

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

Untersuchungen zu Zytokeratinexpressionsmuster an prämaligen Tumoren
der weiblichen Brustdrüse mittels der Gewebemicroarraytechnik

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

vorgelegt von
Ingrid Katharina Wüller, geb. Westermann
Ennigerloh

2009

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

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Horst Bürger

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Ralph J. Lellé

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2009

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

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zu Zytokeratinexpressionsmuster an prämaligen Tumoren der weiblichen Brustdrüse mittels der Gewebemicroarraytechnik

Wüller, Ingrid Katharina

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Ermittlung von immunhistochemischen Expressionsmustern verschiedener monoklonaler Primärantikörper an benignen Mammaläsionen mit erhöhten Brustkrebsrisiko (v.a. Fibroadenome, Skleradenosen und duktale Hyperplasien), sowie ein anschließender Vergleich mit Ergebnissen von invasiven Mammakarzinomen.

Mittels der Tissue-Microarray-Technik wurde an 313 Gewebeproben prämaligener Mammaläsionen die Expression der monoklonalen Primärantikörper (CK5/6, CK8/18, CK14, p53, p63, Ki-67, bcl-2, EGFR, c-erbB2, Cyclin D1, ER, PR) mit immunhistochemischen Methoden dargestellt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei den Fibroadenomen, Skleradenosen und duktalem Hyperplasien ein sehr ähnliches immunhistochemisches Expressionsmuster vorliegt. Eine Heterogenität besteht jedoch gegenüber dem Cluster der invasiven Mammakarzinome. Eine direkte Vorläuferrolle der untersuchten Läsionen zum invasiven Mammakarzinom erscheint somit eher unwahrscheinlich zu sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2	Morphologie der Mamma	2
1.3	Benigne und maligne Erkrankungen der Brust	3
1.3.1	Benigne proliferative Läsionen der Mamma ohne Atypien.....	3
1.3.2	Duktale Hyperplasie ohne Atypien (Usual Duktal Hyperplasia, UDH)....	6
1.3.3	Atypische Hyperplasie	7
1.3.4	Carcinoma in situ	9
1.3.5	Invasives Mammakarzinom	11
1.4	Immunhistochemische Marker	12
1.4.1	Cytokeratine (CK)	12
1.4.2	Tumorsuppressorgene.....	13
1.4.3	Mib-1	16
1.4.4	ErbB-Genfamilie	16
1.4.5	bcl-2	18
1.4.6	Cyclin D1	19
1.4.7	Hormonrezeptoren: Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptor (PR)....	20
2	Fragestellung.....	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material.....	22
3.2	Tissue- Microarray-Technik.....	23
3.2.1	Herstellung von Tissue-Microarrays.....	23
3.2.2	Herstellung der TMA's aus den Mammaläsionen.....	24
3.3	Immunhistochemie	26
3.3.1	Antigendemaskierung.....	26
3.3.2	LSAB- Methode mit alkalischer Phosphatase	27
3.3.3	Rezepturen der verwendeten Lösungen	29
3.4	Lichtmikroskopische Auswertung	30

4	Ergebnisse	33
4.1	Antikörper- Expression in der Gesamtheit der untersuchten Läsionen der Mamma.....	33
4.1.1	Expression der Cytokeratine CK5/6, CK8/18 und CK14	33
4.1.2	Expression von p53 und p63.....	35
4.1.3	Expression von Antikörpern aus der erbB-Familie (c-erbB2, EGFR) ...	36
4.1.4	Expression von bcl-2	36
4.1.5	Expression von Mib-1	37
4.1.6	Expression von Cyclin D1.....	38
4.1.7	Expression der Hormonrezeptoren ER und PR.....	39
4.2	Antikörper- Expression in den einzelnen Läsionen: Fibroadenome, duktale Hyperplasien und Skleradenosen.....	41
4.2.1	Expression der Cytokeratine CK5/6, CK8/18 und CK14	41
4.2.2	Expression von p53 und p63.....	44
4.2.3	Expression von Antikörpern aus der erbB- Familie (c-erbB2, EGFR) .	46
4.2.4	Expression von bcl-2	47
4.2.5	Expression von Mib-1	49
4.2.6	Expression von Cyclin D1.....	50
4.2.7	Expression der Hormonrezeptoren ER und PR.....	51
4.3	Auflistung der Antikörper- Expression in den einzelnen Läsionen in Form von Medianwerten	57
5	Diskussion	59
6	Literaturverzeichnis	68
7	Danksagung	79
8	Lebenslauf.....	80
9	Anhang.....	I
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	I
9.2	Tabellenverzeichnis.....	II
9.3	Abkürzungen	V

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Im Jahr 2004 starben in Deutschland 98.079 Frauen an bösartigen Neubildungen, wobei das Mammakarzinom mit 17.592 Sterbefällen unter den Frauen an erster Stelle stand.

Auch die Brustkrebsinzidenz zeigt in Deutschland sowie in anderen europäischen Ländern in den letzten 20 Jahren einen aufsteigenden Trend. In der BRD wurden 1998 etwa 46.000 Brustkrebsneuerkrankungen (ca.9-10% aller Frauen) ermittelt, wobei ein weiterer Anstieg der Inzidenz in 2004 von etwa 57.000 erkrankten Frauen pro Jahr festgestellt wurde. Dieser Anstieg wird aber auch aufgrund einer Erweiterung der diagnostischen Früherkennungsmaßnahmen gesehen. Zudem ist diese Erkrankung für etwa ein Drittel (40%) der Neuerkrankungen unter dem 60igsten Lebensjahr verantwortlich und die häufigste Todesursache in der weiblichen Altersgruppe [10].

Die EUROPREVAL Studie von Micheli et al. sieht einen Anstieg der Inzidenz für bösartige Neubildungen in engem Zusammenhang mit einer besseren sozialen und wirtschaftlichen Situation (geringe Krebsprävalenz: Polen, Estland, Slowakei, Slowenien; hohe Krebsprävalenz: Schweden, Schweiz, Deutschland, Italien, Dänemark) [52]. Zeeb et al. beschreibt einen Anstieg der Mortalität für Mammakarzinome bei der Frau und Magen- bzw. Lungenkarzinome beim Mann bei den in Deutschland lebenden türkischen Einwandererfamilien gegenüber ihrer Heimatbevölkerung, wobei er die gesündere mediterrane Lebensweise dort in den Vordergrund stellt [91]. Zudem erkennt Willett et al. eine Beziehung zwischen der Mammakarzinominzidenz und verschiedenen Umweltfaktoren (USA, BRD: high-risk Population; Asien v.a. Japan und Singapur: low-risk Population) [88].

Es werden anerkannte Faktoren benannt, die mit einem erhöhtem Mammakarzinomrisiko assoziiert werden [88, 14]:

- familiäre Belastung (Verwandtschaft 1. Grades).
- behandeltes Mammakarzinom auf der kontralateralen Seite.
- frühe Menarche (<12. Lebensjahr), späte Menopause (>55. Lebensjahr).
- Nullipara, späte Erstgebärende (>35. Lebensjahr).
- Alter >50 Jahre.
- hormonelle Imbalancen (hoher Östrogenspiegel im Blut).
- Adipositas.

1.2 Morphologie der Mamma

Die weibliche Brustdrüse (Glandula mammaria) ist ein hormonabhängiges Organ, dessen Wachstum und Differenzierung durch komplexe Wechselwirkungen von Östrogen, Progesteron, Oxytocin, Prolaktin und weiteren Hormonen reguliert wird [14].

Die Mamma entwickelt sich beim weiblichen Feten im 2. Trimenon durch Proliferation der Basalzellen der Epidermis zu primitiven Milchgängen [14]. Während den ersten beiden Lebensjahren differenziert sich das Epithel weiter, wobei es dann nach Wegbleiben der mütterlichen Hormone zur Involution der Brust kommt.

Bis zur Pubertät bestehen keine wesentlichen Unterschiede in der morphologischen Entwicklung der Brust bei Jungen und Mädchen. In der Pubertät hingegen wachsen unter Hormoneinfluss die tubulären Drüsen und es bilden sich Gänge und Läppchen aus.

Die Drüsenendstücke werden als Azini bezeichnet [38]. Bei der geschlechtsreifen Frau besteht der Drüsenkörper aus 15 bis 20 tubulär verzweigten Einzeldrüsen, die in ein fibröses Stroma eingebettet sind, welches den Fettgewebkörper septenartig durchzieht [14].

Das Gangsystem wird u.a. von dem Ductus excretorius gebildet, der sich im Bereich der Mamille zur Pars infundibularis erweitert und im Porus excretorius

an die Oberfläche tritt. In Höhe der Areola befindet sich der Sinus lactifer, der sich basiswärts zum Ductus lactifer verjüngt, welcher sich wiederum weiter verzweigt. Letztendlich schließen sich die peripheren Gänge dem extralobulären terminalen Ductus (EDT) an, welche dann vom intralobulären terminalen Ductus fortgesetzt werden und schließlich in die Ductuli und Azini übergehen. Diese bilden die Drüsenläppchen (Lobuli). Das terminale Gangsegment mit den Lobuli wird auch als terminale ductulo-lobuläre Einheit (TDLE) bezeichnet.

