumors [7]. Bei Frauen im Alter von 35-54 Jahren ist das Mammakarzinom sogar die häufigste Todesursache [39].

Durch die Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Tumorepidemiologie konnten einige ätiologische und pathogenetische Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms herausgestellt werden. So ist ein bis zu 2-fach erhöhtes Risiko bei Frauen mit postmenopausaler Adipositas oder einer frühen Menarche (vor dem 12. Lebensjahr) zu erkennen. Um das 2 bis 4-fache erhöht sich das Risiko einer malignen Neoplasie der Mamma, wenn bereits Verwandte ersten Grades (z.B. Mutter oder Schwester) an einem Mammakarzinom erkrankt sind oder bei Zustand nach einem bereits erfolgreich behandelten Mammakarzinom [46].

Auch hormonelle Einflüsse können das Risiko einer Krebserkrankung der Mamma erhöhen (Nulliparität, späte Erstparität, kurze Stillperiode) [46].

Trotz des erhöhten Risikos bei positiver verwandtschaftlicher Anamnese treten die meisten Mammakarzinome als nicht-genetisch gebundene so genannte „sporadische Mammakarzinome“ auf (90-95%). Die Entstehung eines Mammakarzinoms kann auf hormonelle oder genetische Einflüsse zurückgeführt werden. So ist bekannt, dass sowohl Östrogene als auch Gestagene eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung einnehmen.

Genetische Einflüsse sind bedingt durch den „Ausfall“ so genannter „Tumorsuppressorgene“. So konnte zum Beispiel bei familiärer

Karzinomanamnese das mutierte BRCA-1-Gen („breast cancer susceptibility gene 1“) ausschließlich bei Frauen mit autosomal-dominant vererbten Mamma- und Ovarialkarzinomen gefunden werden [36,49,79]. Ebenso ist eine Mutation des p53-Gens für ein stark erhöhtes Risiko, an Mammakarzinomen zu erkranken, verantwortlich (77% aller Frauen mit dieser Mutation erkranken zwischen dem 22. und 45. Lebensjahr) [50].

1.1.2 Klinik

Die Mehrzahl der Mammakarzinome entstammt dem duktalem Epithel und nur ein kleiner Anteil entspringt aus dem Terrain der Drüsenläppchen. Das Symptomenspektrum besteht aus lokalen und generalisierten Kennzeichen. Als häufigstes Symptom und in der allgemeinen Bevölkerung als wichtigstes Anzeichen für Brustkrebs bekannt ist der so genannte „Knoten“ in der Brust. Mit 75% ist dieser schmerzlose, derbe Knoten auch das Leitsymptom des Mammakarzinoms. Weitere lokale Hinweise auf ein Mammakarzinom sind Einziehungen der Mamille, eine sezernierende Mamille oder ein lokales Ödem. Auch nicht lokal auf die Brust begrenzte Veränderungen können auf ein Mammakarzinom hinweisen, wie z.B. angeschwollene Achsellymphknoten oder Metastasierungen, bevorzugt in Lunge (60%), Leber (50%) und Gehirn (15-30%) [63].

Das so genannte intraduktale Karzinom und das Carcinoma lobulare in situ sind zwei präinvasive Formen des Mammakarzinoms, die sich nicht über die Basalmembran hinaus ausbreiten. Das Carcinoma lobulare in situ geht nur in 25 % der Fälle in ein invasives Wachstum über, jedoch sollte das duktales Carcinoma in situ wie ein manifester Tumor betrachtet und behandelt werden, da hier ein hohes Risiko zu invasivem Wachstum besteht [46].

Die Mehrzahl der entstehenden infiltrierenden Mammakarzinome sind duktales Karzinome, welche sich aus dem Epithel der Gangsysteme entwickeln (80 %). Zu 10 bis 15 % entstehen lobuläre Karzinome, die aus den Drüsenläppchen

stammen. Sehr selten entstehen differenzierte Varianten wie etwa papilläre, medulläre oder schleimbildende Karzinome.

Interessant ist auch das Verteilungsmuster der entstehenden Karzinome. So entstehen 50-60% der Mammakarzinome im oberen äußeren Quadranten, ca. 15% im oberen inneren Quadranten, 10-15% in den beiden unteren Quadranten der Mamma und 15-20% im zentralen Bereich um die Mamille [46].

1.1.3 Stadieneinteilung

Die Einteilung der Mammakarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer). Diese TNM-Klassifikation ist eine Kurzschrift zur Beschreibung und Ausdehnung eines bestimmten malignen Tumors. Sie erfolgt zunächst prätherapeutisch und ist somit wichtig für die Abschätzung und Wahl der angemessenen Therapie. Die so genannte pTNM-Klassifikation erfolgt posttherapeutisch und soll zur Prognoseabschätzung und zur Auswertung von Behandlungsergebnissen führen. In die pTNM-Beurteilung fließen somit auch postoperative histologische Erkenntnisse mit ein.

Neben der TNM-Klassifizierung spielen aber auch das histologische Grading, der Tumortyp und der Steroidrezeptorstatus eine entscheidende Rolle für die Prognose.

In der TNM-Klassifikation steht der Buchstabe T für die Tumorgröße, der Buchstabe N für den Lymphknotenbefall und der Buchstabe M für Metastasierung.

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (intraduktal oder lobulär)
T1	Tumor max. Durchmesser \leq 2 cm
	a) \leq 0,5 cm
	b) $>$ 0,5 bis 1 cm
	c) $>$ 1,0 bis 2,0 cm

T2	Tumor max. Durchmesser > 2,0 bis 5,0 cm
T3	Tumor max. Durchmesser > 5,0 cm
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand und Haut a) Mit Ausdehnung auf die Brustwand b) Mit Ödem, Hautulzerationen oder Satellitenmetastasen der Haut c) T4a und T4b zusammen d) Entzündliches Karzinom
Nx	Keine LK-Beurteilung möglich
N0	Keine regionären LK-Metastasen
N1	Metastasen in beweglichen axillären LK pN1mi) Nur Mikrometastasen ($> 0,2\text{mm} \leq 2\text{mm}$) pN1a) axilläre Metastasen in 1-3 LK pN1b) Metastasen in LK entlang der A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar pN1c) pN1mi/pN1a und pN1b gemeinsam
N2a	Metastasen in fixierten axillären Lymphknoten pN2a) axilläre Metastasen in 4-9 Lymphknoten
N2b	Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, klinisch erkennbar
N3a	infraklavikuläre Lymphknotenmetastasen pN3a) > 10 axilläre LK-Metastasen oder infraklavikuläre LK-Metastasen
N3b	Axilläre LK-Metastasen <i>und</i> LK-Metastasen entlang der A. mammaria interna, klinisch erkennbar pN3b) > 3 axilläre LK-Metastasen und LK-Metastasen entlang der A. mammaria interna, klinisch nicht sichtbar
N3c	pN3c) supraklavikuläre LK-Metastasen
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 1: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms gemäß der UICC mit Hilfe der TNM-Klassifikation

1.1.4 Prognoseparameter

Von besonderer Bedeutung bei der Prognoseabschätzung sind nicht nur die drei TNM-Größen Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung, sondern auch Parameter wie Menopausenstatus, histologisches Grading und der Steroidrezeptorstatus. Somit kann man in der Therapie des Mammakarzinoms individuell den Prognosefaktor für den Patienten bestimmen und eine zielgerichtete, individuelle Therapie des Tumors durchführen.

1.1.4.1 Tumorgröße

Dieser Faktor ist für die Prognose des Mammakarzinoms von großer Bedeutung, da mit zunehmender Tumorgröße auch die Überlebenswahrscheinlichkeit abnimmt. Die Bestimmung der Tumorgröße erfolgt am frischen Schnittpräparat oder am eingefärbten Paraffinschnitt. Bei mehreren simultan vorliegenden Tumoren fließt immer der Tumor in die Prognose mit ein, der die größte Ausdehnung erreicht hat (höchste pT-Kategorie). Tumorausläufer von unscharf begrenzten Tumoren werden mit in die Größenbestimmung einbezogen.

Auch der Befall regionärer Lymphknoten korreliert mit der Größe des vorliegenden Tumors. Bei ca. 20% der Patienten mit Frühkarzinomen ist mit dem Befall eines Lymphknotens zu rechnen, ab einer Tumorgröße bis 1 cm mit ca. 27% Lymphknotenbefall und bei einem Durchmesser des Primärtumors oberhalb von 2 cm bei ca. 80% der Patienten mit axillären Lymphknotenmetastasen [29].

1.1.4.2 Lymphknotenbefall

Je nach Lokalisation des vorliegenden Tumors erfolgt die lymphogene Ausbreitung der Metastasen in unterschiedliche Lymphknotenregionen. Entwickelt sich der Tumor im oberen äußeren Quadranten der Mamma, so

erfolgt in der Regel eine Metastasierung in die axillären Lymphknoten. Medial gelegene Karzinome breiten sich hingegen häufiger in der Tiefe durch die Thoraxwand hindurch aus und metastasieren eher in retrosternale und supraklavikuläre Lymphknoten. Zur exakten histopathologischen Bewertung und Lokalisation der Lymphknoten sind die axillären und intrapektoralen Lymphknoten in drei Level eingeteilt:

- Level 1: lateral des M. pectoralis minor
- Level 2: zw. lateralem und medialem Rand des M. pectoralis minor
- Level 3: medial des M. pectoralis minor

Die 5-Jahres-Überlebenszeit korreliert folglich auch mit dem Befall der unterschiedlichen Level. So ist bei nicht Vorliegen einer Lymphknotenmetastase die 5-Jahres-Überlebenszeit mit ca. 96% recht hoch. Sind jedoch Level 1 und Level 2 befallen, so sinkt die 5-Jahres-Überlebenszeit auf durchschnittlich 50%, bei zusätzlichem Befall des Levels 3 beträgt sie durchschnittlich nur noch ca. 30% [72].

1.1.4.3 Fernmetastasierung

Die Metastasierung wird unterschieden in den lymphogenen (s.o.) und den hämatogenen Weg. Hierbei stellt die hämatogene Aussaat den prognostisch wichtigsten Faktor dar, wobei vornehmlich das Skelettsystem (ca. 70%), die Leber (ca. 60%), die Pleura/Lunge (ca. 50%), das Gehirn (15-30%) und die Ovarien (ca. 20%) befallen sind [16].

Die hämatogene Fernmetastasierung ist in der Regel mit der Größe des Primärtumors und dessen Malignitätsgrad sowie mit der lymphogenen Ausbreitung korreliert. Trotzdem geht man davon aus, dass bereits ca. 65-70% aller Mammakarzinome zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung okkulte Mikrometastasen ausgesät haben [4]. So kann ein bereits als geheilt geltendes, nodal-negatives Mammakarzinom noch 5-6 Jahre nach der Therapie zu

Fernmetastasierung führen. Hieraus wird ersichtlich, dass die Metastasierung entscheidenden Einfluss auf den Prognosefaktor hat und eine frühe Tumorerfassung eminent wichtig ist. Denn je kleiner der Primarius und je geringer die Mitosezahl, desto geringer sind lymphogene und hämatogene Ausbreitung und desto besser ist die Prognose [63].

1.1.4.4 Histo- und zytomorphologisches Grading

Für Mammakarzinome gilt ein dreistufiges Grading zur Beurteilung des Malignitätsgrades, eingeführt von Bloom und Richardson [11]. Folgende Merkmale dienen zur Beurteilung:

- Tubulusbildung
- Kernpleomorphie
- Mitoserate

Diese drei Kriterien liefern in ihrer unterschiedlichen Ausprägungsform den Grundstein zur so genannten Scoreermittlung, wie in folgender Tabelle ersichtlich:

Merkmale	Kriterien	Scorewerte
1. Tubulusbildung	>75%	1
	10-75%	2
	<10%	3
2. Kernpleomorphie	gering	1
	mittelgradig	2
	stark	3
3. Mitoserate	0-1/HPF	1
	1-2/HPF	2
	>2/HPF	3

Tab. 2: Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom

Anhand dieses Punktsystems (Scoresumme) werden die Tumoren in drei Gruppen eingeteilt:

Scoresumme	Malignitätsgrad	Gruppe	Definition
3,4,5	gering	G1	gut differenziert
6,7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8,9	hoch	G3	schlecht differenziert

Tab. 3: Graduierung und Definition der Scoresummen

Das Grading ergibt übereinstimmend enge Korrelationen zwischen dem Differenzierungsgrad des Karzinoms, der Frequenz von Rezidiven, dem Nodalstatus und der Mortalität [5,24,26]. Prognostisch gesehen kann festgehalten werden, dass nodal positive G3-Karzinome im Vergleich zu nodal negativen G1-Karzinomen mit einer 9-fach erhöhten Mortalität einhergehen [41]. Die 5-Jahres-Überlebensraten nach Chemotherapie sind prä- und postmenopausal bei G1-Tumoren 73%, bei G2-Tumoren 61%, bei G3-Tumoren 46% [26].

1.1.4.5 Hormonrezeptorstatus

Der Hormonrezeptorstatus zählt zu den wichtigsten unabhängigen Parametern für die Prognose des Mammakarzinoms und stellt zugleich ein Selektionskriterium für die Planung einer adjuvanten endokrinen Therapie dar. Östrogene aus der Zirkulation und andere Steroidhormone (z.B. Progesteron) können in die Zelle eindringen und am Östrogenrezeptor binden. Dieser Komplex stimuliert die nukleäre DNA zur Synthese von Proteinen und zu Wachstum und Proliferation der Zelle [29].

Der wichtigste Aspekt der Hormonrezeptorbestimmung liegt in der Therapiewahl, da Steroidrezeptor-positive Tumoren wesentlich besser auf eine hormonelle Therapie ansprechen.

Ebenso ist eine verlängerte Überlebenszeit (sowohl bei nodal positiven als auch bei nodal negativen Karzinomen) bei Vorliegen eines positiven Östrogenrezeptors zu verzeichnen [80]. Die Prognose kann noch weiter verbessert werden, wenn zusätzlich auch der Progesteronrezeptorstatus positiv ist [34].

1.1.5 Diagnostik

Der Großteil der Mammakarzinome wird durch Ertasten eines so genannten „Knotens“ in der Brust der Patientin meist durch die Patientin selbst festgestellt. Auch die Routineuntersuchung beim Gynäkologen beinhaltet primär die Inspektion und Palpation der Mamma. Liegt ein verdächtiger oder unklarer Befund vor, so kann als aussagekräftigste, nicht invasive, apparative diagnostische Methode eine Mammographie durchgeführt werden. Mit relativ hoher Treffsicherheit können hierdurch bestehende Tumoren entdeckt werden, auch wenn es sich um klinisch okkulte Tumoren handelt. Als Anzeichen einer Neoplasie in der Mamma werden im mammographischen Bild alle Verschattungen gewertet, welche mit Mikrokalzifikationen und „besenreißerartigen Krebsfüßchen“ einhergehen. Weitere Anzeichen sind inhomogene Dichte und Diskrepanz zwischen röntgenologisch bestimmter und getasteter Tumorgroße [46].

Aber auch weitere Verfahren können zur Diagnostik des Mammakarzinoms angewandt werden. Hierbei sind die Sonographie und die Galaktographie zu nennen. Alle hier erwähnten Verfahren dienen jedoch „nur“ zur Diagnostik eines vorliegenden Karzinoms, nicht jedoch zur genauen Differenzierung. Eine genaue Bestimmung und Differenzierung des vorliegenden Karzinoms und somit eine endgültige Diagnose ist nur durch die histologische Untersuchung des Tumormaterials möglich.