Die größeren Milchgänge werden von einem zweireihigen, die terminalen Gänge und die Lobuli von einem einreihigen Epithel ausgekleidet. Das v.a. für die Milchbildung verantwortliche luminale Epithel wird von einer äußeren Myoepithelschicht umgeben, die dem Sekrettransport und der Sekretabgabe dient. Die Basalmembran grenzt die Drüse gegen das Binde- und Fettgewebe ab [7].

1.3 Benigne und maligne Erkrankungen der Brust

1.3.1 Benigne proliferative Läsionen der Mamma ohne Atypien

1.3.1.1 Adenose/ Skleradenose

Die Merkmale der Adenose/ Skleradenose bestehen in einer epithelial-myoeptithelialen Hyperplasie und Hypertrophie der TDLE. Aufgrund einer unregelmäßigen Anordnung der myoeptithelialen Proliferationen und einer Stromafibrose ist die Läppchenstruktur bei der Skleradenose weitestgehend aufgehoben, hingegen ist diese bei der Adenose noch erhalten [14]. Dupont und Page stellten ein 1,5 bis 2-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung von Brustkrebs bei dem Vorhandensein einer Skleradenose fest [27]. Zudem wird über eine positive Korrelation zwischen einer Skleradenose und einer atypischen lobulären Hyperplasie (ALH) diskutiert, da eine ALH in dieser Läsion um ein 3-faches häufiger auftreten soll als in anderen Geweben [40].

1.3.1.2 Fibroadenom

Bei dem Fibroadenom handelt es sich um einen meist gut abgrenzbaren, rundlichen Tumor des lobulären Mantelgewebes von sehr unterschiedlicher Größe. Dieser kann einzeln oder multifokal auftreten und steht unter der normalen hormonellen Kontrolle [38]. Die grau-weiße Schnittfläche des Tumors lässt eine angedeutete spaltförmig gefelderte Zeichnung erkennen. Histologisch unterscheiden einige Autoren das perikanalikuläre Fibroadenom von dem intrakanalikulären Fibroadenom. Beim perikanalikulärem Fibroadenom ist das fibroblastische Stroma um die runden bis ovalen Drüsen angeordnet. Beim intrakanalikulären Fibroadenom sind die Drüsen durch das proliferierende Stroma zu hirschgeweihartig verzweigten, spaltförmigen Hohlräumen komprimiert. Das im Vordergrund stehende Stroma kann myxoide, fibröszelluläre und sklerotische Eigenschaften vorweisen. Im Stroma können osteokartilaginäre und lipomatöse Metaplasien vorkommen, in 15-30 % schollige Verkalkungen und als Besonderheiten epithelogene Riesenzellen [61]. Juvenile Fibroadenome treten v.a. bei Frauen in der Adoleszenz und bei jungen Frauen auf, können aber alle Altersklassen betreffen. Häufig wird das juvenile Fibroadenom als ein schnell wachsender Tumor beschrieben. Fibroadenome neigen zu verschiedenen Veränderungen wie Zysten, sklerosierende Adenose, Mikrokalzifikationen und papillär-drüsigen Veränderungen. Bei diesen sogenannten „komplexen Fibroadenomen“ soll das relative Risiko für Brustkrebs erhöht sein [28]. Postmenopausal kann es auch zu regressiven Veränderungen in Form von Vernarbungen und dystrophen Verkalkungen kommen [14].

1.3.1.3 Radiäre Narbe (infiltrierende Epitheliose)

Die radiäre Narbe ist durch eine sternförmige Anordnung der Drüsenproliferate und eine intraluminale Epithelhyperplasie gekennzeichnet. Im Zentrum dieses Prozesses steht eine Fibrose und Hyalinose, die häufig obliterierte Milchgänge mit einer starken Elastose umgeben. Das Myoepithel ist erhalten. Die größeren,

häufig ektatischen Milchgänge können papilläre, solide und auch kribiforme, zum Teil auch atypische Epithelhyperplasien und Mikrokalzifikationen enthalten [7]. Jacobs et al. stellten fest, dass das Brustkrebsrisiko bei Frauen mit einer radiären Narbe fast doppelt so hoch ist, als bei Frauen ohne diese Läsion [39]. Diskutiert wurde auch ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko bei vorhandener radiärer Narbe in der ipsilateralen zur kontralateralen Brust. Diese Hypothese konnte von Nielsen et al. nicht gestützt werden [62].

1.3.1.4 Phylloide Tumore („Cystosarcoma phylloides“)

Phylloide Tumore sind seltene fibroepitheliale, runde oder ovalknollige Tumore, die sich pseudokapsulär von der Umgebung abgrenzen und teilweise mehrknotige Konglomerate bilden. In der meist gelb-grauen Farbe der Tumorschnittfläche werden teilweise auch Zysten, Nekrosen und Blutungen sichtbar. Dieser zelldichte, dem Fibroadenom verwandte Tumor, kann im Gegensatz zum Fibroadenom zelluläre und nukleäre Polymorphismen, Riesenzellen sowie Stromametaplasien enthalten. Ein gehäuftes Auftreten der phylloiden Tumore findet sich vor allem in der vierten Lebensdekade. Die Dignitätsabschätzung ist schwierig. Es werden benigne, borderline und maligne phylloide Tumore unterschieden. Die Klassifikation erfolgt nach Mitoseaktivität, Kernpolymorphismen, Nekrosen und Tumorgroße. Weitere Parameter sind das Überwuchern des Stromas und der Tumorrand (infiltriert oder scharf abgegrenzt). Die malignen Tumore sind durch sarkomatös transformiertes Stroma gekennzeichnet, das gewöhnlich in einer myxoiden Grundsubstanz gebündelte oder faszikuläre Formationen von Spindelzellen mit Eigenschaften eines Fibroadenoms enthält, ferner netzartige und aufgelockerte Zellverbände sowie wenig differenzierte und pleomorphzellige Texturen aufweist [7; 50]. Der mesenchymale Anteil kann Fettgewebsinseln, quergestreifte Muskulatur und sogar Knochen beinhalten.

1.3.2 Duktale Hyperplasie ohne Atypien (Usual Duktal Hyperplasia, UDH)

Die UDH zeigt eine intraduktale epitheliale Hyperplasie aus Epithelzellen mit basalem Keratintyp (CK5/6/14) und Drüsenepithelien mit luminalem Keratintyp (CK8/18/19). Morphologisches Kennzeichen der UDH ist eine intraluminale, bunte, ungeordnete Epithelproliferation aus spindelzelligen und zylindrischen Zellen mit schlecht oder nicht erkennbaren Zellgrenzen. Form, Größe und Architektur der Zellen mit schlecht oder nicht erkennbaren Zellgrenzen reicht von polygonalen, spindelzelligen bis zu zylindrischen Zellen. Auch die meist ovalen, teils runden euchromatischen Zellkerne unterscheiden sich in Größe, Form und Lagerung und zeigen Überlappungen. Bei paralleler Lagerung der Kerne entsteht der Eindruck eines Strömens und Fließens der Zellen [11; 13].

Nach dem Ausmaß der Proliferation werden leichte fokale Hyperplasien von mittelgradigen und komplexen Läsionen mit komplett ausgefüllten Lumen unterschieden.

Zur Unterscheidung einer UDH zur duktalem Neoplasie ist der Nachweis atypischer monomorpher Zellproliferationen von Bedeutung. Im frühen Stadium des klonalen Zellwachstums findet sich meist nur ein Zelltyp (kleinzelliger Typ, Zylinderzell-/ Spindelzelltyp, polygonaler Typ, polymorpher Typ oder apokriner Typ).

Weiterhin dient der Beurteilung der UDH das Wachstumsmuster. Papilläres Wachstum liegt bei Tumoren mit echten Papillen mit meist schmalen Stromakernen vor. Außerdem können sich Zellbrücken ausbilden, die das Lumen der Gänge durchkreuzen können. Vollständig mit Epithel ausgekleidete Lumina der Drüsen werden als solides Wachstum bezeichnet und zum Teil befinden sich noch kleine Ausführungsgänge am Rand des ehemaligen Duktus (cribiformes/ fenestrierendes Wachstum). Mikropapilläres Wachstum mit Ausbildung von kleinen starren ins Lumen reichenden Epithelknospen findet sich gehäuft beim Kleinzell- und Zylinderzelltyp. Eine tapetenartige Auskleidung der Drüse mit Tumorzellen (Clinging- Typ) kann bei allen Zelltypen auftreten

[13]. Sehr selten wird auch eine Hyperplasie der myoepithelialen Zellen beobachtet [58; 68; 78]. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass etwa 4% der Frauen mit bekannter UDH in einem Zeitraum von 15 Jahren ein Karzinom entwickeln. Es besteht ein 1,5 bis 2-fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Mammakarzinoms gegenüber der gesunden Bevölkerung [27; 67].

1.3.3 Atypische Hyperplasie

1.3.3.1 Atypische lobuläre Hyperplasie (ALH)

Die atypische lobuläre Hyperplasie und das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) stehen in enger Verbindung zueinander. Kennzeichnend für die ALH ist eine neoplastische Proliferation des lobulären Epithels mit hellem Zytoplasma und großen runden Zellkernen, wodurch die Ductuli (Azini) nur zum Teil (bis zu ca. 50%), d.h. mit Restlumina, ausgefüllt werden und es somit zu keiner wesentlichen Vergrößerung der Läppchenstruktur kommt. Durch eine intakte Basalmembran und durch die Myoepithelzellschicht werden die proliferativen Zellen vom angrenzenden, gefäßführenden Stroma getrennt. Somit bleibt die Läppchenstruktur erhalten. Es ist häufig ein makroskopischer und/ oder mammographischer Zufallsbefund, da diese Läsion meist nicht palpable ist und häufig asymptomatisch verläuft.

Page et al. beschreiben in einer Kohortenstudie ein 3-fach erhöhtes Brustkrebsrisiko in der betroffenen Brust gegenüber der nicht erkrankten kontralateralen Brust [69]. Das relative Risiko für Brustkrebs bei Frauen mit einer ALH wird mit 3,1 aufgezeigt [72]. In einer früheren Studie unterscheidet Page noch zwischen der ALH mit Befall von Lobuli und Ductuli (relatives Risiko der Brustkrebsentwicklung: 6,8) und der ALH allein (Relatives Risiko: 4,3) oder einem alleinigen duktalem Befall der ALH (Relatives Risiko: 2,7).

1.3.3.2 Atypische duktale Hyperplasie (ADH)

Die atypische duktale Hyperplasie wird häufig als ein Anfangsstadium des duktales Carcinoma in situ (DCIS) diskutiert und es ist auch in vielen zytologischen Merkmalen nur schwer vom DCIS zu unterscheiden. In der ADH finden sich viele Veränderungen, die im DCIS oder in der UDH vorkommen, aber die ADH lässt sich keiner der beiden Läsionen direkt zuordnen.

Nachdem die ADH lange Zeit nicht genau definiert werden konnte, ergeben sich nun histologische Kriterien, die als morphologische Merkmale anerkannt sind. Somit wird die ADH als eine klonale neoplastische Epithelproliferation mit den histologischen Kriterien einer Non- High- Grade DCIS definiert. Histologisch kennzeichnend ist eine Proliferation monomorpher, atypischer Zellen, die mit einem cribiformen (Römische Brücken, Trabekel, starre Mikropapillen) oder soliden Wachstumsmuster einhergehen. Es werden nur wenige Mitosen und keine Nekrosen gefunden. Myoepithel und Basalmembran sind intakt. Die Läsion ist auf die Läppchen begrenzt.

Vor allem bestehen qualitative Unterschiede der Zellproliferation zur Unterscheidung der ADH mit atypisch monomorphen Zellen gegenüber der UDH mit einem gemischtzelligen bunten Zellbild. Eher quantitative Unterschiede mit der Aussparung der Gänge zeigen sich bei der Abgrenzung der ADH zum niedrig und intermediär differenzierten DCIS [13].

Auf der Grundlage einer Langzeitstudie von Page et al. ist die spätere Entwicklung eines Mammakarzinoms bei der ADH wie auch bei der ALH um das 4 bis 5-fache gegenüber der Allgemeinbevölkerung gesteigert [70]. Bei positiver Familienanamnese wird das Karzinomrisiko sogar als doppelt so groß beschrieben.

1.3.4 Carcinoma in situ

1.3.4.1 Lobuläres Carcinoma in situ (LCIS)

Das lobuläre Carcinoma in situ wird als eine präkanzeröse Erkrankung der Brust angesehen, die mit einer Erkrankungsrate von 0,5% bis 3,6% in der Allgemeinbevölkerung als Diagnose gestellt wird [71; 34]. Da das LCIS meist keine klinischen Symptome verursacht und meist nicht palpabel ist, wird es häufig als Begleitbefund (z.B. bei Fibroadenomen, sklerosierender Adenose) bzw. als Zufallsbefund gefunden oder als atypische lobuläre Hyperplasie missgedeutet. Häufig treten Mikrokalzifikationen auf, die dann in der Mammographie nachweisbar sind. Histologisch stellt das LCIS eine solide, die Ductuli (Azini) der Drüsenläppchen ausfüllende Neoplasie von isomorphen kleinen Zellen dar, die häufig extralobuläre Gangsegmente sowie Gruppen von Lobuli im Sinne eines multifokalen und multizentrischen Wachstums mit einbezieht. In den meist hyperchromatischen Kernen finden sich keine Mitosen [8]. Das Zytoplasma enthält häufig in Vakuolen gespeicherte Mukopolysaccharide. Bei verstärkter intrazellulärer Schleimbildung imponieren diese als Siegelringzellen. Laut Andersen et al. sind diese Zellen aber von keiner prognostischen Relevanz [2]. Die proliferierenden Zellen werden durch eine Basalmembran und erhaltenen bis atrophischen Myoepithelzellen vom Stroma abgegrenzt. Die lobuläre Neoplasie füllt typischerweise alle Ductuli eines Läppchens gleichmäßig aus, womit eine Flächen- und Volumenzunahme des einzelnen Lobulus und eine Verdrängung des peripheren Mantelgewebes verbunden ist. Zelluläre Stromareaktionen fehlen oder sind nur geringgradig ausgeprägt [8].

Differentialdiagnostisch zur ALH umfasst die neoplastische Proliferation der Zellen des LCIS mehr als 50% der Azini in einer TDLE und füllt das Drüsenlumen komplett aus [8; 48].

Untersuchungen von Page et al. [71], Rosen et al. [75] und Haagensen et al. [34] haben gezeigt, dass das LCIS mit einem 7 bis 9-fachen Karzinomrisiko behaftet ist.

1.3.4.2 Duktales Carcinoma in situ (DCIS; intraduktales Karzinom)

Histologisch werden durch eine fortlaufende neoplastische Proliferation der epithelialen Tumorzellen in den TDLE nicht nur die terminalen Gangsysteme mit atypischen und transformierten Zellen ausgekleidet, sondern es kommt zum Befall des gesamten Lobulus. Dieses führt zu einer Ausweitung der TDLE, aber die Basalmembran und die Myoepithelzellschicht bleiben intakt. Ähnlich wie bei der UDH werden auch bei der DCIS verschiedene histologische Wachstumsformen (Komedokarzinom, DCIS mit kribiformen Wachstum, DCIS mit mikropapillären Wachstum, Solides DCIS) unterschieden, wobei sie zumeist nicht homogen in einem DCIS ausgebildet sind [59]. Zudem bestehen Klassifikationen nach Komedonekrosen, nach Zellgröße und nach dem Kernmalignitätsgrad [13].

Aktuell wird europaweit zur Einstufung des Malignitätsgrades des DCIS aufgrund histologischer und zytologischer Kriterien meistens das von Holland et al. beschriebene Gradierungssystem verwendet [37]:

- Gut differenziertes DCIS: in Form und Größe gut differenzierte Zellen und Zellkerne mit wenigen Atypien und wenigen Mitosen.
- Intermediär differenziertes DCIS: Die vorhandenen Pleomorphismen der Nuclei reichen noch nicht für ein schlecht differenziertes DCIS aus.
- Schlecht differenziertes DCIS: viele Atypien, eine sehr hohe Mitoseaktivität, teilweise sehr ausgeprägte Nekrosen.

Die van-Nuys Klassifikation der DCIS nach den histologischen Kriterien und in Verbindung mit den Faktoren „tumorfreier Resektionsrand“ und Tumorgöße wurde von Silverstein et al. als ein prognostischer Index für diagnostische und therapeutische Empfehlungen des DCIS entwickelt [81]. Hierbei werden zu verschiedenen errechneten Scores unterschiedliche Therapieansätze gemacht.

In den Frühstadien der Erkrankung besteht nur die Möglichkeit des histologischen Nachweises des intraduktalen Karzinoms. Bei weiterer Proliferation der Tumorzellen und Ausweitung der TDLE kann der Tumor getastet werden oder bei Kalzifikationen können diese mammographisch

dargestellt werden. Klinisch sind auch blutiger Mamillenausfluß oder Hautulzerationen im Mamillenbereich verdächtig für ein DCIS. Die spätere Entwicklung von Brustkrebs bei diagnostizierten DCIS ist wie auch beim LCIS um ein Vielfaches erhöht (Relatives Risiko: 11) [27].

1.3.5 Invasives Mammakarzinom

Beim invasiven Mammakarzinom werden verschiedene Typen unterschieden. Das invasive duktales Karzinom (sog. not otherwise specified tumors) tritt mit einer Häufigkeit von etwa 80 % auf. Dieses Karzinom bildet eine inhomogene Gruppe und weist keine speziellen Differenzierungsmerkmale auf. Histologisch findet man kohäsive Verbände polymorpher Zellen, die in trabekulären, glandulären und/ oder soliden Formationen innerhalb eines wechselnd stark ausgeprägten sklerosierten oder desmoplastischen Stroma proliferieren.

Mit einer Häufigkeit von etwa 10 bis 20% aller invasiven Tumore tritt laut Mallon et al. das invasiv lobuläre Mammakarzinom auf [49]. Die vier Subtypen (pleomorpher, klassischer, tubulolobulärer, alveolärer Subtyp) des invasiv lobulären Karzinoms weisen einen Verlust der interzellulären Adhäsion und ein häufig fokales Wachstum auf.

Wesentlich seltener treten tubuläre, kribiforme, muzinöse, papilläre, medulläre, apokrine, adenoid-zystische und metaplastische (u.a.) Mammakarzinome auf.

Weitere prognostische und reproduzierbare Aussagen über den Malignitätsgrad eines invasiven Tumors leiten sich aus weiteren Differenzierungseigenschaften eines Mammakarzinoms ab. Elston und Ellis erarbeiteten in einer Langzeitstudie einen prognostischen Bewertungsscore, indem die histologischen Parameter Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate im Rahmen eines Scores beurteilt und in drei verschiedene Grade (1-3) unterschieden werden [29].