1.1.6 Therapie

In der Therapie des Mammakarzinoms gibt es unterschiedliche Ansätze und Wege, den Tumor zu behandeln. Bei der Wahl der Therapieform spielen unterschiedliche Parameter eine Rolle: das Alter der Patienten, der Hormonrezeptorstatus des Karzinoms, die Karzinomgröße und das Vorliegen eventueller Begleiterkrankungen sowie alle weitere oben erwähnte Prognosefaktoren.

Mögliche Therapieformen sind:

- 1.) die chirurgische Therapie
- 2.) die Strahlentherapie
- 3.) die Chemotherapie
- 4.) die Hormontherapie

Je nach vorliegendem Fall werden die unterschiedlichen Therapieformen gezielt eingesetzt und gegebenenfalls auch kombiniert.

2 Pathologie des Mammakarzinoms

Die genauen Grundlagen der Entstehung eines Mammakarzinoms sind auch heute noch nicht erforscht. Jedoch sind in der Vergangenheit mehrere unterschiedliche Entstehungstheorien publiziert worden, welche alle auf eine genetische Veränderung innerhalb des Brustepithels hindeuten. Immer größere Bedeutung kommt derzeit der „Stammzellen-Theorie“ zu, die von der Entwicklung eines Mammakarzinoms aus der Fehlregulation in der Proliferation der Mamma-Progenitorzellen ausgeht.

2.1 Unterschiedliche Entstehungstheorien des Mammakarzinoms

Die meisten Theorien zur Entstehung des Mammakarzinoms orientieren sich an der Hypothese zur Entstehung des colorektalen Karzinoms [33]. Ähnlich der Entstehung des colorektalen Karzinoms wird angenommen, dass die schrittweise Ansammlung von verschiedenen genetischen Veränderungen in der Entwicklung des Mammakarzinoms eine entscheidende Rolle spielt. In vielen unterschiedlichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Onkogene und Tumor-Suppressor-Gene einen entscheidenden Anteil an der Genese eines Mammakarzinoms haben [8,56].

Durch den Einfluss von Onkogenen, den Ausfall von Tumor-Suppressor-Genen und den Einfluss von erblichen und exogenen Faktoren oder (wahrscheinlicher) einem Zusammenspiel aller dieser Faktoren kommt es in der normalen Brustzelle zu klonalem Wachstum. Ausgehend von diesem veränderten Wachstumsmuster kommt es im weiteren Verlauf zur Ausbildung eines In-situ-Karzinoms (DCIS, LCIS), welches in ein invasives Karzinom übergehen kann.

Sowohl das duktales Carcinoma in situ als auch das lobuläre Carcinoma in situ werden als Präkanzerosen angesehen und erhöhen das Risiko einer invasiven Tumorentwicklung um das 8 bis 10 (DCIS) oder das 10 bis 11-fache (LCIS) [74]. Ebenso erhöht das Vorliegen einer normalen duktaalen Hyperplasie das Erkrankungsrisiko um das 2-fache sowie das Vorliegen einer atypischen

duktalen Hyperplasie um das 4 bis 5-fache [74]. Es ist erwiesen, dass diese „Vorläuferläsionen“ einen großen Einfluss auf die Entwicklung und Ausbildung eines Mammatumors haben. In vielen Fällen kann auch das gemeinsame Vorliegen einer Präkanzerose zusammen mit einem bereits bestehenden invasiven malignen Karzinom beobachtet werden. Allerdings gibt es auch viele Fälle, in denen invasive Tumoren diagnostiziert wurden, ohne geringste Hinweise auf zuvor bestehende benigne Veränderungen im Mammagewebe nachweisen zu können [31]. Somit stellt sich die Frage der möglichen Entstehungswege eines Mammakarzinoms. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Ansatzpunkte und denkbare Modelle einer Tumorentstehung [39]:

- a) Die konsequent lineare Entwicklung des invasiven Mammakarzinoms: Aus dem vorliegenden Brustepithel entwickelt sich eine duktale oder atypische Hyperplasie durch genetische Fehlregulation. Weitere Faktoren führen zur Entstehung eines duktales Carcinomas in situ innerhalb der Hyperplasie, welches sich weiter zu einer invasiven Karzinomkomponente entwickelt.
- b) Ein weiterer möglicher Entwicklungsweg wäre die direkte Entstehung des DCIS aus dem vormals gesunden Brustgewebe ohne vorhergehende Hyperplasie. Auch hier entwickelt sich aus dem DCIS im weiteren Verlauf der Erkrankung das invasive Karzinom.
- c) Möglich ist hingegen auch, dass alle drei Formen, sowohl die Hyperplasie als auch das DCIS und der invasive Tumor, direkt und unabhängig voneinander aus dem Brustgewebe entstehen. Denkbar ist in diesem Fall die Tumorentstehung aus Progenitorzellen.

2.2 Die duktale Hyperplasie (UDH)

Das erste Anzeichen für eine intraduktale Veränderung des Brustgewebes ist in der Regel die Hyperplasie. Diese benigne Veränderung der Brust wird charakterisiert durch eine ungeordnete Proliferation ungleich großer polygonaler bis spindelförmiger Zellen mit Ausbildung von schlitzförmigen Hohlräumen oder dünnen epithelialen Brücken. Die euchromatischen Kerne variieren in Größe, Form und Lagerung. Bei paralleler Lagerung der Kerne entsteht der Eindruck eines Strömens und Fließens der Zellen [32].

Viele Untersuchungen zur Genetik und Molekularbiologie der Hyperplasie der Mamma liegen nicht vor. In einigen Fällen sind bei der dukталen Hyperplasie ähnliche Veränderungen wie im DCIS und invasiven Karzinomen herausgestellt worden [57]. Immunhistologisch konnten Zytokeratine und unterschiedliche Ausprägungsgrade des Östrogenrezeptors nachgewiesen werden [12]. Ein Hinweis auf eine mögliche spätere Umwandlung der dukталen Hyperplasie in ein invasives Karzinom könnte der Verlust der TGF- β 2-Expression sein [38].

2.3 Die atypische duktale Hyperplasie (ADH)

Die Histologie der atypischen dukталen Hyperplasie ist gekennzeichnet durch eine Proliferation monomorph atypischer Zellen und ein cribiformes oder solides Wachstum. Es kommt zu einem partiellen oder vollständigen Befall einzelner Gänge und Läppchen. Als partieller Befall einzelner Gänge und Läppchen wird ein mehrreihiges, monomorphes Epithel mit Brückenbildung, Trabekeln oder starren Mikropapillen gewertet. Diese klonale neoplastische Epithelproliferation gilt als Risikofaktor im Sinne einer präkanzerösen Kondition. Es wird heute allgemein angenommen, dass eine atypische duktale Hyperplasie das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, um das 4 bis 5-fache erhöht [74].

2.4 Das duktales Carcinoma in situ (DCIS)

Definiert wird das duktales Carcinoma in situ als eine Proliferation von Zellen mit Tumorteilen in den parenchymalen Strukturen der Mamma, ohne invasives Wachstum über die Basalmembran hinaus [58]. Das DCIS hat folglich noch kein invasives Wachstum aufzuweisen, erhöht aber die Gefahr der Entstehung eines invasiven Mammakarzinoms um das 8 bis 10-fache.

Das DCIS zeigt im Gegensatz zur atypischen Hyperplasie eher diskohäsive Verbände und Einzelzellen. Bei der atypischen Hyperplasie sind gutartige Zellelemente beigemischt und die Verbände können irreguläre oder schlitzenartige Lumina enthalten. Jedoch ist die histologische Unterscheidung zwischen DCIS und ADH eines der Hauptprobleme in der Pathologie der Brust [66].

2.5 Charakteristik und Nachweis von Progenitorzellen

Obwohl schon längere Zeit nur wenige Zweifel an der Existenz von Progenitorzellen im Mammagewebe bestehen, ist es doch nach wie vor schwer, die Charakteristika dieser Zellen zu definieren. Allgemein bekannt ist, dass das Brustgewebe aus luminal glandulären und basal myoepithelialen Zellen besteht. Der Großteil dieser myoepithelialen Zellen ist charakterisiert durch die Zytokeratine 5 und 14 sowie durch glatt muskuläres Aktin (SMA), wohingegen die glandulären Zellen eher durch die Zytokeratine 8, 18 und 19 und die Rezeptoren für Östrogen bzw. Progesteron charakterisiert sind.

Auch die ruhende Mamma ist einer ständigen zyklischen Veränderung während des Menstruationszyklus unterlegen, so dass ständig verloren gegangene Zellen ersetzt werden müssen, um die Integrität des Gewebes zu bewahren. Diese verloren gegangenen Zellen können nun entweder durch Mitose bereits ausdifferenzierter Zellen ersetzt werden oder aber durch eine de-novo Neubildung aus Progenitorzellen hervorgehen. Transplantationsstudien von Williams und Daniel haben bereits 1983 gezeigt, dass einzelne Mammazellen der Maus, welche in ein gereinigtes Fettgewebe transplantiert werden, sich zu

einer kompletten Drüse entwickeln. Diese wissenschaftlichen Ergebnisse deuten klar auf ein Vorhandensein von multipotenten Progenitorzellen hin [83]. In weiteren Versuchen konnten Böcker et al. 1992 mit neuen Technologien zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Antigene CK 5/14 produzierende Zellen als Progenitorzellen identifizieren [14]. Mit Hilfe von speziellen monoklonalen Antikörpern gegen CK 5, CK 8/18 und SMA konnten einige dieser Zellen extrahiert werden und mit anderem Zellmaterial wie ADH, DCIS und invasiven Karzinomen verglichen werden. Mit diesen Ergebnissen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den basalen CK 5-Zellen um so genannte Progenitorzellen handelt, die sowohl für die glanduläre als auch für die myoepitheliale Zelllinie stehen. Böcker et al. konnten somit nachweisen, dass die Progenitorzellen sich in Zellen der glandulären Linie (CK 8/18, CK 5) entwickeln können, aber auch in Zellen der myoepithelialen Linie (CK 5, SMA), welche sich schlussendlich zu ausdifferenzierten Zellen entwickeln (CK 8/18 oder SMA) [13,14,83].

Es können folglich 5 unterschiedliche phenotypische Zelluntergruppen in der Mamma unterschieden werden:

1. Progenitorzellen : CK 5
2. intermediäre glanduläre Zellen : CK 5 *und* CK 8/18
3. intermediäre myoepitheliale Zellen : CK 5 *und* SMA
4. glanduläre Zellen : CK 8/18
5. myoepitheliale Zellen : SMA

Die CK 5-positiven Progenitorzellen wurden in der luminalen Schicht des Brustepithels gefunden, hingegen bestand der größte Anteil der luminalen Zellen aus Zellen vom intermediären Typ (CK 5, CK 8/18). Nur ein geringer Anteil der Zellen in der ruhenden Brustdrüse waren ausdifferenzierte glanduläre Zellen. In basalen Bereichen des Brustepitheliums der ruhenden Brust wurde nur eine extrem geringe Anzahl an Progenitorzellen angetroffen. Hier überwogen ebenfalls die intermediären Zellen (SMA, CK 5) in Entwicklung zu

myoepithelialen Endzellen (SMA), wobei die Anzahl der myoepithelialen Zellen in unterschiedlichen Lobuli stark differierte [14].

3 Überblick über die in der Studie angewandten Tumormarker

Die in den Versuchen angewandten Marker sind Standard-Marker der immunhistochemischen Untersuchungen in der Mammopathologie. Da auch in vielen anderen Versuchen in der Mammopathologie diese Marker verwendet werden, ergibt sich eine gute Vergleichbarkeit mit anderen bereits durchgeführten Studien. Im Folgenden werden die einzelnen angewandten Marker näher charakterisiert:

3.1 Vimentin

Vimentin ist ein Typ 3-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine und damit ein Element des Zytoskeletts. Die Molekülmasse humanen Vimentins beträgt 52689 Dalton. Es kommt im Zytoplasma (teilweise auch im Nucleolus) aller Zellen mesenchymalen Ursprungs vor (z.B. glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten).

Die genaue Funktion von Vimentin ist nicht bekannt. In der Pathologie wird Vimentin als genereller Marker für Weichgewebstumoren verwendet.

3.2 Zytokeratine

Auch die Zytokeratine (Ck) gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente und sind Bestandteil des Zytoskeletts. Die Zytokeratine lassen sich allerdings in zwei Untergruppen unterteilen, wobei man die sauren Zytokeratine (Ck 9-20) dem Typ I zuteilt und die neutralen/basischen Zytokeratine (Ck 1-8) dem Typ II [53,54,62]. Neben der Typ I und Typ II-Einteilung gibt es noch eine weitere Einteilung entsprechend der hauptsächlichen Ck-Gewebsverteilung und dem Differenzierungsgrad:

- a) die niedrigermolekularen zylinderepitheltypischen Ck: hierzu gehören die *Typ I Ck 18-20* und die *Typ II Ck 7 und 8*
- b) die höhermolekularen plattenepitheltypischen Ck: hierzu gehören die *Typ I Ck 9-17* und die *Typ II Ck 1-6*

Die gesunde, ruhende weibliche Brustdrüse ist strukturiert durch ein komplexes Ck-Muster, welches aus zylinder- und plattenepitheltypischen Ck aufgebaut ist. Das zylinderepitheltypische Ck kommt selektiv in den luminalen Epithelzellen vor (außer Ck 20), das plattenepitheltypische Ck vor allem in den Myoepithelzellen. Invasive Karzinome der Mamma exprimieren überwiegend die zylinderepitheltypischen Ck 7, 8, 18 und 19, invasiv duktales Karzinome mit höherem Malignitätsgrad exprimieren fokale auch noch die plattenepitheltypischen Ck 4, 14 und 17 [53]. Bei benignen oder malignen Epithelzellalterationen bleiben die Ck meist stabil und können so als histogenetische Marker diagnostische Hinweise auf Art, Ausgang und Subtypisierung eines epithelialen Karzinoms geben [53,54,62].

3.3 Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR)

Östrogene entstammen der Klasse der Steroide und sind die wichtigsten weiblichen Geschlechtshormone. Bildungsorte sind Ovarien und zu einem geringen Teil auch die Nebennierenrinde. Während der Schwangerschaft werden die Östrogene auch in der Plazenta gebildet. Die Konzentration der Östrogene ändert sich erheblich im Laufe des weiblichen Zyklus, gesteuert durch die von der Hypophyse produzierten Gonadotropine (FSH und LH). Auch in der weiblichen Brustdrüse befinden sich Östrogenrezeptoren.

Progesteron, auch Gelbkörperhormon genannt, ist ein weiteres weibliches Geschlechtshormon mit Rezeptoren in der weiblichen Brustdrüse. Produziert wird Progesteron in der zweiten Hälfte des Menstruationszyklus im Corpus luteum und in hohen Mengen während der Schwangerschaft in der Plazenta.

Durch Ausschüttung von LH aus der Hypophyse wird die Progesteronsynthese angeregt [46].