1.4 Immunhistochemische Marker

1.4.1 Cytokeratine (CK)

Die Intermediärfilamente bilden einen wichtigen Bestandteil des Cytoskeletts. Diese Intermediärfilamente werden in 6 Hauptgruppen unterteilt, zu denen u.a. die Cytokeratine zählen:

Aminosäure-Sequenztyp	Intermediärfilament- Protein	Hauptvorkommen
Typ 1	saure Cytokeratine Typ1	Epithelzellen / Derivate der Epidermis z.B. Haare, Nägel
Typ 2	basische/ neutrale Cytokeratine	Epithelzellen
Typ 3	Vimentin Desmin Gliafilament- Protein (GFP) Peripherin	mesenchymale Zellen Muskelzellen Astrozyten periphere Neuronen
Typ 4	Neurofilamentäres Tripletprotein Alpha- Internexin	Neuronen Neuronen
Typ 5	nukleäres Laminin	Zellkerne
Typ 6	Nestin	neuroepitheliale Stammzellen

Tabelle 1 Haupttypen intermediärer Filamente [53].

Moll et al. identifizierte zunächst 19 verschiedene Cytokeratine, aber konnte den Katalog der menschlichen Cytokeratine noch um das CK20 erweitern [55; 57]. Diesen epithelialen Cytokeratinen ist die positive Reaktion mit Antikörpern gegen epidermales alpha-Keratin-Protein gemeinsam. Die 20 epithelialen

Cytokeratine werden noch um 10 weitere harte Cytokeratine der haar- und nagelbildenden Zellen ergänzt [53].

Die Cytokeratine werden aufgrund eines unterschiedlichen isoelektrischen Punktes innerhalb der Aminosäuresequenzen in zwei Subgruppen unterteilt:

- Typ 1: saure Cytokeratine (CK9 bis 20).
- Typ 2: neutrale und basische Cytokeratine (CK1 bis 8).

In den Epithelzellen liegen stöchiometrische Mengen an Cytokeratin Typ 1 und Typ 2 vor, da sich jeweils ein Typ 1-CK mit einem Typ 2-CK zum Heterodimer verbindet. Anschließend entsteht mit Hilfe eines Protofilaments aus zwei Heterodimeren ein Tetramer, welches dann das endgültige CK-Filament bildet [53; 22].

Die Cytokeratine können zudem nach ihrem unterschiedlichen Expressionsmuster, das in hohem Maße mit dem epithelialen Zelltyp und dem Differenzierungsgrad korreliert, eingeteilt werden [53]:

- Höher molekulare plattenepitheltypische CK (Typ 2: CK1 bis 6, Typ 1: CK9 bis 17).
- Niedrig molekulare zylinderepitheltypische CK (Typ 2: CK7 und 8; Typ 1: CK18 bis 20).

Es ist bekannt, dass das luminale Epithel einer gesunden Brustdrüse v.a. die zylinderepithelialen Cytokeratine (CK7, CK8, CK18, CK19) exprimiert (aber nicht CK20) und dass das myoepitheliale Epithel v.a. die plattenepithelialen Cytokeratine (CK5, CK6, CK14, CK17) aufweist [56].

1.4.2 Tumorsuppressorgene

1.4.2.1 p53

Das p53 Gen wurde erstmalig 1979 als ein zelluläres Phosphoprotein, welches an das Antigen des SV40 DNA Virus bindet, beschrieben [47]. P53 ist auf dem kurzem Arm des Chromosom 17 (Position 17p13.1) lokalisiert und kodiert für ein 53kDa Protein aus 353 Aminosäuren. Das Amino-terminale Ende dieses

Proteins dient der Aktivierung der Transkription. Die mittlere DNA-Bindungsdomäne bindet spezifische DNA-Sequenzen. Die dritte Domäne, das Carboxy-terminale Ende des Proteins, stabilisiert den mittleren Anteil, was essentiell zur DNA Bindung beiträgt [44; 46]. Die Konzentration des p53 in gesunden Zellen ist gering (Halbwertszeit 20 Minuten) und in einigen dieser Zellen liegt das p53 auch in einer latenten (inaktiven) Form vor [44]. Das p53 Protein spielt bei der Kontrolle des Zellzyklus, bei der DNA Reparatur und Synthese, bei der Zelldifferenzierung und der Apoptose eine zentrale Rolle.

Erst 1989 wurde in einer Studie mit Kolonkarzinomen entdeckt, dass es sich hierbei um das Genprodukt eines Tumorsuppressorgens handelt [23]. Levine et al. zeigte, dass 60% der Malignome Mutationen im p53-Gen aufwiesen und zudem ein kompletter Verlust der Wildtyp-Allele bestand [45]. Mäuse mit Mutationen im p53-Gen waren in ihrer Entwicklung und Differenzierung unauffällig, entwickelten aber innerhalb kürzester Zeit multiple Tumore [26].

Nur das mutierte p53 unterstützt ein abnormales Zellwachstum, wohingegen das Wildtyp p53 eine Tumorsuppressorfunktion besitzt. Die Transkriptionsfunktion des p53 Gen kann durch die Modifikation des Gens selbst oder posttranskriptional z.B. durch Phosphorylierung und durch die Interaktion mit zellulären (z.B. mdm2) oder viralen Proteinen (SV40T Antigen, humanes Papillomavirus E6 oder Adenomavirus E1b Protein) beeinflusst werden.

1.4.2.2 p63

Daniel Caput und seine Mitarbeiter [20] beschrieben 1997 als erste ein dem p53 Gen sehr ähnliches Gen, das p73, und kurze Zeit später wurde auch das p63 Gen isoliert [89]. Wie auch das p53 aktivieren p63 und p73 Transkriptionsfaktoren und bewirken die Apoptose. Die Struktur des p63 Gens (auch bezeichnet als KET, p51, p40, p73L) und des p53 Gens ist sehr ähnlich [64; 77; 89]. Auch das p63 Gen besteht aus einem Amino-terminalen Ende, einer DNA Bindungsdomäne und einem Carboxy-terminalen Ende, welche sich

nur wenig von dem p53 Gen unterscheiden. Das p63 Gen kodiert aber 6 verschiedene Proteine (TAp63alpha, TAp63beta, TAp63gamma, Np63alpha, Np63beta, Np63gamma) als Folge von alternativen Splicing am C-terminalen Ende und verschiedener Promotoren [89]. Die drei TA-Isoformen (TAp63alpha, beta, gamma) werden von einem 5'Promoter transkribiert und kodieren Proteine, die für die Transaktivierung, DNA Bindung und Oligomerisation benötigt werden. Von einem Intron am 3'Promoter werden die drei N-Isoformen (Np63alpha, beta, gamma) transkribiert. Ähnlich dem p53 Protein kann auch das TAp63 Protein DNA binden, Transkription von p53 abhängigen Genen aktivieren und auch die Apoptose induzieren [64; 89]. Yang et al. zeigten eine Expression des p63 Proteins (vor allem die Np63 Isoformen) in den Basalzellen verschiedener epithelialer Gewebe und stellten die Np63 Isoform als einen dominant-negativen Faktor der p63 und p53 Transaktivierung dar [89]. Di Como et al. erkannten eine starke Expression des p63 Proteins vor allem im Nucleus der epithelialen Zellen in mehrschichtigen Epithelien, wie Haut, Oesophagus, Exocervix, Tonsillen, Harnblase und in glandulären Strukturen, wie Brustdrüse und Prostata [25]. Studien mit Mäusen mit einem Mangel bzw. Fehlen des p63 Gens zeigten, dass p63 wichtig für die epitheliale Proliferation und Differenzierung ist [90]. Unterstützt wird die Aussage auch noch durch die Auswirkungen einer p63 Mutation in dem autosomal dominant vererbten EEC (Ectrodactily, Ectodermal dysplasia and facial Clefts) Syndrom [21].

In verschiedenen Studien mit p63 und smooth muscle protein (SMA), ein spezifischer Marker des Zytoplasmas in Myoepithelzellen, wurde deutlich, dass auch das p63 vor allem in den myoepithelialen Zellen des duktaalen und alveolären Epithels der Mamma exprimiert wird [74]. Barbareschi et al. [4] beschreibt p63 sogar als hoch spezifischen und sensitiven Marker der Myoepithelzellen, der aber nach Aussagen von Ribeiro-Silva et al. [74] nicht zur Beurteilung einer Mikroinvasion eines DCIS in der Mamma verwendet werden kann.

1.4.3 Mib-1

Erstmals beschrieben Stein et al. 1981 in einer Studie über Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen den monoklonalen Mausantikörper Ki-67 [83].

Der Antikörper Ki-67 erkennt ein nukleäres Antigen in allen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2-, M-Phase) mit Ausnahme der G0- Phase und ist im Interphasekern, im nukleolären Kortex und im fibrillären dichten Kompartiment lokalisiert [18]. Dieser Antikörper hat somit den Vorteil, dass er nicht nur proliferierende Zellen in der Mitosephase erkennen kann, sondern während des gesamten Zellzyklus. Der neuere Mib-1 Antikörper erkennt native Ki-67 Antigene. Mib-1 hat jedoch den Vorteil das Antigen auch auf formalinfixierten oder paraffineingebetteten Gewebe zu erkennen, wohingegen der Ki-67 Antikörper v. a. bei frischem Gewebe bzw. Gefrierschnitten anwendbar ist [32]. Es besteht jedoch eine signifikante Korrelation zwischen dem Mib-1 und dem Ki-67 Antikörper [24; 41].

1.4.4 ErbB-Genfamilie

Die ErbB- Onkogen- Familie spielt eine große Rolle beim Zellwachstum und Differenzierung in benignen und malignen Geweben.

Als erstes wurde der EGFR (Epidermal growth factor receptor) in der erbB- Onkogen-Familie als menschliches Homolog zum v-erbB Gen identifiziert. Das v-erbB Gen, welches für ein 68kDa Glykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität kodiert, kann nach intramuskulärer Injektion eines v-erbB-Gen tragendem Virus Erythroblastosis und/ oder Sarkome induzieren [31].

Die transmembranöse und zytoplasmatische Domäne des EGFR ist fast identisch mit den entsprechenden Domänen des viralen Onkoproteins v-erbB. Semba et al. beschreiben zudem ein v-erbB verwandtes Gen, das c-erbB2 [79]. Die c-erbB3 und c-erbB4 weisen ebenfalls eine starke Homologie zu den beiden anderen Mitgliedern der c-erbB-Onkogen-Familie auf.

Onkogen-Subtyp	Rezeptor	Ligand
c-erbB1 (HER-1)	EGFR	EGF
		TGF-alpha (Transforming growth factor)
		Beta Cellulin
		Heparin binding growth factor
		Amphiregulin
c-erbB2 (HER-2)	neu- Protein (185 kDa)	? (Heregulin)
c-erbB3 (HER-3)	c-erbB3	Heregulin
		neu differentiation factor 1+2
c-erbB4 (HER-4)	c-erbB4	Heregulin
		neu differentiation factor 1+2

Tabelle 2 Die c-erbB-Onkogen-Familie [76].

1.4.4.1 Epidermal growth factor receptor (EGFR)

Das EGFR-Gen ist auf dem Chromosom 7p13-q22 lokalisiert und kodiert für ein 170kDa Zellmembranrezeptorprotein. Der EGF Rezeptor stimuliert Zellwachstum und Differenzierung nach der Bindung spezifischer Liganden. Dieser Rezeptor besteht aus einer intrazellulären Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität und einer extrazellulären Domäne zur Ligandenbindung. Eine transmembranöse Domäne verbindet diese beiden Abschnitte. Nachdem ein Ligand am EGFR gebunden hat, kommt es unverzüglich zur Autophosphorylierung des Rezeptors und anschließend zur Dimerisierung eines anderen erbB-Rezeptors. Bevor das Protein internalisiert wird, wird eine Tyrosinkinase aktiviert, die wiederum intrazelluläre Proteine phosphoryliert, die für die Signaltransduktion der Differenzierung und des Zellwachstums wichtig sind [31].

1.4.4.2 c-erbB2 Onkogen

Das c-erbB2 Onkogen auf Chromosom 17q21 kodiert ein transmembranäres Glykoprotein von 185kDa (bekannt als p185), das mit einer intrazellulären tyrosinkinasehaltigen Domäne und mit einer extrazellulären Komponente verbunden ist, die dem Aufbau des epidermalen growth factor receptor (EGFR) entspricht [33; 82]. Das c-erbB2 und das HER-2 (Human Epidermal growth factor Rezeptor) sind zwei häufig zusammen verwendete Begriffe für das humane Gen, wohingegen das Akronym „neu“ sich vom Neuroglioblastom der Ratte ableitet [5].

1.4.5 bcl-2

Das bcl-2 Gen (B-cell-leukaemia and lymphoma 2 gene), welches auf dem langem Arm des Chromosom 18 (18q21) lokalisiert ist, wurde erstmals 1984 im Rahmen von Untersuchungen von t(14/18) Chromosomentranslokationen bei B-Zell-Leukämien und in folliculären Non-Hodgkin Lymphomen beschrieben [85]. Das bcl-2 Gen kodiert ein 26kDa Protein, das über ein charakteristisches hydrophobes Carboxy-terminales Ende verfügt und als integrales Membranprotein in der Kernmembran, im endoplasmatischen Retikulum und in der äußeren Membran der Mitochondrien zu finden ist [35].

Das bcl-2 Protein reguliert d.h. stimuliert oder blockiert als Apoptoseinhibitor neben anderen Onkogenen den programmierten Zelltod. Der Wirkmechanismus ist aber nur ansatzweise aufgeklärt.

Nicht nur in hämatopoetischen Zellen wird bcl-2 exprimiert, sondern auch in epithelialen Zellen, welche Hockenbery et al. in 3 Gruppen einteilen [36]:

1. Drüsenepithel, in dem Hormone und Wachstumsfaktoren Hyperplasie und Involution regulieren, wie Mamma, Prostata, Endometrium, Ovar.
2. Komplex-differenziertes Epithel mit langlebigen Stammzellen, wie die Haut oder das Gastrointestinalum.
3. langlebige postmitotische Zellen, wie Neurone.

1.4.6 Cyclin D1

Die Cyclin-Gene werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt [60]:

Die Gruppe der G1-Cycline, die während der G1- Phase des Zellzyklus maximal exprimiert werden und dort den Übergang in die S-phase regulieren, umfasst die Cycline C, D1, D2, D3 und E. Die Mitose-Cycline (Cyclin A, B1 und B2) sind bei dem Übergang der G2/M- Phase von Bedeutung. In der G1-Phase des Zellzyklus bis zum Restriktionspunkt bildet Cyclin D1 einen Komplex mit CDK4 und CDK6 (cyclin-dependent proteinkinase). Durch die aktivierten CDK4 und 6 wird das Retinoblastoma-Protein (pRb), das die Transkriptionsfaktoren E2F und DRTF-1 bindet, schrittweise phosphoryliert. Nach dem Restriktionspunkt wird Cyclin E synthetisiert, welches die CDK2 aktiviert. Diese phosphoryliert jetzt das pRb-Protein an einer vierten Stelle, was zur Freisetzung der Transkriptionsfaktoren führt, die für die S-Phase benötigt werden.

Eine erhöhte Expression des Cyclin D1-Gens aufgrund verschiedener chromosomaler Translokationen wurde als erstes in B-Zell-Lymphomen und Nebenschilddrüsenadenomen beschrieben. Das Cyclin D1-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (11q13) lokalisiert und kodiert für ein 34kDa Cyclin (295 Aminosäuren). Synonyme des Cyclin D1 sind PRAD1 (Parathyroid Adenomatosis 1), Bcl-1, D11S287 oder CCND1 [1; 51].

Untersuchungen an Cyclin D1 negativen Mäusen zeigten, trotz zeitgerechter Entwicklung des Embryos, eine reduzierte Körpergröße der Mäuse und eine hypoplastische Retina mit verringerter Zellzahl. Zudem wurde die laktierende Brustdrüse ungeachtet der zirkulierenden ovariellen Hormone nicht ausgebildet. Diese Ergebnisse lassen eine Abhängigkeit der steroidabhängigen Entwicklung der Mamma von Cyclin D1 erkennen [60].

1.4.7 Hormonrezeptoren: Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptor (PR)

Die Hormonrezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die durch entsprechende Liganden aktiviert oder inhibiert werden. Der Aufbau dieser Rezeptoren besteht aus drei Abschnitten. Die Amino-terminale A/B-Domäne ist beteiligt an der Transaktivierung der Gene. Die C-Domäne besteht aus der sog. Zinkfingerstruktur und spielt eine Rolle bei der DNA-Bindung und Rezeptordimerisierung. Die Carboxy-terminale (E/F) Domäne bindet in Abhängigkeit von Coaktivatoren bzw. Corepressoren rezeptorspezifische Liganden und ist wichtig bei der nukleären Translokation, der Rezeptordimerisierung und der Modulation der Genexpression [6]. Zunächst wurde nur der ER alpha Rezeptor, der auf Chromosom 6q25.1 kodiert ist (66,2kDa Protein), isoliert. Erst 1998 wurde das komplette 530 Aminosäuren umfassende ER beta Protein beschrieben (kodiert auf Chromosom 14q22-24) [63]. ER alpha und ER beta weisen eine starke Homologie zueinander auf und unterscheiden sich vor allem durch verschiedene Transaktivierungsdomänen.

Der Progesteronrezeptor ist auf Chromosom 11q22-23 kodiert und es wurden bisher 3 Isoformen (PR-A; PR-B; PR-C) in Mammakarzinomen identifiziert [86].

2 Fragestellung

Der Fortschritt in Diagnostik und Therapie der Mammakarzinome und die Forderung nach Früherkennungsuntersuchungen stellt hohe Ansprüche an die pathomorphologische Diagnostik von prämaligen Läsionen der Brustdrüse.

In dieser Arbeit wurden benigne Mammaläsionen mit erhöhtem Karzinomrisiko v.a. Fibroadenome, Skleradenosen und duktale Hyperplasien mithilfe verschiedener monoklonaler Primärantikörper (CK5/6, CK8/18, CK14, p53, p63, Ki-67, bcl-2, EGFR, c-erbB2, Cyclin D1, ER, PR) angefärbt und anschließend wurde der prozentuale Anteil der positiv angefärbten Zellen der verschiedenen Läsionen ermittelt und mit den anderen untersuchten Läsionen verglichen.