Die Rezeptoren für Östrogen und Progesteron sind im Zellkern zu finden und sind zuständig für die Regulation von Genen, die Einfluss auf das Zellwachstum haben. Hierbei kann man die einzelnen Rezeptoren noch in Subtypen unterteilen, die bei dem Östrogenrezeptor aus den Typen ER-alpha und ER-beta bestehen, welche beide durch die Bindung von Östrogen aktiviert werden. Bei einem Großteil der Mammakarzinome wird ER exprimiert, sie sind somit östrogenrezeptorpositiv. Östrogenrezeptor-positive Karzinome sprechen in der Regel auf Hormontherapie an und sind mit einer guten Prognose verbunden [80].

Der Progesteronrezeptor besteht aus den Subtypen PRA und PRB, welche durch Progesteron aktiviert werden. Zumeist wird im tumorös veränderten Gewebe PRB überexprimiert. PRB ist somit ein guter Tumormarker und steht, ähnlich wie ein positiver Östrogenrezeptorstatus, für ein gutes Ansprechen auf eine Hormontherapie.

3.4 c-erbB2 (HER2/neu)

Das Onkoprotein c-erbB2 stellt einen transmembranären Wachstumsfaktorrezeptor dar und gehört somit zu der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR). Etwa 25-30% der invasiven Mammakarzinome weisen eine Überexpression von c-erbB2 auf. Funktionell gibt c-erbB2 Signale an die Tumorzelle, welche diese zu weiterer Proliferation stimuliert.

Die routinemäßige klinische Untersuchung und Bestimmung des c-erbB2-Status ist für die Patienten von großer Wichtigkeit, da ein positiver c-erbB2-Status nicht nur auf eine schlechte Differenzierung und somit schlechte Prognose des Karzinoms hinweist, sondern auch eine spezielle Therapie mit einem

humanisiertem Antikörper (Trastuzumab), der gegen den extrazellulären Teil des c-erbB2-Rezeptor gerichtet ist, durchgeführt werden kann.

3.5 p53 und p63

Das Tumorsuppressorgen p53 wurde 1979 entdeckt und verdankt seinen Namen seinem Gewicht von 53 kDa auf einem SDS-PAGE Gel. Das dazugehörige Gen (TP53-Tumorsuppressor-Gen) liegt auf dem Chromosom 17p. Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Mutationen des p53 – Gens sind bei 20-40% aller Mammakarzinome zu finden und finden schon früh im Prozess der Karzinogenese statt. Durch die Mutationen des Gens kommt es zu Zellzyklusfehlregulationen. Somit korrelieren sie mit einem schlechteren histologischen Grading und einem aggressiveren Krankheitsverlauf.

Das p63-Gen ist ein Homolog des p53-Gens. Es wird stark in den Basalzellen epithelialer Verbände exprimiert. Es spielt eine wichtige Rolle in Entwicklung und Differenzierung der Zelle. Wie p53 kann auch p63 die Apoptose auslösen, die genauen Regulationswege dieser durch p63 vermittelten Apoptose sind aber bisher weitgehend unbekannt [82].

3.6 Mib-1

Mib-1 ist ein monoklonaler Antikörper, der an das im Zellkern befindliche nukleäre Protein Ki-67 bindet. Da Ki-67 ein über die Zeit gesehen instabiler Faktor bei Patienten mit Mammakarzinom ist und bei Formalinfixierung zerstört wird, nutzt man den Antikörper Mib-1, der an Ki-67 bindet und durch die Formalinfixierung nicht zerstört wird. Wichtig ist Ki-67 zur Auskunft über die Zellproliferationsrate, welche über den prozentualen Anteil des im Zellkern

befindlichen Ki-67's bestimmt wird. Im fixierten Gewebe kann die Proliferationsrate dann durch die Bestimmung von Mib-1 ermittelt werden.

3.7 CD10

CD10 oder auch Nephilysin (weiteres Synonym: CALLA = Common acute lymphoblastic leukemia-associated) ist ein Enzym des menschlichen Körpers, welches überwiegend in Lunge und Niere vorkommt, aber auch in den meisten anderen Körperregionen angetroffen wird. Nephilysin ist eine Zink(II)-abhängige membrangebundene Endopeptidase, die an verschiedenen Prozessen von Signalpeptiden beteiligt ist. Diese Endopeptidase ist nicht nur an der Entstehung von Tumoren beteiligt (u.a. das Mammakarzinom), sondern auch an der Entstehung von Bluthochdruck und insbesondere Alzheimer.

3.8 SMA

Die Abkürzung SMA steht für glatt muskuläres Aktin. Aktin, eines der beiden wesentlichen zytoskelettalen Proteine, ist zusammen mit Myosin an Bewegung, Sekretion, Zytoplasmazirkulation, Phagozytose und Zytokinese beteiligt. Anti-Alpha-Glattmuskel-Aktin bindet sich an glatte Muskelzellen und myoepitheliale Zellen.

Der Antikörper färbt nicht gestreiften Muskel wie Skelettmuskel und Herzmuskel, Endothel, Bindegewebe, Epithel oder Nerven. Der Antikörper kann verwendet werden, um Tumoren der glatten Muskulatur zu identifizieren. Er färbt Leiomyome und Leiomyosarkome, jedoch nicht Karzinome, Melanome, Lymphome oder Sarkome der nicht-glatten Muskulatur.

3.9 EGFR

Der EGF-Rezeptor ist ein so genannter Transmembranrezeptor. Er kommt in nahezu allen Geweben vor. An den EGFR binden als Liganden der Epidermal Groth Factor (EGF) und der Transforming Groth Factor (TGF α). Über die Bindung dieser Liganden werden Signale in der Zelle freigesetzt, die zu Zellwachstum führen und die Apoptose verhindern.

Der EGF-Rezeptor wird in Tumorzellen hochreguliert und/oder in mutierter Form angetroffen, so dass Tumorzellen unkontrolliert wachsen und sich vermehren. Ein Ansatz neuartiger Krebstherapien ist, die onkogenen Signale von EGFR zu blockieren und somit eine Verlangsamung bzw. einen Stopp des Wachstums von Tumorzellen herbeizuführen.

4 Fragestellung der Arbeit

Die Expression von Intermediärfilamenten in der menschlichen Brust ist mit einer Vielzahl von Aspekten in der fetalen Brustentwicklung, pubertären zellulären Differenzierung und einer eventuellen tumorösen Veränderung verbunden. Vimentin kommt in der gesunden, adulten Mamma hauptsächlich in myoepithelialen Zellen vor, wohingegen niedermolekulare Zytokeratine überwiegend in den glandulären Strukturen der adulten Mamma zu finden sind. Kennzeichen der großen Mehrheit der invasiven Mammakarzinome ist die Expression von mindestens einem niedermolekularen Zytokeratin, so dass die meisten Karzinome der Brust einen glandulären Ursprung zu haben scheinen. Interessanterweise kann jedoch bei einer kleinen Anzahl von invasiven Mammakarzinomen neben den niedermolekularen Zytokeratinen auch das Intermediärfilament Vimentin im Karzinom nachgewiesen werden.

Die Histogenese dieser Tumoren und auch die klinische Signifikanz dieser Vimentin-Expression ist bisher ungeklärt [43,60].

Um einen tieferen Einblick in die Pathogenese der Vimentin-positiven Mammakarzinome zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Serie von 366 invasiven Mammakarzinomen untersucht. 144 dieser Fälle wurden vorher durch die Comparative Genomic Hybridisation (CGH) charakterisiert. Anhand von Tissue Microarrays (TMA's), die auf Vimentin und 15 weitere Marker immunhistochemisch untersucht wurden, wurde die Bedeutung des Vimentins in der Pathogenese des invasiven Mammakarzinomen näher beleuchtet.

5 Material und Methode

5.1 Untersuchung der Expression von Vimentin und 15 weiteren Markern im Gewebe invasiver Mammakarzinome anhand von Tissue Microarrays

5.1.1 Das Prinzip der Tissue Microarray (TMA) Methode

J. Kononen et al. entwickelten 1998 die Methode der Tissue Microarrays [47]. Bei dieser Technologie werden aus einem so genannten Spenderblock (=“Donorblock“), in dem die Primärtumoren in Paraffin eingebettet vorliegen, kleine Gewebestanden im Durchmesser von 0,6 bis 3,0 mm entnommen und in einen Empfängerblock eingepflanzt. Diese entnommenen Gewebeareale werden in dem Empfängerblock in eine standardisierte Anordnung überführt. Somit können auf einen einzigen TMA-Block bis zu 1000 Gewebeproben von Primärtumoren überführt und durch die standardisierte Anordnung sehr schnell den Donorgeweben wieder zugeordnet werden. Es ist hierdurch eine Methode entstanden, die wesentlich kostengünstiger und zeitsparender ist als die alte „Sausage“-Block Methode, welche erstmals 1986 von Battifora et al. beschrieben wurde [6]. Es können mit der TMA-Technologie in nur einem Arbeitsgang an bis zu 1000 Gewebeproben von Tumoren in situ Analysen durchgeführt werden, wie z.B. mittels Polymerasekettenreaktion, RNA in situ Hybridisation, Immunhistochemie oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Ein weiterer unschätzbare Vorteil der TMA-Methode ist die sehr gewebeschonende Vorgehensweise, da aus dem Donorblock ja nur kleinste Stenzen für eine immunhistochemische Untersuchung genügen und somit aus einem Spenderblock viele Proben gewonnen werden können. Somit kann aus nur kleinsten Tumormengen dennoch ausreichend Untersuchungsmaterial gewonnen werden. Möglich macht dies vor allem die Entwicklung einer speziellen Stanzmaschine der Firma Beecher Instruments (Silver Spring, MD, USA) und des National Institute of Health, USA. Mit Hilfe dieses Stanzgerätes ist es möglich, genormte zylindrische Biopsien mit sehr kleinem Durchmesser

von bis zu 0,6 mm aus dem Spenderblock zu entnehmen und unter zu Hilfenahme eines Rasters kontrolliert in den Empfängerblock zu übertragen. Selbst dieser winzige Durchmesser reicht aus, um in einem statistisch großen Kollektiv die morphologischen Gegebenheiten des Gewebes beurteilen zu können [40]. Zusätzlich bleibt, bei nicht all zu vielen Stanzungen aus dem Spenderblock, dessen Interpretierbarkeit bezüglich der morphologischen und molekularen Analyse erhalten.

Durch die Tissue-Microarray-Technik ist es nun möglich, die Verifizierung und Lokalisierung spezieller Zielstrukturen (Proteine, DNA, RNA, mRNA) in situ, also am Wirkort in Gewebe und Zellen, mit Hilfe der Immunhistochemie und weiteren Untersuchungsverfahren (z.B. FISH) zu untersuchen.

5.1.2 Die Herstellung der TMA's

Die Donorblöcke, welche die verwendeten Gewebeproben enthalten, wurden zuvor in 4%-igem Formaldehyd fixiert und anschließend nach standardisierten Protokollen in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden aus diesen Donorblöcken zwei TMA's erstellt. Der erste TMA enthielt 144 Fälle von invasiven Mammakarzinomen aus dem Archiv des Pathologischen Institutes Münster und wurde mittels CGH charakterisiert, der zweite TMA war ein prognostischer Gewebearray für weitere immunhistochemische Untersuchungen.

Insgesamt 366 in Paraffin eingebettete Tumoren wurden für die Herstellung der Tissue Mikroarrays verwandt. Es befanden sich darunter Tumoren aller Stages und Differenzierungsgrade, welche nach gängigen Protokollen in folgende Grade eingeteilt wurden: G1 (n=70), G2 (n=163) und G3 (n=131). Es waren unter den untersuchten invasiven Karzinomen keine adenomyoepithelialen Tumoren und keine Tumoren mit myoepithelialen Komponenten wie adenoid-zystische Karzinome.

Zu Anfang musste eine Auswahl geeigneter Tumoren für die Erstellung eines Untersuchungskollektivs getroffen werden. Ausgewählt wurden Tumorproben aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie in Münster anhand der Journal-Nummer der Befundbögen. Für die Untersuchung geeignete Tumoreale wurden durch Anfertigung von 3 µm dicken Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten lichtmikroskopisch ermittelt (Prof. Horst Bürger). Durch Markierung der geeigneten Areale mit einem farbigen Stift dienten diese Schnitte als Schablone für die Entnahme der Gewebestanden aus dem jeweilig zugehörigen Donorblöckchen.

Von jedem dieser Donorblöcke wurde eine Gewebestanzung angefertigt. Hierbei betrug der Durchmesser der Stanze 0,6 mm und der Abstand der Biopsien im Empfängerblock 1,0 mm. Hergestellt wurden die Gewebestanden unter Zuhilfenahme eines TMA-Stanzgerätes der Firma Beecher Instruments, Microarray Technologie, Maryland, USA.

Um die Gewebeproben auf dem Array leicht wieder zu finden, wurden die Proben auf den Empfängerblöcken in Quadranten mit jeweils einhundert Biopsien eingeteilt. Jeder Quadrant enthält eine horizontale Achse (x-Achse) und eine vertikale Achse (y-Achse). Die vertikale Achse ist aufgeteilt in zehn Reihen, welche mit den Buchstaben A-J gekennzeichnet sind. Die horizontale Achse hingegen besteht aus zehn Spalten mit der Nummerierung 1-10. Die einzelnen Quadranten auf jedem Gewebearray sind mit römischen Ziffern in aufsteigender Reihenfolge je nach Anzahl der angelegten Quadranten nummeriert. Die Kennzeichnung der einzelnen Empfängerblöcke wurde aus einer Kombination von römischen und arabischen Zahlen erstellt (I.1 = CGH-Array, I.2 = prognostischer Array).

Auf dem ersten TMA-Block wurden 144 Gewebeproben in zwei Quadranten eingeteilt, auf dem zweiten Block 366 Proben in 4 Quadranten (s. Abbildung 1 und 2).

Mit Hilfe dieser Anordnung konnte somit jede Gewebeprobe auf dem Array anhand der vorhandenen Koordinaten leicht wieder gefunden werden.