Zudem wurden die Ergebnisse dieser Arbeit an Fibroadenomen, Skleradenosen und duktalem Hyperplasien mit Ergebnissen an invasiven Mammakarzinomen verglichen.

Ziele dieser Arbeit sind:

1. Ermittlung einer Definition von immunhistochemischen Expressionsmustern in den untersuchten benignen Mammatumoren mit erhöhtem Karzinomrisiko.
2. Ausarbeitung eines Vergleichs der ermittelten immunhistochemischen Expressionsmuster in benignen Mammatumoren mit Ergebnissen von invasiven Mammakarzinomen.
3. Darstellung von Übereinstimmungen von Regulationsmechanismen zwischen postulierten Vorstufen des invasiven Mammakarzinoms, wie dem Fibroadenom, der Skleradenose und der duktalem Hyperplasie und dem Mammakarzinom.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Grundlage dieser Untersuchung bildete bioptisches Material der Mamma aus der Zeit zwischen 1995 und 1997, welches vom Pathologischen Institut des Klinikums Osnabrück unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. H. Krech zur Verfügung gestellt wurde. Aus diesen insgesamt 313 in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnittpräparate zur Diagnosesicherung angefertigt. Zudem waren diese Schnittpräparate hilfreich beim Auffinden der benignen und prämaligen Läsionen in den Paraffin-eingebetteten Gewebeproben, die dann als Stanzbiopsie bei der Tissue-Microarray (TMA) Herstellung verwendet wurden. Die Klassifikation nach Elston und Ellis diente als Grundlage bei der Beurteilung histologischer Kriterien [29].

Läsion	Anzahl
Fibroadenom	167
Skleradenose (SA)	93
duktale Hyperplasie (DH)	33
duktale Hyperplasie/ Sklerosierende Adenose	10
phylloide Tumore	6
radiäre Narbe	3
ADH/ Fibroepitheliale Hyperplasie	1
Gesamtanzahl	313

Tabelle 3 Übersicht der untersuchten benignen und prämaligen Läsionen.

3.2 Tissue- Microarray-Technik

Erstmalig 1998 beschrieben Kononen et al. die Tissue- Microarray- Technik als ein Verfahren, das mithilfe eines Präzisionsgerätes eine exakte Einstellung und eine hohe Reproduzierbarkeit verschiedener Gewebeproben ermöglicht [42]. Aufgrund der Anordnung mehrerer verschiedener Gewebeproben auf einem Paraffinblock besteht durch die TMA- Technik eine neue kostengünstigere und weniger zeitaufwendige Methode zur Darstellung von Protein- und RNA- Expressionsmustern und ebenso zur Erkennung genetischer Alterationen. Dieses Verfahren schließt vor allem die Anwendung in der Immunhistochemie, der Fluoreszenz In Situ Hybridisation (FISH) und der RNA In Situ Hybridisation (RNA-ISH) mit ein.

Zuvor wurde mithilfe einer sog. multitumor („sausage“) Blocktechnik die Bearbeitung verschiedener Gewebeproben auf einem Objektträger versucht [9]. Von diesem Verfahren nahm man jedoch Abstand, da es schwierig erschien die verschiedenen Tumore und Gewebeproben voneinander zu unterscheiden und zudem war die Anzahl der zu untersuchenden Gewebeproben stark limitiert.

3.2.1 Herstellung von Tissue-Microarrays

Zu Beginn der TMA- Herstellung müssen die Paraffinblöcke der Gewebeproben, die untersucht werden sollen, und auch die entsprechenden Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte gesichtet werden. Mithilfe der HE- gefärbten Schnitte wird dann auf dem jeweiligen Paraffinblock die zu untersuchende Region aufgesucht und markiert. Anschließend werden die Paraffinblöcke in der Reihenfolge sortiert, in der sie auf den TMA´s aufgefunden werden sollen. Mithilfe z.B. einer Excel-Computerdatei können die entsprechenden TMA-Koordinaten der jeweiligen Gewebeprobe, den Patientendaten oder der Patienten-Identifikationsnummer zugeführt werden [19]. Im Gegensatz zur konventionellen Diagnostik histologischer Präparate, die vor allem in dem Zuschnitt und bei der Anfärbung aufgrund der großen Mengen

an Gewebeproben sehr zeitaufwendig sind, wird die meiste Zeit bei den TMA's in der Präparation des Rezipienten-Blockes aus Donor-Blöcken investiert [66]. Das meist verwendete Gerät für die TMA-Herstellung ist das TMA-Präzisionsgerät von Beecher Instruments, San Prairie, Wisconsin, USA, welches dem Prototyp aus den Anfängen der TMA-Herstellung sehr ähnlich ist. Mithilfe dieses Gerätes werden aus einer vorher definierten Region des Donor-Paraffinblockes zylinderförmige Stanzbiopsien entnommen und anschließend an einer vorbestimmten Stelle des x-y Koordinatensystems in den Rezipienten-Paraffinblock eingefügt. Der Durchmesser der Stanzbiopsien aus dem Donor-Block beträgt je nach Stanznadel 0,6 bis 2 mm.

3.2.2 Herstellung der TMA's aus den Mammaläsionen

Nach Auffinden einer benignen bzw. prämaligen Läsion in dem Hamatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten erfolgte die Entnahme einer Stanzbiopsie aus der entsprechenden Region des jeweiligen Donor-Paraffinblockes der Mammaläsionen mithilfe eines speziellen Tissue- Microarray (TMA) Präzisionsgerätes (Beecher Instruments, San Prairie, Wisconsin, USA). Stanzbiopsien mit einem Durchmesser von 0,6mm wurden auf einen Rezipienten-Paraffinblock im Abstand von 0,8mm übertragen. Diese TMA-Herstellung erfolgte nach einem Standardverfahren, welches u.a. von Kononen et al. [42] und Torhorst et al. [84] beschrieben wurde. Die Entnahme von jeweils zwei Biopsien aus einer Läsion diente einer verbesserten statistischen Auswertung. Somit entstanden aus den 313 Donor-Paraffinblöcken zwei TMA-Blöcke mit jeweils 294 bzw. 332 Stanzen.

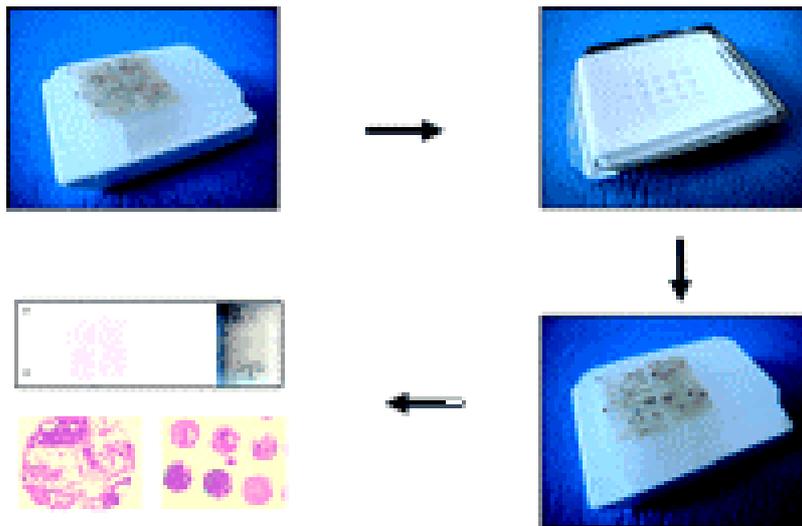


Abbildung 1 Darstellung eines aus den Gewebeproben gestanzten Paraffinblockes [66].

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Antigendemaskierung

Immunhistochemische Untersuchungen ermöglichen den Nachweis zellulärer Antigene in Gewebeschnitten mittels Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden am Mikrotom 2-3µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die anschließend auf „Superfrost plus“ beschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Zum Trocknen wurden diese Präparate über Nacht bei 56 °C in einem Brutschrank gelagert.

Aufgrund verschiedener Fixierungsmöglichkeiten des Gewebes können spezifische Antigene maskiert werden, d.h. die Bindung des spezifischen Primärantikörpers wird blockiert. Durch die Paraffineinbettung der Gewebeproben kann die Struktur der Proteine verändert werden und somit zu einer Verdeckung der gesuchten Antigenepitope führen.

Somit wurden am nächsten Tag die auf Raumtemperatur abgekühlten Schnitte für zweimal 10min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (je einmal 99%, 96%, 80% und 70%) bis zum destillierten Wasser rehydratisiert.

Zur Vorbehandlung der Schnitte gibt es nun drei verschiedene Möglichkeiten:

- 1) ohne Vorbehandlung.
- 2) Enzymandauung mit Proteinase K.
- 3) Hitzebehandlung.

Nur für die Schnitte, die der EGFR-Antigen Darstellung dienten, wurde die Andauung mithilfe der Proteinase K genutzt. Diese Schnitte wurden dafür etwa 10min in einer Plastikkuvette mit dem proteolytischen Enzym (Proteinase K, DAKO Cytomation ChemMate™) inkubiert und anschließend mit Waschpuffer abgespült.

Bei den anderen 11 Antikörpern (siehe Tabelle 4) stand die Hitzevorbehandlung im Vordergrund. Dazu wurden die Schnitte in eine Plastikkuvette, die 10mM Citratlösung enthielt, gestellt und mithilfe eines Dampfgarers (Steamer) für 35min auf etwa 100°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Schnitte mit kaltem Leitungswasser.

3.3.2 LSAB- Methode mit alkalischer Phosphatase

Die immunhistochemische Färbung der vorbehandelten Schnitte wurde nach der LSAB- (Labelled Strept Avidin Biotin) Methode mit alkalischer Phosphatase im DAKO-Autostainer durchgeführt. Die LSAB-Methode nutzt die starke Affinität von Streptavidin für Biotin. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, jedoch binden in der Regel weniger als vier Biotinmoleküle. Bei dieser Methode wird ein biotinylierter Zweitantikörper benötigt, der zunächst an den Primärantikörper ansetzt und an dessen Biotin dann auch enzymmarkiertes (hier: alkalische Phosphatase) Avidin binden kann. Die alkalische Phosphatase des Avidin-Biotin-Komplexes wandelt dann hinzugefügtes Chromogen in einen roten Farbstoff um. Das Chromogen weist nur eine kurze HWZ von etwa 45min auf und muss nach dem Ansetzen möglichst schnell verarbeitet werden, um eine gute Farbintensität zu erreichen.

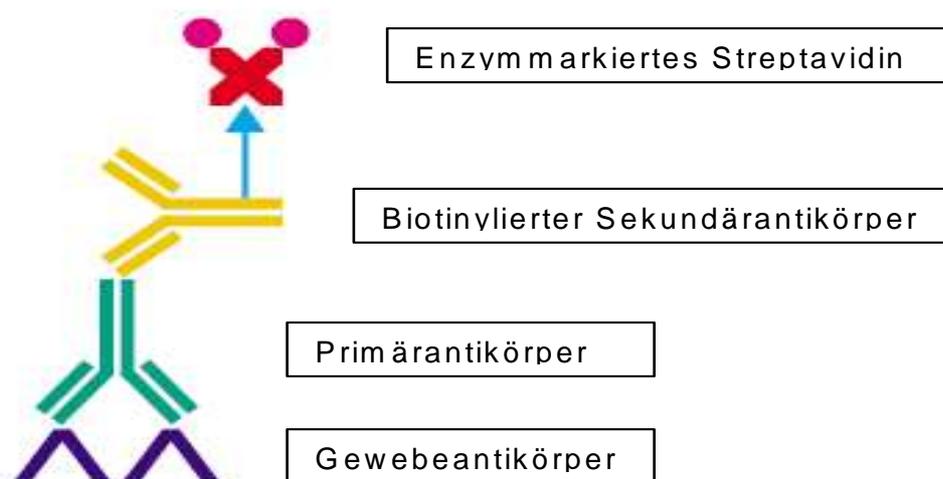


Abbildung 2 Schematische Darstellung der LSAB-Methode.

In dem DAKO-Autostainer wurden die Schnitte an vorgeschriebenen Positionen eingelegt und mit verdünntem Waschpuffer befeuchtet. Tabelle 4 zeigt die Vorbereitung der einzelnen monoklonalen Primärantikörper (CK5/6, CK8/18, CK14, p53, p63, Ki-67, bcl-2, EGFR, c-erbB2, Cyclin D1, ER, PR) auf.

Antikörper	Firma	Clone	Verdünnung	Antigen Retrieval	Nachweis
CK5/6	Zymed	D5/ 16B4	1:50	Steamer	LSAB
CK8/18	Dianova	5D3	1:40	Steamer	LSAB
CK14	Dianova	LL002	1:50	Steamer	LSAB
p53	DAKO	DO-7	1:2000	Steamer	LSAB
p63	DAKO	4A4	1:100	Steamer	LSAB
Ki-67	DAKO	Mib-1	1:100	Steamer	LSAB
bcl-2	DAKO	124	1:1000	Steamer	LSAB
EGFR	DAKO	H11	1:5	Proteinase K	LSAB
c-erbB2	DAKO		1:4000	Steamer	LSAB
Cyclin D1	DAKO	G124-326	1:800	Steamer	LSAB
ER	DAKO	1D5	1:200	Steamer	LSAB
PR	DAKO	636	1:1000	Steamer	LSAB

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Antikörper (LSAB= Labelled Streptavidin Biotin Methode mithilfe alkalischer Phosphatase im DAKO-Autostainer).

Anschließend wurde an den im Autostainer vorgesehenen Positionen etwa 200µl des jeweiligen Primärantikörpers (CK5/6, CK8/18, CK14, p53, p63, Ki-67, bcl-2, EGFR, c-erbB2, Cyclin D1, ER, PR) aufgetragen und 25min inkubiert. Nach gründlichem Abspülen des Primärantikörpers mit verdünntem Waschpuffer folgte die Inkubation mit dem Biotin-Antikörper (200µl pro Schnitt) für 25min. Nach erneutem gründlichem Abspülen mit verdünntem Waschpuffer erfolgte eine 25-minütige Inkubation mit Streptavidin (200µl pro Schnitt),

welches mit der alkalischen Phosphatase markiert war. Bevor die Enzymreaktion mit dem Chromogen für zweimal 25min ausgelöst wurde, musste nochmals mit Waschpuffer gespült werden. Nach dem Herausnehmen aus dem Autostainer wurden die Schnitte in mit Aqua dest. gefüllte Küvetten eingelegt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Meyer (etwa 3min) und dem anschließendem Bläuvorgang für 5min unter fließendem Leitungswasser. Nach dem Überführen in Aqua dest. und der aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils einmal 70%, 80%, 96%, 99%) wurden die Schnitte noch zweimal 8min in Xylol gegeben. Die Konservierung der Schnitte wurde mit Vitro Clud vorgenommen.

3.3.3 Rezepturen der verwendeten Lösungen

3.3.3.1 10mM Citratlösung

Für die Citratlösung wurde zunächst eine „Stammlösung A“ aus 10,5g Citronensäuremonohydrat in 500ml Aqua dest. aufgelöst, wodurch eine 0,1M Citronensäure entstand. Anschließend wurde 0,1M Natriumcitrat (die sog. Stammlösung B) aus 29,41g Natriumcitrat-Dihydrat, aufgefüllt mit 1000ml Aqua dest., hergestellt.

Durch Mischen von 18ml Stammlösung A mit 82ml Stammlösung B und Auffüllen mit Aqua dest. auf 1000ml entstand die Gebrauchslösung 10mM Citratpuffer, die auf einen pH von 6,0 eingestellt wurde.

3.3.3.2 Waschpuffer

Der Waschpuffer der Firma DCS enthält 500ml 20fach konzentrierte Tris-Pufferlösung mit 0,09%igen Natriumazid. Zum Ansetzen einer gebrauchsfertigen Lösung wurden 500ml des 20fach konzentrierten

Waschpuffers mit 10l deionisiertem Wasser verdünnt. Anschließend wurde ein pH von 7,2 +/-0,2 eingestellt.

3.3.3.3 Biotin-Antikörper

Der Biotin-Sekundärantikörper (linked, biotinylated Secondary Antibodies AB2) stammt von der Firma DAKO Cytomation ChemMate™.

3.3.3.4 Streptavidin- Lösung

Das Streptavidin war gebrauchsfertig mit alkalischer Phosphatase markiert (DAKO Cytomation ChemMate™).

3.3.3.5 Chromogen-Lösung

Für das Anfärben von 24 Schnitten wurde 16ml Chromogenlösung verwendet. Diese bestand aus 7,25ml AP (=Alkalische Phosphatase), Substrate Buffer (DAKO Cytomation ChemMate™), 2,8µl Chromogen Red 1 (DAKO Cytomation ChemMate™), 2,8µl Chromogen Red 2 (DAKO Cytomation ChemMate™) und 2,8µl Chromogen Red 3 (DAKO Cytomation ChemMate™). Zur Blockierung der endogenen Alkalischen Phosphatase des AP Substrate Buffer wurde noch ein Tropfen Levimasol (DAKO Cytomation ChemMate™) hinzugefügt.

3.4 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Beurteilung der Präparate wurde an einem Axiophot-Mikroskop der Firma Zeiss in 10- und 20-facher Vergrößerung vorgenommen.

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte semiquantitativ, wobei sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl positiver Zellen in die Begutachtung eingingen.

Aufgrund unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisationen verschiedener Antikörper wurde bei den Cytokeratinen (CK5/6, CK8/18, CK14) und bei dem bcl-2 Antikörper die zytoplasmatische Anfärbung beurteilt, wohingegen bei Cyclin D1, ER, PR, Ki-67, p53 und p63 die nukleäre Expression im Vordergrund stand. EGFR und c-erbB2 unterlagen der Beurteilung der membranösen Anfärbung.

Der Prozentsatz der jeweils positiven Zellen eines Antikörpers wurde für jede Stanzbiopsie einer Läsion auf den TMA's evaluiert. Im weiteren Evaluationsablauf wurden die ermittelten Prozentsätze positiver Zellen für jeden Antikörper in etwa gleich große Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 5). Stanzbiopsien der TMA's, die kein Brustdrüsenepithel aufwiesen, fielen aus der Beurteilung raus. Die Kategorisierung des c-erbB2-Antikörpers und des EGFR-Antikörpers erfolgte nur anhand der Intensität der membranösen Anfärbung (Tabelle 6). Mithilfe der Ermittlung eines spezifischen Scores, der sich aus dem Prozentsatz positiver Zellen und der Anfärbeintensität zusammensetzte, erfolgte die Auswertung der Antikörper p53 und p63, analog eines modifizierten Remmelen-Scores (LIT) (Tabelle 7).