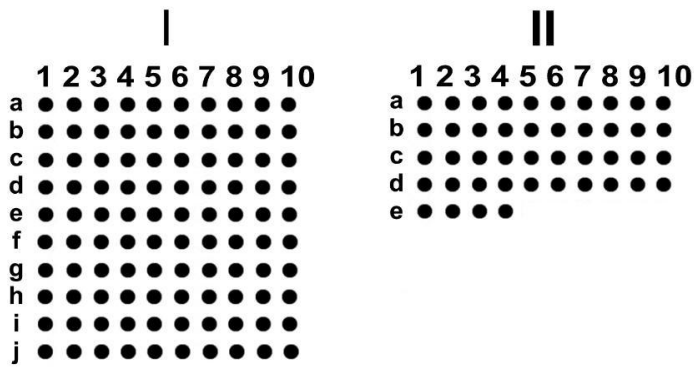
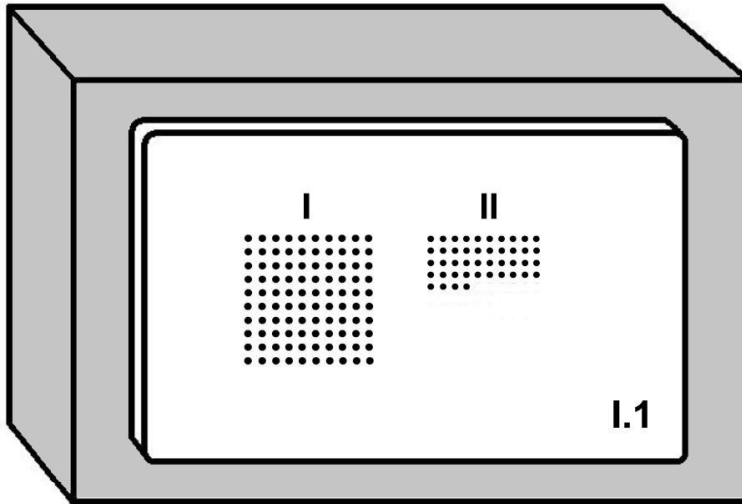


Abb. 1: Anordnung der 144 Gewebeproben auf dem CGH-Array I.1

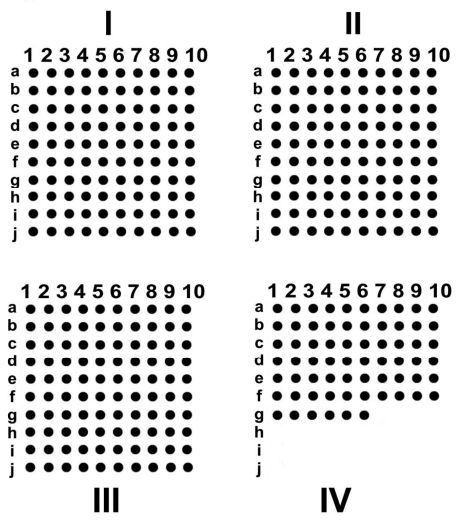
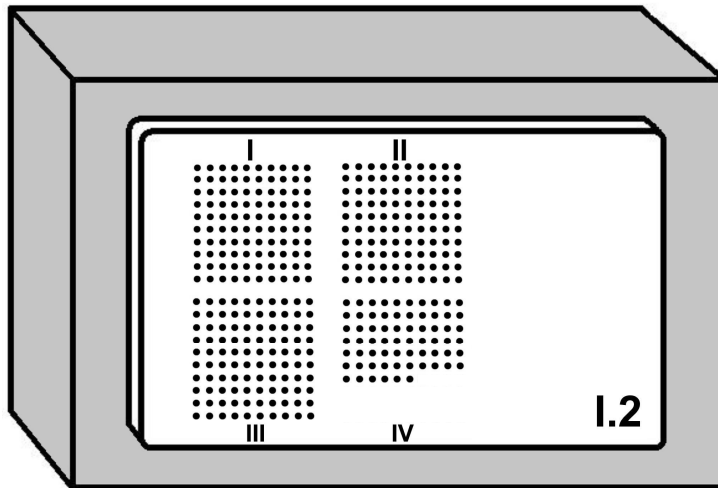


Abb. 2: Anordnung der 366 Gewebeproben auf dem Prognose-Array I.2

5.1.3 Immunhistochemische Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen an Schnitten von 3 µm Dicke durchgeführt. Zur Lokalisation der gesuchten Antigene in den Karzinomen bedient sich die Immunhistochemie der Antigen-Antikörper-Reaktion. Durch die Zugabe spezifischer Antikörper zu den vorbehandelten Schnittpräparaten und eine anschließende Färbung dieser Antigen-Antikörper-Bindungen können Epitope gesuchter Antigene präzise lokalisiert werden.

Für die Färbung der Schnitte in dieser Arbeit wurde die LSAB-Methode (Labelled-Strept-Avidin-Biotin-Methode) angewandt. Diese Methode basiert auf der Reaktion von Streptavidin mit Biotin und markiert somit die Zielantigene nach Zugabe von Chromogen Red in einem kontrastreichen rot, so dass sie nach Gegenfärbung lichtmikroskopisch ausgewertet werden können.

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, deren Vorbehandlung und Verdünnung gibt die Tabelle 4:

Antikörper	Hersteller	Klon	Vorbehandlung	Verdünnung
ER	Novacostra	6F1 I	10´Autoklav	1:30
PR	Novacostra	16	10´Autoklav	1:200
Ki-67	DAKO	Mib-1	10´Mikrowelle	1:40
P53	DAKO		10´Mikrowelle	1:500
c-erbB2	DAKO		10´Mikrowelle	1:400
EGFR	Novacostra		10´Mikrowelle	1:100
CK 5	DAKO	D5/16B4	10´Autoklav	1:80
CK 8/18	Dianova		10´Autoklav	1:40
CK 1	Novacostra	34/B4	30´Steamer	1:150
CK 10	DAKO	DE-K10	30´Steamer	1:400
CK 14	Dianova	LL002	30´Steamer	1:50
CK 19	Quartett	KS19.1	30´Steamer	1:80
Vimentin	Ventana	V9	30´Steamer	1:1000
SMA	DAKO	A14	30´Steamer	1:4000
CD10	Novacostra	56C6	30´Steamer	1:40
P63	Oncogene		10´Autoklav	1:100

Tab. 4: Verwendete Antikörper, Hersteller, Klon, Vorbehandlungsart und Zeit in Minuten, Verdünnungen

5.1.3.1 Angewandte Reagenzien

- *DAKO REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) (LSAB 5005)*

Biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline in gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Natriumazid.

- *DAKO REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP) (LSAB 5005)*

An alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin. In gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Konservierungsmitteln.

- *DAKO REAL™ AP Substrate Buffer (LSAB 5005)*

Gepufferte Lösung mit Konservierungsmittel.

- *DAKO REAL™ Chromogen Red 1/2/3 (LSAB 5005)*

Alle jeweils 28-fach konzentriert.

- *DAKO REAL™ Levamisole (LSAB 5005)*

501-fach gepufferte Levamisole-Lösung.

- *DAKO Cytomation Wash Buffer (S3006)*

Eine 20-fach konzentrierte Tris-Pufferlösung mit 0,05% TWEEN 20. Für den Gebrauch wurden 500 ml der Pufferlösung mit 9,5 Liter deionisiertem Wasser verdünnt.

5.1.3.2 Reagenzvorbereitung der Substrat-Arbeitslösung (CHROM)

Die Substrat-Arbeitslösung wird angesetzt durch gründliches Mischen von 25 Teilen DAKO REAL™ AP Substrate Buffer mit jeweils einem Teil des DAKO REAL™ Chromogen Red 1/2/3, und zwar genau in der Reihenfolge 1-2-3 und gründlichem Vermischen nach der jeweiligen Zugabe des Chromogens. Das erforderliche Chromogen-Lösungsvolumen richtet sich nach der Anzahl der Objektträger und der Größe der anzufärbenden Schnitte.

Zu einer falsch positiven Anfärbung kann es kommen, wenn sich in dem anzufärbenden Gewebe endogene alkalische Phosphatase befindet. Um diese falsch positive Anfärbung zu verhindern muss bei Vorhandensein von endogener alkalischer Phosphatase nach Zugabe des DAKO REAL™ Chromogen Red 2 ein Tropfen DAKO REAL™ Levamisole pro 10 ml DAKO REAL™ AP Substrate Buffer hinzu gegeben und gründlich vermischt werden. Erst dann kann DAKO REAL™ Chromogen Red 3 der Lösung hinzugefügt werden.

Die genaue Zusammensetzung der erforderlichen Komponenten wird nach der DAKO-Tabelle „Chromogen Ansatz bei der AP-Methode ChemMate K 5005“ berechnet.

5.1.3.3 Vorbereitung der Zitratlösung

Um als Stammlösung eine 0,1 M Zitronensäure zu gewinnen, wurden 10,5 g Zitronensäuremonohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) auf 500 ml Aqua dest. aufgefüllt (Stammlösung A). Als Stammlösung B wurde eine 0,1 M Natriumcitrat-Lösung hergestellt. Hierzu wurden 29,41 g Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$) auf 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt.

18 ml der Stammlösung A wurden nun mit 82 ml der Stammlösung B vermischt und mit 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt, um die notwendigen 10 mM Zitratpuffer zu erreichen. Anschließend wurde der pH-Wert auf 6,0 eingestellt.

5.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Die aus dem gekühlten TMA-Block gewonnenen Schnitte (erstellt mit einem Rotationsmikrotom mit der Seriennummer 6288, Typ-Nr. HM 360) wurden in warmem Wasser gespreitet und hatten eine Dicke von 3 μ m. Sofort im Anschluss wurden sie auf einen beschichteten Objektträger („Superfrost plus“, Menzel) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei einer Temperatur

von 56° C über Nacht im Trockenschrank getrocknet, um ein gutes Haften der Schnitte auf dem Objektträger zu gewährleisten.

Die Entparaffinierung der Schnitte wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

1. Abkühlung der Schnitte auf Raumtemperatur
2. 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffinieren
3. 2 x 5 Minuten in 99%igem Alkohol inkubieren
4. 1 x 5 Minuten in 96%igem Alkohol inkubieren
5. 1 x 5 Minuten in 80%igem Alkohol inkubieren
6. 1 x 5 Minuten in 70%igem Alkohol inkubieren
7. Zweimalige Spülung der Schnitte mit Aqua dest. zur Rehydratisierung

Es folgte eine Vorbehandlung der Schnitte mittels Hitze, um eine eventuelle Demaskierung der Antigene durch die Paraffineinbettung und die Formalinfixierung zu entfernen. Hierbei wurden die Schnittpräparate in mit 10 mM Zitratpuffer gefüllte Küvetten gegeben, welche dann in einem Steamer (Dampfgarer der Firma Braun) 30 Minuten lang auf 100° C erhitzt und danach mit kaltem Leitungswasser abgekühlt wurden.

Die Färbung der Schnitte erfolgte mit der Labelled-Strept-Avidin-Biotin-Methode (LSAB) im DAKO Autostainer-Gerät (Code S 3400). Die LSAB-Methode basiert auf der Bindung von Biotin mit Avidin. Biotin bindet hierbei an den mit dem Antigen verbundenen Antikörper. An diesen Komplex bindet wiederum das mit alkalischer Phosphatase markierte Streptavidin, welches durch die Zugabe von Chromogen Red zu einer Rotfärbung des Komplexes führt.

Die LSAB-Methode ist folglich ein dreistufiges Verfahren. In einem ersten Schritt wurden die Schnitte mit dem optimal verdünnten primären Antikörper (s. Tab.4) inkubiert. Der zweite Schritt beinhaltete die Inkubation mit DAKO REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2) und der dritte die Inkubation mit DAKO REAL™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP). Anschließend erfolgte die Visualisierung dieses Komplexes durch Zugabe der Substrat-Arbeitslösung mit dem in dieser Lösung befindlichen Chromogen Red-Anteil.

Der DAKO-Autostainer wurde im ersten Schritt auf die Anzahl der zu untersuchenden Objektträger und die Reagenzien mit Inkubationszeiten in den Protokollvorlagen programmiert. Bevor die Schnitte im Autostainer mit den verdünnten primären Antikörpern inkubiert wurden, wurden sie für 5 Minuten mit DAKO Cytomation Wash Buffer angefeuchtet. Es folgte die Positionierung der Objektträger nach dem programmierten Objektträgeranordnungsplan in dem Autostainer und die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern für 25 Minuten.

Die Inkubation mit Biotin-Antikörper erfolgte nach Spülung der Schnitte mit Waschpuffer in einem zweiten Schritt für 20 Minuten. Ebenso wurden die Schnitte in einem dritten Schritt für 20 Minuten inkubiert, nachdem das mit alkalischer Phosphatase markierte Streptavidin hinzu gegeben wurde.

Nach gründlicher Spülung mit Waschpuffer erfolgte die Färbung des Komplexes durch Zugabe der Enzym-Substrat-Chromogen-Lösung und zweimalige Inkubation im Autostainer für 8 Minuten. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin für 3 Minuten und Bläuvorgang unter fließendem Wasser für 5 Minuten. Die abschließende Konservierung der Schnitte umfasste folgende Schritte:

- Spülung mit Aqua dest.
- Entwässerung der Schnitte mit der aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70%, 1 x 80%, 1 x 96%, 1 x 99%)
- Spülung mit Xylol
- und anschließende direkte Eindeckung der Schnitte aus dem Xylol heraus mit Vitro-Clud™ (Fa.: R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland).
- Abdecken des Gewebes mit einem Deckglas zum Schutz vor äußeren Einflüssen und anschließender Trocknung bei Raumtemperatur.

5.3 Lichtmikroskopische Analyse

Es wurden für die lichtmikroskopische Auswertung nur membranständige Reaktionen mit in die Auswertung genommen. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ nach den Bewertungskriterien von Korsching (Korsching et al., 2002). Die semi-quantitative Auswertung der Kandidatenmarker erfolgte unabhängig durch Prof. Dr. H. Bürger, Facharzt für Pathologie des Gerhardt-Domagk-Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Münster und Dr. J. Packeisen, Facharzt für Pathologie des Instituts für Pathologie des Klinikums Osnabrück.

Die Expression von **ER** und **PR** wurde binär gewertet (positiv: mindestens 10% des Zellkerns positiv). Ebenso binär gewertet wurde die Expression von **CK 1**, **CK 5/6**, **CK 8/18**, **CK 10**, **CK 14**, **CK 19**, **SMA**, **EGFR**, **CD10**, **p63** (jede Zellkern-Reaktion ist positiv) und **Vimentin**.

Die Bewertung von **Ki-67 (MIB-1)** erfolgte nach folgendem Schema:

- 0 = Färbungen in unter 2% der Zellkerne
- 1 = Färbung in 2-10% der Zellkerne
- 2 = Färbung in 11-25% der Zellkerne
- 3 = Färbung in mehr als 25% der Zellkerne

Ähnlich wurde die Bewertung von **p53** und **c-erbB2** (DAKO Score) vorgenommen:

- 0 = Keine Färbung
- 1 = 1-25% der Zellkerne sind angefärbt
- 2 = 26-50% der Zellkerne sind angefärbt
- 3 = mehr als 50% der Zellkerne sind angefärbt

5.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter zu Hilfenahme des elektronischen Statistikprogramms SPSS für Windows, Release 12.0, der Firma SPSS Inc. Die statistischen Zusammenhänge der Daten sind mittels der Korrelationsanalyse nach Pearson untersucht worden. P-Werte <0.05 wurden als signifikant angenommen.

6 Ergebnisse

In einem ersten statistischen Auswertungsschritt wurden die gesamten Fälle auf ihre Auswertungsmöglichkeit hin überprüft. Insgesamt waren 272 der 366 Tumoren auswertbar für die Expression von Vimentin. Die restlichen 94 Fälle konnten nicht im Hinblick auf die Expression von Vimentin ausgewertet werden, da entweder kein Tumor in den tieferen Anteilen der TMA-Spots zu erkennen war oder durch die immunhistologische Aufbereitung der Fälle der Tumor-Spot verloren ging. Von den auswertbaren 272 Fällen waren 21 (= 7,7%) Vimentin-positiv (Tab.13).

6.1 Häufigkeit der Expression der untersuchten Marker

6.1.1 Progesteron

PR

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	218	59,6	66,1	66,1
	1	112	30,6	33,9	100,0
	Gesamt	330	90,2	100,0	
Fehlend	System	36	9,8		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 5: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Progesteron

33,9% der auswertbaren Fälle zeigten eine positive Reaktion auf die Expression von Progesteron an, bei folglich 112 der 330 auswertbaren Proben waren mehr als 10% des Zellkerns angefärbt.

Nicht auswertbar im Hinblick auf die Gesamtfälle waren 36 Proben, was einem Prozentsatz von 9,8% entspricht.

6.1.2 Östrogen

ER

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	176	48,1	53,2	53,2
	1	155	42,3	46,8	100,0
	Gesamt	331	90,4	100,0	
Fehlend	System	35	9,6		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 6: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Östrogen

Tabelle 6 zeigt die absolute und relative Häufigkeit der Expression von Östrogen. Insgesamt lagen 331 auswertbare Fälle vor, was einem Prozentsatz von 90,4% entspricht. Hiervon waren 46,8% der Fälle positiv auf Östrogen. 9,6% der Gesamtfälle konnten nicht ausgewertet werden.

6.1.3 CK 1

CK 1

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	244	66,7	90,0	90,0
	1	27	7,4	10,0	100,0
	Gesamt	271	74,0	100,0	
Fehlend	System	95	26,0		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 7: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK 1

Von 366 Gesamtfällen waren 271 Fälle (74,0%) auf die Expression von CK 1 untersuchbar. Hierbei zeigte sich, dass in 10,0% der Fälle (27 von 271 auswertbaren Proben reagierten positiv auf CK 1) eine Expression von CK 1 nachweisbar war. Nicht auswertbar waren 95 Fälle (26,0%).

6.1.4 CK 5/6

CK 5/6

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	278	76,0	90,6	90,6
	1	29	7,9	9,4	100,0
	Gesamt	307	83,9	100,0	
Fehlend	System	59	16,1		
Gesamt		366	100,0		

Tab.8: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK 5/6

In 9,4% der auswertbaren Fälle war eine Expression von CK 5/6 nachweisbar. Als positiv wurde jede nachweisbare Zellkernreaktion gewertet. Die Gesamtzahl an auswertbaren Fällen lag bei 307 (83,9%), nicht verwertbar waren 59 Fälle (16.1%).

6.1.5 CK 8/18

CK 8/18

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	120	32,8	42,4	42,4
	1	163	44,5	57,6	100,0
	Gesamt	283	77,3	100,0	
Fehlend	System	83	22,7		
Gesamt		366	100,0		

Tab.9: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK 8/18

Tabelle 9 zeigt die absolute und relative Häufigkeit der Expression von CK 8/18. Insgesamt lagen 283 auswertbare Fälle vor, was einem Prozentsatz von 77,3% entspricht. Hiervon waren 57,6% der Fälle positiv auf CK 8/18. 22,7% der Gesamtfälle konnten nicht ausgewertet werden (83 Fälle).

6.1.6 CK 10

Ck 10

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	258	70,5	92,1	92,1
	1	22	6,0	7,9	100,0
	Gesamt	280	76,5	100,0	
Fehlend	System	86	23,5		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 10: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK 10

7,9% der untersuchten auswertbaren Fälle zeigten eine positive Reaktion auf die Expression von CK 10 an, bei folglich 22 der 280 auswertbaren Proben reagierte der Zellkern positiv.

Nicht auswertbar im Hinblick auf die Gesamtfälle waren 86 Proben, was einem Prozentsatz von 23,5% entspricht.

6.1.7 CK 19

CK 19

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	19	5,2	6,7	6,7
	1	263	71,9	93,3	100,0
	Gesamt	282	77,0	100,0	
Fehlend	System	84	23,0		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 11: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK 19

Von 366 Gesamtfällen waren 282 Fälle (77,0%) auf die Expression von CK 19 untersuchbar. Hierbei zeigte sich, dass in 93,3% der Fälle (263 von 282 auswertbaren Proben reagierten positiv auf CK 19) eine Expression von CK 19 nachweisbar war. Nicht auswertbar waren 84 Fälle (23,0%).

6.1.8 CK 14

CK 14

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	259	70,8	87,8	87,8
	1	36	9,8	12,2	100,0
	Gesamt	295	80,6	100,0	
Fehlend	System	71	19,4		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 12: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK 14

In 9,8% der auswertbaren Fälle war eine Expression von CK 14 nachweisbar. Als positiv wurde jede nachweisbare Zellkernreaktion gewertet. Die Gesamtzahl an auswertbaren Fällen lag bei 295 (80,6%), nicht auswertbar waren 71 Fälle (19,4%).

6.1.9 Vimentin

Vimentin

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	251	68,6	92,3	92,3
	1	21	5,7	7,7	100,0
	Gesamt	272	74,3	100,0	
Fehlend	System	94	25,7		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 13: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Vimentin

Tabelle 13 zeigt die absolute und relative Häufigkeit der Expression von Vimentin. Insgesamt lagen 272 auswertbare Fälle vor, was einem Prozentsatz von 74,3% entspricht. Hiervon waren 7,7% der auswertbaren Fälle positiv für Vimentin. 25,7% der Gesamtfälle konnten nicht ausgewertet werden (94 Fälle).

6.1.10 SMA

SMA

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	305	83,3	98,7	98,7
	1	4	1,1	1,3	100,0
	Gesamt	309	84,4	100,0	
Fehlend	System	57	15,6		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 14: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von SMA

1,3% der untersuchten auswertbaren Fälle zeigten eine Reaktion auf die Expression von SMA an. Nicht auswertbar im Hinblick auf die Gesamtfälle waren 57 Proben, was einem Prozentsatz von 15,6% entspricht.

6.1.11 EGFR

EGFR

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	256	69,9	88,3	88,3
	1	34	9,3	11,7	100,0
	Gesamt	290	79,2	100,0	
Fehlend	System	76	20,8		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 15: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von EGFR

Von 366 Gesamtfällen waren 290 Fälle (79,2%) auf die Expression von EGFR untersuchbar. Hierbei zeigte sich, dass in 9,3% der Fälle (34 von 290 auswertbaren Proben reagierten positiv auf EGFR) eine Expression von EGFR nachweisbar war. Nicht auswertbar waren 76 Fälle (20,8%)

6.1.12 p63

p63

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	300	82,0	97,1	97,1
	1	9	2,5	2,9	100,0
	Gesamt	309	84,4	100,0	
Fehlend	System	57	15,6		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 16: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von p63

Als positiv wurde jede nachweisbare Zellkernreaktion gewertet. In 2,5% der auswertbaren Fälle war eine Expression von p63 nachweisbar. Die Gesamtzahl an auswertbaren Fällen lag bei 309 (84,4%), nicht auswertbar waren 57 Fälle (15,6%).

6.1.13 CD10

CD10

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	330	90,2	98,5	98,5
	1	5	1,4	1,5	100,0
	Gesamt	335	91,5	100,0	
Fehlend	System	31	8,5		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 17: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CD10

Insgesamt lagen 335 auswertbare Fälle vor, was einem Prozentsatz von 91,5% entspricht. Hiervon waren 1,4% der auswertbaren Fälle positiv auf CD10. 8,5% der Gesamtfälle konnten nicht ausgewertet werden (31 Fälle).

6.1.14 p53

p53

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	227	62,0	72,5	72,5
	1	33	9,0	10,5	83,1
	2	14	3,8	4,5	87,5
	3	39	10,7	12,5	100,0
	Gesamt	313	85,5	100,0	
Fehlend	System	53	14,5		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 18: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von p53

Insgesamt konnten 313 Fälle (85,5%) auf die Expression von p53 untersucht werden. Eine positive Reaktion (s. auch S. 34) ergab sich in 27,5% (IHC-Score = 1+2+3) der Biopsien. Bei 12,5% der auswertbaren Fälle umfasste die Färbung mehr als 50% der Zellen (IHC-Score = 3). Bei 15% der auswertbaren Biopsien waren weniger als 50% der Zellen angefärbt (IHC-Score = 1 und 2). Nicht auswertbar waren 53 Proben (14,5%).

6.1.15 Ki-67 (Mib-1)

Mib-1

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	117	32,0	36,3	36,3
	1	103	28,1	32,0	68,3
	2	82	22,4	25,5	93,8
	3	20	5,5	6,2	100,0
	Gesamt	322	88,0	100,0	
Fehlend	System	44	12,0		
Gesamt		366	100,0		

Tab. 19: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Mib-1

In 63,7% (IHC-Score = 1+2+3) der auswertbaren Fälle war eine Expression von Mib-1 nachweisbar. Die Färbung umfasste bei 6,2% aller Tumoren mehr als

25% (IHC-Score = 3). 57,5% der auswertbaren Proben zeigten eine Färbung in weniger als 25% der Tumorzellen (IHC-Score = 1 und 2).

Nicht auswertbar waren 44 der insgesamt 366 Fälle, was einem prozentualen Anteil von 12,0% entspricht.

6.1.16 c-erbB2

c-erbB2

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	191	52,2	63,5	63,5
	1	64	17,5	21,3	84,7
	2	22	6,0	7,3	92,0
	3	24	6,6	8,0	100,0
	Gesamt	301	82,2	100,0	
Fehlend	System	65	17,8		
Gesamt		366	100,0		

Tab.20: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von c-erbB2

Insgesamt konnten 301 auswertbare Fälle (82,2%) auf die Expression von c-erbB2 untersucht werden. Eine positive Reaktion ergab sich in 36,6% der auswertbaren Biopsien (IHC-Score = 1+2+3). Bei 8,0% der Biopsien umfasste die Färbung mehr als 50% der Zellen (IHC-Score = 3). Bei 28,6% der Biopsien waren weniger als 50% der Zellen angefärbt (IHC-Score = 1 und 2). Nicht auswertbar waren 65 Proben (17,8%).

6.2 Coexpression von Vimentin mit anderen untersuchten Tumormarkern

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die Coexpression zwischen Vimentin und den weiteren untersuchten Tumormarkern. Tabelle 21 gibt hierbei einen Überblick über die auswertbaren und nicht auswertbaren verarbeiteten Fälle in Bezug zu Vimentin. Um die 4-fach bewerteten Tumormarker mit in diese Statistik einfließen lassen zu können, wurden sie für die statistische Auswertung in ein binäres System umgewandelt. Die Werte 0 und 1 wurden zu 0 zusammengefasst (keine oder nur sehr geringe Reaktion), die Werte 2 und 3 zu 1 (positive Reaktion auf den Marker). Dies betraf die Tumormarker Mib-1, p53 und c-erbB2.

In dieser Kreuzauswertung der angewandten Tumormarker mit Vimentin ist sehr gut erkennbar, dass ein hoher Prozentsatz an auswertbaren Fällen bei allen untersuchten Markern vorhanden ist.

Verarbeitete Fälle

	Fälle					
	Auswertbar		Nicht auswertbar		Gesamt	
	N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
PR * Vimentin	261	71,3%	105	28,7%	366	100,0%
ER * Vimentin	263	71,9%	103	28,1%	366	100,0%
CK 1 * Vimentin	252	68,9%	114	31,1%	366	100,0%
CK 5/6 * Vimentin	241	65,8%	125	34,2%	366	100,0%
CK 8/18 * Vimentin	247	67,5%	119	32,5%	366	100,0%
Ck 10 * Vimentin	251	68,6%	115	31,4%	366	100,0%
CK 19 * Vimentin	255	69,7%	111	30,3%	366	100,0%
CK 14 * Vimentin	257	70,2%	109	29,8%	366	100,0%
SMA * Vimentin	253	69,1%	113	30,9%	366	100,0%
EGFR * Vimentin	243	66,4%	123	33,6%	366	100,0%
p63 * Vimentin	253	69,1%	113	30,9%	366	100,0%
p53 * Vimentin	247	67,5%	119	32,5%	366	100,0%
Mib-1 * Vimentin	258	70,5%	108	29,5%	366	100,0%
CD10 * Vimentin	255	69,7%	111	30,3%	366	100,0%
c-erbB2 * Vimentin	242	66,1%	124	33,9%	366	100,0%

Tab.21: Verarbeitete Fälle mit auswertbaren Prozentzahlen und nicht auswertbaren Fällen in Bezug zu Vimentin

6.2.1 Coexpression von Vimentin und Progesteron

PR * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
PR	0	148	18	166
	1	93	2	95
Gesamt		241	20	261

Tab.22: Coexpression von Vimentin und Progesteron

Positiv sowohl auf Vimentin als auch auf Progesteron waren 2 von 20 untersuchten Vimentin-positiven Tumoren. Insgesamt 93 Biopsien waren Vimentin-negativ, dafür aber Progesteron-positiv.

6.2.2 Coexpression von Vimentin und Östrogen

ER * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
ER	0	115	19	134
	1	127	2	129
Gesamt		242	21	263

Tab.23: Coexpression von Vimentin und Östrogen

Von 21 Vimentin-positiven Tumoren konnte in 2 dieser 21 Tumoren auch die Coexpression von Östrogen nachgewiesen werden. 127 Tumoren waren Östrogen-positiv, aber Vimentin negativ.

6.2.3 Coexpression von Vimentin und CK 1

CK 1 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
CK 1	0	207	20	227
	1	25	0	25
Gesamt		232	20	252

Tab.24: Coexpression von Vimentin und CK 1

In keinem der untersuchten Fälle konnte eine Coexpression von Vimentin und CK 1 festgestellt werden. Insgesamt wurden in 232 Vimentin-negativen Fällen 25 CK 1-positive Biopsien gefunden.

6.2.4 Coexpression von Vimentin und CK 5/6

CK 5/6 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
CK 5/6	0	207	12	219
	1	15	7	22
Gesamt		222	19	241

Tab.25: Coexpression von Vimentin und CK 5/6

Bei der Auswertung der Coexpression von Vimentin mit CK 5/6 zeigte sich, dass in 7 Vimentin-positiven Fällen auch CK 5/6 nachgewiesen werden konnte. In 15 Fällen konnte CK 5/6 auch in Vimentin-negativen Tumoren dargestellt werden.

6.2.5 Coexpression von Vimentin und CK 8/18

CK 8/18 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
CK 8/18	0	86	15	101
	1	140	6	146
Gesamt		226	21	247

Tab.26: Coexpression von Vimentin und CK 8/18

In 6 Fällen fanden sich sowohl Vimentin- als auch CK 8/18-positive Tumoren. Bei 226 Vimentin-negativen Tumoren konnte in 140 Fällen ein CK 8/18-positiver Nachweis erbracht werden.

6.2.6 Coexpression von Vimentin und CK 10

Ck 10 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
Ck 10	0	213	17	230
	1	19	2	21
Gesamt		232	19	251

Tab.27: Coexpression von Vimentin und CK 10

Von 19 Vimentin-positiven Tumoren konnte in 2 dieser 19 Tumoren auch die Coexpression von CK 10 nachgewiesen werden. 19 Tumoren waren CK 10-positiv, aber Vimentin negativ.

6.2.7 Coexpression von Vimentin und CK 19

CK 19 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
CK 19	0	12	4	16
	1	224	15	239
Gesamt		236	19	255

Tab.28: Coexpression von Vimentin und CK 19

Bei der Auswertung der Coexpression von Vimentin mit CK 19 zeigte sich, dass in 15 Vimentin-positiven Fällen auch CK 19 nachgewiesen werden konnte. In 224 Fällen konnte CK 19 auch in Vimentin-negativen Tumoren dargestellt werden.

6.2.8 Coexpression von Vimentin und CK 14

CK 14 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
CK 14	0	206	17	223
	1	31	3	34
Gesamt		237	20	257

Tab.29: Coexpression von Vimentin und CK 14

Positiv sowohl auf Vimentin als auch auf CK 14 waren 3 von 20 untersuchten Vimentin-positiven Tumoren. Insgesamt 31 Biopsien waren Vimentin-negativ, dafür aber CK 14-positiv.

6.2.9 Coexpression von Vimentin und SMA

SMA * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
SMA	0	233	17	250
	1	0	3	3
Gesamt		233	20	253

Tab.30: Coexpression von Vimentin und SMA

In 3 Fällen fanden sich sowohl Vimentin- als auch SMA-positive Tumoren. Bei 233 Vimentin-negativen Tumoren konnte auch kein SMA-positiver Nachweis erbracht werden.

6.2.10 Coexpression von Vimentin und EGFR

EGFR * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
EGFR	0	200	13	213
	1	24	6	30
Gesamt		224	19	243

Tab.31: Coexpression von Vimentin und EGFR

Von 19 Vimentin-positiven Tumoren konnte in 6 dieser 19 Tumoren auch die Coexpression von EGFR nachgewiesen werden. 24 Tumoren waren EGFR-positiv, aber Vimentin negativ.

6.2.11 Coexpression von Vimentin und p63

p63 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
p63	0	227	19	246
	1	6	1	7
Gesamt		233	20	253

Tab.32: Coexpression von Vimentin und p63

Bei der Auswertung der Coexpression von Vimentin mit p63 zeigte sich, dass in einem Vimentin-positiven Fall auch p63 nachgewiesen werden konnte. In 6 Fällen konnte p63 auch in Vimentin-negativen Tumoren dargestellt werden.

6.2.12 Coexpression von Vimentin und p53

p53 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
p53	0	189	12	201
	1	38	8	46
Gesamt		227	20	247

Tab.33: Coexpression von Vimentin und p53

Tabelle 33 zeigt die Coexpression von Vimentin mit p53. Positiv sowohl auf Vimentin als auch auf p53 waren 8 von 20 untersuchten Vimentin-positiven Tumoren. Insgesamt 38 Biopsien waren Vimentin-negativ, dafür aber p53-positiv.

6.2.13 Coexpression von Vimentin und Mib-1

Mib-1 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
Mib-1	0	160	9	169
	1	78	11	89
Gesamt		238	20	258

Tab.34: Coexpression von Vimentin und Mib-1

In 11 Fällen fanden sich sowohl Vimentin- als auch Mib-1-positive Tumoren. Bei 78 Vimentin-negativen Tumoren konnte ein Mib-1-positiver Nachweis erbracht werden.

6.2.14 Coexpression von Vimentin und CD10

CD10 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
CD10	0	235	17	252
	1	1	2	3
Gesamt		236	19	255

Tab.35: Coexpression von Vimentin und CD10

Bei der Auswertung der Coexpression von Vimentin mit CD10 zeigte sich, dass in 2 Vimentin-positiven Fällen auch CD10 nachgewiesen werden konnte. In einem Fall konnte CD10 auch in Vimentin-negativen Tumoren dargestellt werden.

6.2.15 Coexpression von Vimentin und c-erbB2

c-erbB2 * Vimentin Coexpression

Anzahl

		Vimentin		Gesamt
		0	1	
c-erbB2	0	180	18	198
	1	43	1	44
Gesamt		223	19	242

Tab.36: Coexpression von Vimentin und c-erbB2

Von 19 Vimentin-positiven Tumoren konnte in einem dieser 19 Tumoren auch die Coexpression von c-erbB2 nachgewiesen werden. 43 Tumoren waren c-erbB2-positiv, aber Vimentin negativ.

6.3 Korrelationen

Auch die Korrelationen der untersuchten Marker zu Vimentin wurden mit dem statistischen Programm SPSS für Windows, Release 12.0, der Firma SPSS Inc. durchgeführt. Hierbei konnte aufgezeigt werden, dass die Vimentin-Expression nicht nur positiv mit dem Tumorgrad korreliert ($p < 0,01$), sondern auch mit der Expression von SMA ($p < 0,0001$), p53 ($p < 0,05$), EGFR ($p < 0,01$), CK 5/6 ($p < 0,01$), CD10 ($p < 0,01$) und Mib-1 ($p < 0,05$). Eine negative Korrelation konnte für die Expression von CK 8/18 ($p < 0,0001$), Östrogen ($p < 0,001$), PR ($p < 0,05$) und CK 19 ($p < 0,01$) gezeigt werden. Die Coexpression von p63 und Vimentin konnte in nur einem Fall dargestellt werden (s. Tabelle 32).

Alle anderen untersuchten Marker (CK 14, CK 1, CK 10, p63, c-erbB2) zeigten keine signifikante Korrelation zu Vimentin (s. auch Tabelle 37).

Binär gewertete Marker	Vimentin Korrelation nach Pearson	Vimentin 2-seitige Signifikanz	Anzahl N der ausgewerteten Fälle
SMA	0,374**	0,0001	253
CD10	0,246**	0,01	255
CK 5/6	0,281**	0,01	241
CK 14	0,015***	0,809	257
CK 1	-0,097***	0,123	252
CK 10	0,022***	0,725	251
CK 8/18	-0,189 ^t	0,003	247
CK 19	-0,173 ^t	0,006	255
ER	-0,233 ^t	0,001	263
PR	-0,158 ^t	0,05	261
P63	0,040***	0,528	253
EGFR	0,170**	0,008	243
Marker mit einer 4-fach-Wertung			
Mib-1	0,125*	0,045	258
c-erbB2	-0,098***	0,129	242
p53	0,163*	0,013	247

Tab. 37: Korrelationen nach Pearson

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

*** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant*

**** Die Korrelation ist nicht signifikant*

^t Es liegt eine negative Korrelation vor

6.4 Zytogenetische Ergebnisse

Vimentin-positive Fälle zeigten im Durchschnitt wesentlich mehr zytogenetische Alterationen verglichen mit Vimentin-negativen Fällen: 13,0 bei Vimentin-positiven Fällen entgegen 7,8 bei Vimentin-negativen Fällen; $p < 0,05$. Alle zytogenetischen Alterationen wurden in wesentliche höherer Anzahl in Vimentin-positiven Fällen angetroffen. Eine Ausnahme bildete jedoch der Verlust von Chromosom 16q. Hier konnte ein signifikant höherer Verlust des Chromosoms 16q in Vimentin-negativen Fällen festgestellt werden als in Vimentin-positiven Fällen (55% in Vimentin-negativen Fällen entgegen 14% in Vimentin-positiven Fällen; $p < 0,05$).

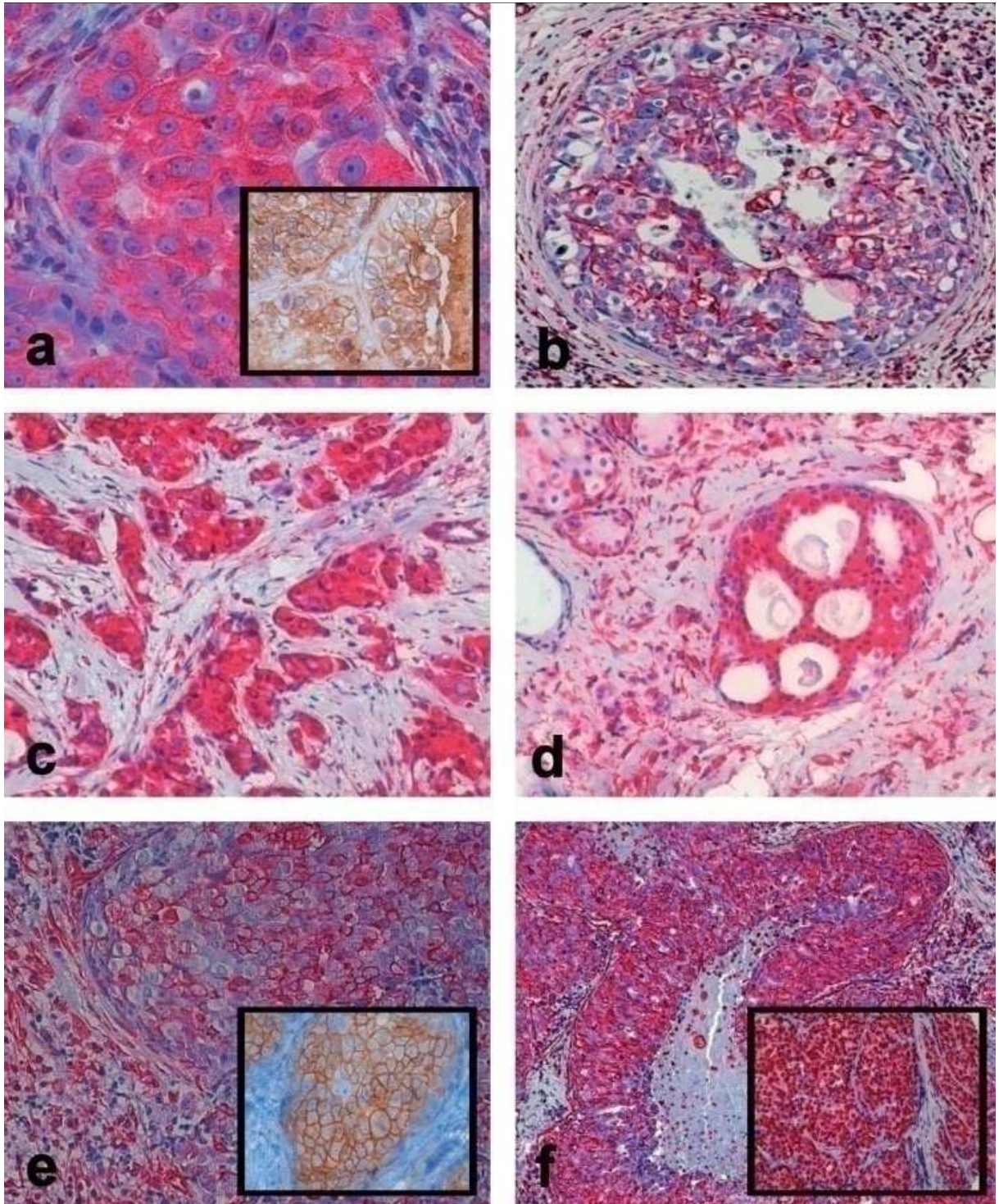


Abb. 3: Beispiele von Vimentin-Expression beim invasiven Mammakarzinom. Homogene Anfärbung von fast allen Tumorzellen in der invasiven Tumorkomponente (x40). Das Grad 3 invasive duktale Karzinom zeigt eine starke, membrangebundene Überexpression von Vimentin, EGFR und p 53.

- a) *Duktales Carcinoma in Situ-Komponente des gleichen Tumors. Der Großteil der intraduktalen Tumorzellen zeigt eine Reaktion für Vimentin-Expression und CD10 (x40).*
- b) *Beispiel für ein duktales Carcinoma in Situ mit homogener Expression von Vimentin (x20).*
- c) *Beispiel für ein invasives duktales Grad 2-Karzinom mit homogener Expression von Vimentin (x20).*
- d) *Gering-mittelgradiges duktales Carcinoma in Situ bei demselben Patienten. Man erkennt die komplette Anfärbung von allen intraduktalen Zellen für Vimentin (x20).*
- e) *Invasives Grad 3-Karzinom mit starker, gleichmäßiger Expression von Vimentin und EGFR (x40).*
- f) *Grad 3-Karzinom mit zentraler Nekrose (x10), starke Expression von EGFR und p53 in allen Tumorzellen (x40).*

7 Diskussion

Das invasive Mammakarzinom ist auch heute noch eine der häufigsten tödlichen Erkrankungen bei der Frau. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, eine schnelle Diagnose der malignen Erkrankung zu stellen und auf Grundlage dieser ein suffizientes Therapiekonzept zu erarbeiten. Die heutigen Methoden bei der Diagnostik des Mammakarzinoms erstrecken sich auf die klinische Inspektion (z.B. Palpation), bildgebende Verfahren (z.B. Sonographie, Mammographie, Galaktographie, Magnetresonanztomographie, Positronen-emissionstomographie und Knochenszintigramm) und pathohistologische Untersuchungen von aus Probeexzisionen gewonnenen Tumorproben. Durch all diese Verfahren kann in der Regel jedoch meistens nur eine Aussage über Art und eventuell Größe des Tumors gemacht werden, allerdings kaum über die Prognose, Aggressivität oder Progression des untersuchten Tumors. Ziel der Forschung auf Ebene der Molekularbiologie und der Immunhistopathologie ist es somit seit vielen Jahren, zu eben diesen oben angeführten Faktoren eine präzisere Aussage machen zu können. Trotz erheblicher Fortschritte auf diesen Gebieten und mittlerweile zur Standarddiagnostik gehörenden immunhistologischen Untersuchungen wie die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron oder die Bestimmung des Her2/neu-Rezeptors, um nur einige wichtige Verfahren zu nennen, bleiben weiterhin viele Fragen zu den Themen Progression, Aggressivität und Prognose unbeantwortet. Auch die mittlerweile immer mehr erforschte Bandbreite an unterschiedlichen Tumorarten beim Mammakarzinom (die WHO unterscheidet mittlerweile 22 invasive Tumorformen und 3 nicht-invasive Tumorformen beim Mammakarzinom) gibt keine genaue Möglichkeit zur Bestimmung der Progression und Aggressivität einzelner Tumoren, da sich viele Tumoren entgegen bisher festgestellter biologischer Abläufe entwickeln und immer neue Untergruppen der bereits bekannten Tumorarten erforscht werden.

Auch die Entstehungswege vieler Mammakarzinome sind bis zum heutigen Tage noch unerforscht. Als ein wichtiger Ansatzpunkt einer zukünftigen frühzeitigen Diagnose und somit rechtzeitigen suffizienten Therapie eines

Karzinoms ist somit das Verständnis und die Erforschung der Tumorentstehung zu sehen.

So stellt sich auch bei der Entstehung Vimentin-positiver invasiver Mammakarzinome die Frage nach der Herkunft und Entwicklung dieser Vimentin-exprimierenden Karzinome. Einige Autoren beschreiben die Entwicklung der Expression von Vimentin in invasiven Mammakarzinomen als das Ergebnis einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) im Endstadium eines immer undifferenzierter werdenden Tumors, andere Autoren sehen aber auch eine mögliche direkte Herkunft der Vimentin-Expression aus einer myoepithelialen Histogenese des Karzinoms [65]. Aber auch die Möglichkeit einer Entstehung dieser Karzinomform aus Progenitorzellen sollte nicht außer Acht gelassen werden.

Um die Herkunft des Vimentins in invasiven Mammakarzinomen genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit aus 366 ausgewählten Mammabiopsien aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie der Universität Münster ein Tissue Microarray angelegt. In diesen TMA's kann jedoch immer nur ein winzig kleiner Ausschnitt aus den betreffenden Tumoren untersucht werden (s. auch Kapitel 5: Material und Methode). Da aber viele Tumore eine heterogene Morphologie aufweisen stellt sich die Frage, ob die Validität des Verfahrens als ausreichend betrachtet werden kann, oder gar ein Spotdurchmesser von 0,6 mm als zu klein anzusehen ist [17,42]?

In der Literatur findet man zahlreiche Aussagen und Untersuchungen zu diesem Thema.

Die Forschungen von Moch et al., welche konventionelle Gewebeanalysen des Mammakarzinoms mit aus diesen Geweben gewonnenen Microarrayanalysen verglichen, konnten nachweisen, dass die auf Microarray-Basis gewonnenen Ergebnisse sich nicht signifikant von den konventionell gewonnenen Ergebnissen unterscheiden [44,52].

Schraml et al. zeigten in ihren Untersuchungen in einer Multitumor-Microarray-Studie, dass man 92% der bekannten Gen-Veränderungen nachweisen kann, wenn man pro Tumorart mindestens 25 Fälle untersucht [67].

Auch Skacel et al. beschäftigten sich mit der Validität von TMA's. Sie untersuchten die Expression von ER, PR (IHC) und die Her-2/neu Amplifikation (FISH) im Mammakarzinom mittels der Microarraytechnik und auf konventionelle Art und Weise. Die Ergebnisse bezüglich des ER- und PR-Status und der Her-2/neu-Amplifikation deckten sich zu 100 %. Beim Vergleich der Prozentsätze an ER- und PR-positiven Zellen wichen die am TMA gewonnenen Werte in 90% der Proben nur um 10–20 % von den an den großen Gewebeproben gewonnenen Werten ab [68]. Ähnliche Ergebnisse zeigten weitere Studien zur Validität von TMA's, welche sich ebenfalls mit der Untersuchung von ER, PR und HER-2/neu Onkoproteinen beschäftigten. Die Konkordanz lag zwischen 90–95 % [20,37,77].

Auch Kononen et al. kamen mit ihren Untersuchungen von Her-2/neu-, c-myc-, cyclin-D1- und 17q23-Amplifikationshäufigkeiten in Brusttumoren mittels TMA zu den gleichen Ergebnissen wie die bisherige Literatur [47].

Ebenso konnten Sallinen et al. mit ihren Ergebnissen zur Häufigkeit von p53 in Gliomen mittels TMA-Analyse und herkömmlicher Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Untersuchungsformen finden [64].

Selbiges Ergebnis zeigten auch Mucci et al. mit ihren Untersuchungen von Prostata Tumoren mittels TMA und anhand großer Gewebeproben. Es fanden sich 100% Übereinstimmung zwischen beiden Verfahren [56].

Durch den Gewebedurchmesser und das Arraydesign kommt es natürlich zu Beeinflussungen der Validität von Tissue Microarrays. Dies gilt insbesondere bei der Erfassung von sehr heterogenem Tumorgewebe. Um eine repräsentative Erfassung des Gewebes zu gewährleisten können zwei Strategien verfolgt werden: zum einen kann durch eine Vergrößerung des Biopsiedurchmessers versucht werden, die Repräsentativität zu erhöhen. Andererseits kann aber auch die Anzahl der Biopsien aus einem Gewebeblock erhöht werden, um so ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

So versuchten Bubendorf et al. in ihren Forschungen mit einem Biopsiedurchmesser von 3 mm zu beginnen [18]. Skacel et al. [68] reduzierten in ihren Studien den Durchmesser der Biopsien auf 1,5 mm und verglichen diese Biopsien mit einem zweiten TMA-Versuch, bei dem der Spotdurchmesser

nur noch 0,6 mm betrug. In der gesamten Studie wurden 25 Mammakarzinome auf die Expression von ER und PR sowie auf die Amplifikation von Her-2/neu untersucht. Skacel et al. erhielten bei dieser Versuchsanordnung folgende Ergebnisse: Bei den 50 großen Cores (1,5 mm) lag die Verwertungsquote bei 100 %. Von den 75 kleinen Cores (Durchmesser 0,6 mm) gingen hingegen zwei beim Schneiden und vier beim Stanzen verloren. Die Verfügbarkeit lag somit bei 91%. Lediglich bei einem Fall gingen jedoch alle 3 Cores verloren, so dass von den restlichen Fällen immer noch 2 Cores erhalten werden konnten. Die Verwertungsquote lag somit bei den kleinen Cores bei 96% [68].

Bei der Auswertung der beiden unterschiedlichen TMA´s konnten Skacel et al. dann im Ergebnis eine 100%ige Übereinstimmung der Befunde aufzeigen. Sowohl die Expression von ER und PR als auch die Amplifikation von Her-2/neu stimmten im Ergebnis auf beiden TMA´s überein. Somit konnte gezeigt werden, dass ein Biopsiedurchmesser von 0,6 mm adäquat die Expression und Amplifikation der untersuchten Marker widerspiegelt. Jedoch ist die Gefahr eines Coreverlustes etwas höher bei Biopsien mit kleinem Durchmesser als bei Biopsien mit größerem Durchmesser [68].

Im Allgemeinen herrscht heutzutage die Meinung vor, dass der Einsatz von Tissue Microarrays sehr gut dazu geeignet ist, insbesondere große Stückzahlen von Gewebe auf das Vorhandensein von Markern zu untersuchen. Sind einzelne Marker nach diesem Screening als bedeutsam herauszustellen, kann man diese mit der konventionellen Analyse weiter untersuchen [18,44,52,68].

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte hat sich herausgestellt, dass die Brustkrebsentwicklung über multiple Entwicklungswege vonstatten geht. Die Entwicklung eines invasiven Mammakarzinoms mit seinen vorherrschend exprimierten Markern und Alterationen zeigt, dass die Entstehung dieses Tumors nur auf multiplen Wegen geschehen kann und nicht mit einer unigenen Vorgängerläsion für alle invasiven Mammakarzinome erklärt werden kann [19,81]. So sollten auch Vimentin-positive Karzinome als eine eigenständige, unabhängige Mammakarzinom-Untergruppe angesehen werden, da die Verteilung des Chromosom 16q-Verlustes in Vimentin-positiven Fällen (16q

Verluste in 14% der Fälle) eine Entwicklung dieser Karzinome aus Vimentin-negativen Fällen (16q Verluste in 55% der Fälle) nicht unterstützt.

Die Coexpression von Vimentin mit CD10, SMA und CK 5 könnte auf eine direkte Entstehung aus myoepithelialelem Gewebe hinweisen. Rachel Kesse-Adu et al. untersuchten 77 ER-negative und 40 ER-positive Fälle auf die Expression von SMA, CD10 und S100, welche Marker für nicht-Östrogen-exprimierende myoepitheliale Zellen sind. 29% (22/77) der ER-negativen Tumoren reagierten auf die untersuchten Marker, jedoch nur eines der ER-positiven Karzinome (1/40 = 2,5%). Dieser signifikante Unterschied ($p < 0.01$) zeigt auf, dass möglicherweise eine kleine Gruppe an Brusttumoren existiert, welche direkt aus myoepithelialelem Gewebe entstehen könnten [45].

Jedoch wirft die komplette Abwesenheit von p63 innerhalb unserer untersuchten Vimentin-positiven Fälle einige Zweifel an der direkten myoepithelialen Entstehung dieser Karzinome auf. Des Weiteren wurde in einigen Studien und Veröffentlichungen bestätigt, dass weniger als 1% der Mammakarzinome eine direkte Entstehung aus myoepithelialelem bzw. adenomyoepithelialelem Gewebe aufweisen [9,75]. Vimentin-positive, duktal-invasive Mammakarzinome konnten hingegen sowohl in anderen Versuchen als auch in unserer Studie in einem wesentlich höheren Prozentsatz nachgewiesen werden. So fanden sowohl Thomas et al., welche in ihren Forschungen Vimentin- und Keratin-exprimierende Mammakarzinome auf ihre Aggressivität und Metastasierungsgeschwindigkeit hin untersuchten, als auch Dandachi et al. in ihren Studien einen deutlich höheren Prozentsatz an Vimentin-exprimierenden Mammatumoren [25,76].

Auch das komplette Fehlen einer Verbindung zwischen klassischen myoepithelialen Tumoren und Vimentin-positiven Brustkarzinomen sowohl in der wissenschaftlichen Literatur als auch in der vorliegenden Studie scheint einen Ursprung dieser Karzinome aus myoepithelialelem Gewebe zu widerlegen [73]. Im Hinblick auf die hohe Proliferationsrate der Vimentin-positiven Mammakarzinome wären diese Tumoren die undifferenziertesten der myoepithelialen Differenzierungslinie. Auch das Vorhandsein einer derart hohen Proliferationsrate - von sich ansonsten unter physiologischen Gegebenheiten

kaum teilenden myoepithelialen Zelle – in den Vimentin-positiven Tumoren kann ohne das Vorhandensein einer Präkursor-Läsion kaum erklärt werden.

Ein weiterer Erklärungsversuch der Herkunft von Vimentin in invasiven Mammakarzinomen ist die komplette Entdifferenzierung der Karzinome im Endstadium ihrer Entwicklung, die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Sie geht einher mit einem hohen Invasionspotential und einer erhöhten Chemoresistenz der betreffenden Karzinome [69,70].

Der hohe Tumorgrad der Vimentin-positiven Mammakarzinome in dieser Studie scheint diese Annahme zunächst auch zu bestätigen. Aber aus einigen Gründen kann die Entstehung von Vimentin-Expression in diesen Tumoren durch epithelial-mesenchymale Transition ausgeschlossen werden, auch wenn dies ein wichtiger Aspekt in der zellbiologischen Forschung ist [7].

EMT wird als Endstadium der Entwicklung von Mammakarzinomen angenommen und führt zu einer kompletten Entdifferenzierung des invasiven Mammakarzinoms. Ein möglicher Herkunftsort des Vimentins wäre somit die Umwandlung von epithelialelem Gewebe in mesenchymales Gewebe im entdifferenzierten Anteil dieser Tumoren. In der wissenschaftlichen Literatur ist die EMT wie bereits erwähnt einstimmig als das Endstadium einer tumorösen Differenzierung anzunehmen. Allerdings lässt sich in der vorliegenden Studie Vimentin bereits in den den invasiven Tumorkomponenten angrenzenden in-Situ-Anteilen nachweisen, in einem Fall sogar in einem geringgradigen duktalem Carcinoma in situ (s. auch Abb. 3c). Vimentin-Expression wird also auch in Tumorgewebe gefunden, welches noch nicht in das Stadium der epithelialen-mesenchymalen Transition eingetreten ist.

Auch eine morphologisch offensichtliche mesenchymale Komponente, wie sie bei entdifferenzierten Mammakarzinomen im Stadium der EMT zu finden ist [61] und somit ein Hinweis auf eine epithelial-mesenchymale Transition sein könnte, konnte in der vorliegenden Tumorserie nicht festgestellt werden.

Die Frage nach der Herkunft der Vimentin-Expression im invasiven Mammakarzinom kann also mit den beiden oben genannten und diskutierten Entstehungstheorien nicht eindeutig aufgeklärt werden. In diesem Zusammenhang scheint es wichtig zu erwähnen, dass Vimentin-positive

Karzinome scheinbar ein sehr ähnliches immunhistochemisches Expressionsmuster haben wie die in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen CK 5-positiven und BRCA1-mutierten Mammakarzinome [35,48,71,78]. Anscheinend haben die in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen physiologischen Progenitorzellen des normalen Brustgewebes [10,51] signifikante immunhistochemische Analogien zu diesen seltenen CK 5/6- und Vimentin-positiven Tumoren. So beschreiben Böcker et al. in ihren Versuchen die Charakteristik dieser Progenitorzellen. Mit der Doppel-Immunofluoreszenz-Technik konnten sie nachweisen, dass es CK 5-positive Zellen im adulten Brustgewebe gibt. Weiterhin konnte in diesen Versuchen nachgewiesen werden, dass diese Zellen das Potential aufweisen, sich entweder in glanduläre Zellen zu entwickeln (CK 8/18-positiv) oder aber eine Entwicklung hin zu myoepithelialeem Gewebe durchmachen (SMA-positiv) [15]. Unterstützt werden diese Erkenntnisse noch durch Forschungen an Zellkulturen und immunhistochemische Untersuchungen an Mäusen und Humanpräparaten, welche das bilineare Differenzierungspotential von CK 5-positiven und CK 8/18-positiven bzw. negativen Zellgruppen nachweisen [21,27,28,30]. Aber die Assoziation zwischen CK 5-positiven Zellen und der Progenitorzell-Theorie wurde auch kritisch hinterfragt [21].

Ein weiterer potentieller Progenitorzell-Phänotyp ist möglicherweise nachgewiesen durch die gemeinsame Expression von Vimentin und CD10 in subluminalem, glandulärem Brustgewebe mit einem mutmaßlichen Differenzierungspotential hin zu myoepithelialen Zellen [22,59].

Zusätzlich wurde in Arbeiten von Dontu et al., Deugnier et al. und Di Renzo et al. die obligate EGFR-Abhängigkeit der Progenitorzellen beschrieben [27,28,30]. Diese EGFR-Abhängigkeit konnte mit der positiven Korrelation in der vorliegenden Studie zwischen Vimentin und EGFR nachgewiesen werden ($p < 0,01$; s. Tabelle 37). Auch in der wissenschaftlichen Literatur finden sich Arbeiten, die diese Ergebnisse stützen. So beschreiben Coleman et al. sogenannte „Cap Cells“ in der Brust der Maus und Alvi et al. die gleichen „Cap Cells“ in „Neben-Populationen“ der menschlichen Brustdrüse [3,23], welche in

beiden Fällen sowohl EGFR als auch Vimentin exprimieren und somit als Progenitor-Zell-Kompartiment gelten könnten.

7.1 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann angeführt werden, dass sich die Expression von Vimentin im invasiven Mammakarzinom nicht allein durch eine myoepitheliale Histogenese oder eine epitheliale-mesenchymale Transition erklären lässt. Nach Ergebnissen der vorliegenden Studie könnte die Vimentin-Expression im invasiven Mammakarzinom auch aus Brust-Progenitor-Zellen hervorgehen, welche ein bilineares Differenzierungspotential (sowohl glandulärer als auch myoepithelialer Differenzierungsweg) haben. Um diese Hypothese zu stützen müssen in der Zukunft weitere Forschungen zum Thema Vimentin und Progenitorzellen durchgeführt werden, insbesondere um die direkte Entstehung von malignen Entartungen aus Progenitorzellen zu evaluieren. Die Erforschung dieser direkten Entstehungswege der malignen Entartung in der Brustdrüse des Menschen könnten somit dazu beitragen, eine frühere Erkennung von Tumoren zu gewährleisten um somit eine frühzeitigere und damit auch erfolgreichere Therapie einleiten zu können.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J, et al. (2003) Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest* 83: 435–448
- [2] Allred DC, O'Connell P, Fuqua SA (1993) Biomarkers in early breast neoplasia. *J Cell Biochem Suppl* 17G: 125-131
- [3] Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, Enver T, Ashworth A, Vivanco MM, Dale TC, Smalley MJ (2003) Functional and molecular characterization of mammary side population cells. *Breast Cancer Res* 5: R1–R8
- [4] Bastert G (1990) Malignome der Mamma. In: Schmidt-Matthiesen H (Hrsg.) *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe*, Bd.12, 3.Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- [5] Bässler R, Böcker W, Hermanek P et al. (1992) Die gegenwärtige Situation des Grading beim Mammakarzinom, Springer Verlag, S. 878-895
- [6] Battifora H (1986) The multitumor (sausage) block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55: 244-248
- [7] Becker N, Wahrendorf J et al. (1998) *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*, 3. Aufl., Springer Verlag
- [8] Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG (1997) Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity. *J Mol Med* 75: 429-439

- [9] Behranwala KA, Nasiri N, A'hern R, Gui GP (2004) Clinical presentation and long-term outcome of pure myoepithelial carcinoma of the breast. *Eur J Surg Oncol* 30: 357–361
- [10] Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, Tagett R, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E (2004) Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? [review]. *Int J Oncol* 25: 249–258
- [11] Bloom HJG, Richardson WW (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 11: 359-377
- [12] Böcker W, Bier B, Ludwig A, de-Hesselle B, Gerdes J (1993) Benign proliferative lesions and in situ carcinoma of the breast: new immunohistological findings and their biological implications. *Eur J Cancer Prev*, 2 Suppl 3: 41-49
- [13] Böcker W, Bier B, Freytag G, Brömmelkamp B, Jarasch ED, Edel G, Dockhorn-Dworniczak B, Schmid KW (1992a) An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen IV and laminin. Part I: normal breast and benign proliferative lesions. *Virchows Arch A* 421: 315
- Böcker W, Bier B, Freytag G, Brömmelkamp B, Jarasch ED, Edel G, Dockhorn-Dworniczak B, Schmid KW (1992b) An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen IV and laminin. Part II: Epitheliosis and ductal carcinoma in situ. *Virchows Arch. A* 421: 323
- [14] Böcker W, Buerger H (2003) 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* 36 (Suppl. 1): 73-84

- [15] Boecker W, Moll R, Poremba C, Holland R, van-Diest PJ, Dervan P, et al. (2002) Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest* 82: 737–746
- [16] Boogerd et al. (1996) Central nervous system metastase in breast cancer. *Radiother Oncol* 40: 5-22
- [17] Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 195: 72–79
- [18] Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP(1999b) Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridisation on tissue microarrays. *Cancer Res* 59: 803-806
- [19] Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, et al. (1999) Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast - evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 187: 396-402
- [20] Camp RL, Charette LA, Rimm DL (2000) Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 80: 1943-1949
- [21] Clarke CL, Sandle J, Parry SC, Reis-Filho JS, O'Hare MJ, Lakhani SR (2004) Cytokeratin 5/6 in normal human breast: lack of evidence for a stem cell phenotype. *J Pathol* 204: 147–152
- [22] Clayton H, Titley I, Vivanco M (2004) Growth and differentiation of progenitor / stem cells derived from the human mammary gland. *Exp Cell Res* 297: 444–460

- [23] Coleman S, Silberstein GB, Daniel CW (1988) Ductal morphogenesis in the mouse mammary gland: evidence supporting a role for epidermal growth factor. *Dev Biol* 127: 304–315
- [24] Contesso G, Mouriessse H, Friedman S, Genin J, Rouesse J (1987) The importance of histologic grade in long term prognosis of breast cancer: A study of 1100 patients, uniformly treated at the Institute Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* Vol 5, 1378-1386
- [25] Dandachi N, Hauser-Kronberger C, More E, Wiesener B, Hacker GW, Dietze O, Wirl G (2001) Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors and oncoproteins. *J Pathol* 193: 181–189
- [26] Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A et al. (1986) Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastases. *Hum Pathol* 16: 1212–18
- [27] Deugnier MA, Faraldo MM, Janji B, Rousselle P, Thiery JP, Glukhova MA (2002) EGF controls the in vivo developmental potential of a mammary epithelial cell line possessing progenitor properties. *J Cell Biol* 159: 453–463
- [28] DiRenzo J, Signoretti S, Nakamura N, Rivera-Gonzalez R, Sellers W, Loda M, Brown M (2002) Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res* 62: 89–98
- [29] Donegan WL (1992) Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer* 70: 1755-1764

- [30] Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS (2003) In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17: 1253–1270
- [31] Ellis IO, Pinder S, Lee AH, Elston CE (1999) A critical appraisal of existing classification systems of epithelial hyperplasias and in situ neoplasia of the breast with proposals for future methods of categorization: where are we going? *Semin Diagn Pathol* 16: 202-208
- [32] Elston CW, Ellis IO (1998) *The breast. Systemic pathology*, vol. 13, 3rd ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone
- [33] Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767
- [34] Fisher B, Redmond C, Fisher ET, Caplan R, and other Contributing National Surgical: Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators (1988) Relative worth of Östrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-06. *J Clin Oncol* Vol 6, 1076-1087
- [35] Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, et al. (2003) Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 1482–1485
- [36] Friedrich K, Remarque IM (1994) Genetische Aspekte des Mammakarzinoms. *Gynäkologie* 27: 7-11
- [37] Gillett CE, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM (2000) Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol* 192: 549-553

- [38] Gobbi H, Dupont WD, Simpson JF, Plummer WD, Schuyler PA, Olson SJ, Arteaga CL, Page DL (1999) Transforming growth factor- β and breast cancer risk in women with mammary epithelial hyperplasia. *J Natl Cancer Inst* 91: 2096-2101
- [39] Harris JR, Lippmann ME, Veronesi U, Willet W (1992) Breast cancer (first of three parts). *N Engl J Med* 327: 319-328
- [40] Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas M, Kuo D, Leung DHY, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C (2001) Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 158: 1245-1251
- [41] Hopton DS, Thorogood J, Clayden AD, MacKinnon D (1989) Histological grading of breast cancer; significance of grade on recurrence and mortality. *Eur J Surg Oncol* 15(1): 25-31
- [42] Horvath L, Henshall S (2001) The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology* 33: 125–129
- [43] Jones C, Mackay A, Grigoriadis A, Cossu A, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. (2004) Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 64: 3037–3045
- [44] Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 10: 657-662
- [45] Kesse-Adu R, Shousha S (2004) Myoepithelial markers are expressed in at least 29% of Östrogen receptor-negative invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 17: 646–652

- [46] Knörr K, Knörr-Gärtner H, Beller FK, Lauritzen C (1989) Geburtshilfe und Gynäkologie, Physiologie und Pathologie der Reproduktion. 3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 141-143
- [47] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue Microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine* 4: 767-768, 844-847
- [48] Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, et al. (2002) Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 82: 1525–1533
- [49] Krainer M, Zojer N, Huber H, Mannhalter C (1995) Genetische Prädisposition für das Mammakarzinom: Übersicht über die molekulargenetischen Grundlagen einer lange bekannten epidemiologischen Beobachtung. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 55: 73-76
- [50] Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ et al. (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48: 5358-5362
- [51] Li Y, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X, et al. (2003) Evidence that transgenes encoding components of the WNT signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15 853–15 858
- [52] Moch H, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue Microarrays: What will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 8: 14-20

- [53] Moll I (1993) Cytokeratine. Marker epithelialer Differenzierung. *Hautarzt* 44: 491-501
- [54] Moll R (1993) Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, S. 1-164
- [55] Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA (2000) Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high-throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol* 31: 406-414
- [56] Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54: 105-115
- [57] O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SA, Osborne CK, Clark GM, Allred DC (1998) Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* 90: 697-703
- [58] Page DL, Jensen RA (1996) Ductal carcinoma in situ of the breast: understanding the misunderstood stepchild. *JAMA* 275: 948-949
- [59] Pechoux C, Gudjonsson T, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW (1992) Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Dev Biol* 206: 88-99
- [60] Petersen OW, Lind Nielsen H, Gudjonsson T, Villadsen R, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ (2001) The plasticity of human breast carcinoma cells is more than epithelial to mesenchymal conversion. *Breast Cancer Res* 3: 213-217

- [61] Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, et al. (2003) Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol* 162: 391–402
- [62] Riede UN, Freudenberg N, Rohrbach R, Schäfer HE (2004) Zellpathologie. In: Riede UN, Werner M, Schäfer HE, eds. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 12-35
- [63] Riede UN, Schaefer HE (1993) *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 3. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, S. 12-35
- [64] Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helen PT, Schraml P, Kallioniemi OP, Kononen J (2000) Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 60: 6617-6622
- [65] Savagner P (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial–mesenchymal transition. *Bioessays* 23: 912–923
- [66] Schnitt SJ, Connolly JL, Tavassoli FA, Fechner RE, Kempson RL, Gelman R, Page D (1992) Interobserver reproducibility in the diagnosis of ductal proliferative breast lesions using standardized criteria. *Am J Surg Pathol* 16: 1133-1143
- [67] Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5: 1966-75
- [68] Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR (2002) Tissue Microarrays: A Powerful Tool for High Throughput Analysis of Clinical Specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10: 1-6

- [69] Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP (1994) Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 31: 325–335
- [70] Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, et al. (1992) Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 5190–5197
- [71] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8418–8423
- [72] Sutherland CM, Mather FJ (1986) Long-term survival and prognostic factors in breast cancer patients with localized (no skin, muscle, or chest wall attachment) disease with and without positive lymph nodes. *Cancer* 57(3): 622-629
- [73] Tavassoli FA (1991) Myoepithelial lesions of the breast. Myoepitheliosis, adenomyoepithelioma, and myoepithelial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 15: 554–568
- [74] Tavassoli FA, Norris HJ (1990) A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductual hyperplasia of the breast. *Cancer* 65: 518-529
- [75] Tavassoli FA, Soares J (2003) Myoepithelial Lesions, Vol 1. WHO: Lyon
- [76] Thomas PA, Kirschmann DA, Cerhan JR, Folberg R, Seftor EA, Sellers TA, Hendrix MJ (1999) Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype and survival in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 5: 2698–2703

- [77] Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159: 2249-56
- [78] van der Groep P, Bouter A, van der Zanden R, Menko FH, Buerger H, Verheijen RH, et al. (2004) Re: Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 96: 712–713
- [79] van Rensburg EJ, Ponder BAJ (1995) Molecular genetics of familial breast-ovarian cancer. *J Clin Pathol* 48: 789-795
- [80] Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, Lemarchand-Beraud T, Gomez F (1986) The predictive value of Östrogen and progesteron receptors concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. *Cancer* 57(6): 1171-1180
- [81] Vos CB, ter Haar NT, Rosenberg C, Peterse JL, Cleton Jansen AM, Cornelisse CJ, van-de Vijver MJ (2000) Genetic alterations on chromosome 16 and 17 are important features of ductal carcinoma in situ of the breast and are associated with histologic type. *Br J Cancer* 81: 1410–1418
- [82] Weinstein MH, Signoretti S, Loda M (2002) Diagnostic utility of immunohistochemical staining for p63, a sensitive marker of prostatic basal cells. *Mod Pathol* 15, Issue 12, 1302-1308
- [83] Williams JM, Daniel CW (1983) Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol* 97: 274

9 Danksagung

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

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

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie, die mir beim Erstellen dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere der medizinisch-technischen Assistentin Frau Inka Buchroth für die kompetente und unkomplizierte Einführung in die Theorie der Versuche und die Hilfestellung bei den immunhistochemischen Färbungen.

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

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, ohne deren fortwährende Unterstützung das Studium der Zahnmedizin und die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Last but not least gebührt meiner Frau Anita Brunsing großer Dank, die mich immer moralisch unterstützt und mir viele Lasten des Alltags abgenommen hat. Nur durch sie hatte ich überhaupt die Zeit für diese Arbeit.

10 Lebenslauf

11 Anhang

11.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abb.1: Anordnung der 144 Gewebeproben auf dem CGH-Array I.1

Abb.2: Anordnung der 366 Gewebeproben auf dem Prognose-Array I.2

Abb. 3: Beispiele von Vimentin-Expression beim invasiven Mammakarzinom. Homogene Anfärbung von fast allen Tumorzellen in der invasiven Tumorkomponente (x40). Das Grad 3 invasive duktales Karzinom zeigt eine starke, membrangebundene Überexpression von Vimentin, EGFR und p 53.

- a) Duktale Carcinoma in Situ-Komponente des gleichen Tumors. Der Großteil der intraduktalen Tumorzellen zeigt eine Reaktion für Vimentin-Expression und CD10 (x40).
- b) Beispiel für ein duktales Carcinoma in Situ mit homogener Expression von Vimentin (x20).
- c) Beispiel für ein invasives duktales Grad 2-Karzinom mit homogener Expression von Vimentin (x20).
- d) Gering-mittelgradiges duktales Carcinoma in Situ bei demselben Patienten. Man erkennt die komplette Anfärbung von allen intraduktalen Zellen für Vimentin (x20).
- e) Invasives Grad 3-Karzinom mit starker, gleichmäßiger Expression von Vimentin und EGFR (x40).
- f) Grad 3-Karzinom mit zentraler Nekrose (x10), starke Expression von EGFR und p53 in allen Tumorzellen (x40).

11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms gemäß der WHO mit Hilfe der TNM-Klassifikation

Tabelle 2: Kriterien des Gradings für das Mammakarzinom

Tabelle 3: Graduierung und Definition der Scoresummen

Tabelle 4: Verwendete Antikörper, Hersteller, Klon, Vorbehandlungsart und Zeit in Minuten, Verdünnungen

Tabelle 5: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Progesteron

Tabelle 6: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Östrogen

Tabelle 7: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK1

Tabelle 8: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK5/6

Tabelle 9: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK8/18

Tabelle 10: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK10

Tabelle 11: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK19

Tabelle 12: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CK14

Tabelle 13: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Vimentin

Tabelle 14: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von SMA

Tabelle 15: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von EGFR

Tabelle 16: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von p63

Tabelle 17: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von CD10

Tabelle 18: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von p53

Tabelle 19: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Mib1

Tabelle 20: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von c-erbB2

Tabelle 21: Verarbeitete Fälle mit auswertbaren Prozentzahlen und nicht auswertbaren Fällen in Bezug zu Vimentin

Tabelle 22: Coexpression von Vimentin und Progesteron

Tabelle 23: Coexpression von Vimentin und Östrogen

Tabelle 24: Coexpression von Vimentin und CK1

Tabelle 25: Coexpression von Vimentin und CK5/6

Tabelle 26: Coexpression von Vimentin und CK8/18

Tabelle 27: Coexpression von Vimentin und CK10

Tabelle 28: Coexpression von Vimentin und CK19
Tabelle 29: Coexpression von Vimentin und CK14
Tabelle 30: Coexpression von Vimentin und SMA
Tabelle 31: Coexpression von Vimentin und EGFR
Tabelle 32: Coexpression von Vimentin und p63
Tabelle 33: Coexpression von Vimentin und p53
Tabelle 34: Coexpression von Vimentin und Mib1
Tabelle 35: Coexpression von Vimentin und CD10
Tabelle 36: Coexpression von Vimentin und c-erbB2
Tabelle 37: Korrelationen nach Pearson

11.3 Abkürzungen

ADH	Atypical Ductal Hyperplasia
ALH	Atypical Lobular Hyperplasia
bidest.	bidestillata
BRCA	Breast Cancer Susceptibility Gene
cDNA	copy Deoxyribonucleic Acid
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
CK	Zytokeratin
DCIS	Ductal Carcinoma In Situ
dest.	destillata
DNA	Desoxy Ribonuclein Acid
dt.	deutsch
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	Östrogene Receptor
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
HE	Hämatoxilin-Eosin
Her-2/neu	Human epidermal growth factor receptor, type 2
HPF	High power field

IHC	Immunohistochemistry
LCIS	Lobular Carcinoma In Situ
LH	Luteinisierendes Hormon
LK	Lymphknoten
LOH	Loss Of Heterozygosity
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
Lsg.	Lösung
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
PR	Progesteron Receptor
RNA	Ribo Nuclein Acid
SMA	Smooth Muscle Actin
sog.	sogenante/r/s
RR	Relative Risk (Odd's Ratio)
TGF	Transforming Growth Factor
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumorsize Nodus Metastasis
TSG	Tumorsuppressorgene
UDH	Ductal Hyperplasia of Usual Type
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
z.B.	zum Beispiel