Antikörper	Kategorisierung nach Prozentsatz positiver Zellen			
	1	2	3	4
CK 5/6	Negativ	0,5- 10,5%	11- 50,5%	51-100%
CK 8/18	Negativ	0,5- 30,5%	31- 70,5%	71-100%
CK 14	Negativ	0,5- 10,5%	11- 40,5%	41-100%
ER	Negativ	0,5- 10,5%	11- 50,5%	51- 100%
PR	Negativ	0,5- 10,5%	11- 50,5%	51-100%
bcl-2	Negativ	0,5- 50,5%	51- 90,5%	91- 100%
Cyclin D1	Negativ	0,5- 30,5%	31- 60,5%	61- 100%
Ki-67	Negativ	0,5- 10,5%	11- 100%	

Tabelle 5 Beschreibung der Kategorisierung verschiedener Antikörper.

	Kategorisierung nach Anfärbeintensität			
Antikörper	1	2	3	4
EGFR	negativ	schwach	Mittel	stark
c-erbB2	negativ	schwach	Mittel	stark

Tabelle 6 Beschreibung der Kategorisierung von EGFR und c-erbB2.

Kategorisierung von p53 und p63						
p53		0	1	2	3	4
	Prozentsatz Anfärbung	0- 9,5% negativ	10- 30% schwach	30,5- 60% mittel	60,5- 100% Stark	
	Score		0	1, 2	3, 4	6, 9
p63		0	1	2	3	4
	Prozentsatz Anfärbung	0- 10% negativ	10,5- 30% schwach	30,5- 50% mittel	50,5- 100% Stark	
	Score		0	1, 2	3, 4	6, 9

Tabelle 7 Beschreibung der Kategorisierung von p53 und p63.

4 Ergebnisse

4.1 Antikörper- Expression in der Gesamtheit der untersuchten Läsionen der Mamma

Insgesamt wurden 313 Läsionen mit 12 verschiedenen Antikörpern angefärbt (Gesamtheit der Stenzen: 12 x 313=3756). In einigen Stanzbiopsien (insgesamt 368 der 3756 Stenzen) konnte kein Drüsenepithel, dessen Antikörperexpression gewertet werden sollte, nachgewiesen werden. Diese Stanzbiopsien wurden aus der Auswertung genommen.

Eine genaue Auflistung der unten beschriebenen Ergebnisse für die Gesamtheit aller gewerteten Läsionen findet sich auch in den Tabellen 8 bis 14 und als Graphik in Abbildung 3.

4.1.1 Expression der Cytokeratine CK5/6, CK8/18 und CK14

Bei der CK5/6 Expression konnten aus den 313 Läsionen 269 Stanzbiopsien ausgewertet werden. Eine starke Positivität der Zellen des Drüsenepithels zwischen 51 bis 100% bestand bei 59 Fällen (21%), bei 84 Läsionen (33%) eine mittlere Positivität von 11- 50,5% und bei 90 Fällen (33%) eine schwache Positivität (0,5-10,5%); 36 Läsionen (13%) wiesen keine CK5/6- Positivität auf.

Der Median des prozentualen Anteils der CK5/6- positiven Zellen an der Gesamtzahl betrug 20%.

Die 285 Biopsien, die aus der CK8/18- Antikörperfärbung genutzt werden konnten, wiesen eine etwa gleichmäßige Verteilung zwischen 0 bis 100% auf. Etwa ein Drittel der Biopsien (35%, 102 Fälle) zeigten eine 70 bis 100%ige CK8/18 Expression, etwa 38% (112 Fälle) 31 bis 70,5%ige und etwa 25% (73 Fälle) 0 bis 30,5 %ige CK8/18 Positivität, wobei 9,5% (27 Fälle) keine CK8/18 Expression zeigten.

Der Median des prozentualen Anteils der CK8/18- positiven Zellen lag bei 60%.

Die Mehrzahl der CK14 angefärbten Zellen zeigte unter den 281 gewerteten Biopsien eher eine geringe Positivität der Drüsenepithelzellen auf den Antikörper (54% der Fälle zwischen 0 bis 10,5%). Außerdem konnten in 16% der Läsionen (46 Fälle) keine CK14- Antikörperfärbung nachgewiesen werden und in ausschließlich 4% (11 Fälle) bestand eine Positivität bei über 40% der Zellen einer Biopsie.

Somit wurde ein Medianwert des prozentualen Anteils der CK14- positiven Zellen an der Gesamtzahl von 7,5% erreicht.

CK5/6 insg.269

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	36	13,4
0,5-10,5	2	90	33,5
11-50,5	3	84	31,2
51-100	4	59	21,9
	n	47	

CK8/18 insg.285

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	27	29,5
0,5-30,5	2	46	16,1
31-70,5	3	110	38,6
71-100	4	102	35,8
	n	28	

CK14 insg.281

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	46	16,4
0,5-10,5	2	152	54,1
11-40,5	3	72	25,6
41-100	4	11	3,9
	n	32	

Tabelle 8 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentuale Anteile in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

4.1.2 Expression von p53 und p63

Die Tumorsuppressorgene p53 und p63 wiesen in etwa eine gleiche sowie auch eine gleichmäßige Verteilung der Antikörperexpression zwischen 0 und 100% in der Gesamtheit der untersuchten Läsionen auf, wobei jeweils 294 von 313 Biopsien gewertet werden konnten.

Eine Negativität des p53- Antikörpers bestand in etwa 14% (41 Fälle) und des p63- Antikörpers in etwa 29% (84 Fälle) der untersuchten Läsionen. Durch die Einteilung in einen Score (beschrieben in Teil 2 „Material und Methoden“), der sich aus der relativen Anzahl der mit Antikörper angefärbten Zellen und der Färbeintensität zusammensetzt, bestand bei dem p53- Antikörper (Score 1+2: 33%, Score 3+4: 17%, Score 6+9: 36%) wie auch bei dem p63- Antikörper (Score 1+2: 23%, Score 3+4: 25%, Score 6+9: 23%) eine regelmäßige Aufteilung der Läsionen in allen eingeteilten Score- Bereichen.

Der Medianwert des prozentualen Anteils der p53- positiven Zellen an der Gesamtzahl von 31% bewegte sich etwas höher als der Medianwert des p63- Antikörpers von 23%.

p53 insg.294

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	41	14
1;2	2	97	33
3;4	3	51	17,4
6;9	4	105	35,7
	n	19	

p63 insg.294

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	84	28,6
1;2	2	68	23,1
3;4	3	73	24,8
6;9	4	69	23,5
	n	19	

Tabelle 9 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentuale Anteile in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

4.1.3 Expression von Antikörpern aus der erbB-Familie (c-erbB2, EGFR)

Die Expression des c-erbB2- Antikörpers und des EGFR- Antikörpers wurde ausschließlich über ihre Anfärbeintensität in keine, schwach positive und stark positive Expression eingeteilt.

Bei der c-erbB2 Darstellung wurde in 23 Läsionen kein Drüsenepithel angeschnitten und somit konnten nur 290 Läsionen bewertet werden. Darunter waren 101 Läsionen (35%) für den c-erbB2- Antikörper negativ und 60% zeigten eine schwache c-erbB2 Positivität.

Bei den 294 gewerteten Läsionen des EGFR- Antikörpers präsentierte sich eine höhere Negativität von 65% (191 Fälle) und eine geringere schwache EGFR-Positivität von 33% (97 Fälle).

Nur ein geringer Prozentsatz von etwa 5% bei c-erbB2 und von 2% bei EGFR zeigte eine starke Positivität des entsprechenden Antikörpers.

c-erbB2				EGFR			
insg.290				Insg.294			
Anfärbestärke		Anzahl	Proz.A.(%)	Anfärbestärke		Anzahl	Proz.A.(%)
Kein Epithel	n	23		kein Epithel	n	19	
Negativ	1	101	34,8	negativ	1	191	65
schwach pos	2	175	60,3	schwach pos	2	97	33
Stark pos.	3	14	4,8	Stark pos.	3	6	2

Tabelle 10 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

4.1.4 Expression von bcl-2

Nachdem 33 Läsionen aus den insgesamt 313 untersuchten Präparaten aus der Auswertung genommen wurden, wies das Epithel in 22 Läsionen (8%) der bewerteten 280 Biopsien keine bcl-2 Expression auf. Der bcl-2 Antikörper stellte

sich in den Biopsien überwiegend mit einer starken Positivität von über 50%iger Antikörperexpression dar (76% der Fälle, davon 38% zwischen 91 bis 100%iger zelluläre bcl-2- Darstellung).

Somit bildet sich ein Median des prozentualen Anteils der bcl-2 positiven Zellen an der Gesamtzahl von 90%.

bcl-2 insg. 280

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	22	7,9
0,5-50,5	2	46	16,4
51-90,5	3	105	37,5
91-100	4	107	38,2
	n	23	

Tabelle 11 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

4.1.5 Expression von Mib-1

Der Mib-1- Antikörper wurde nur im geringen Maße von den Zellen der verschiedenen Läsionen expremiert. Etwa in der Hälfte der 268 ausgewerteten Läsionen (49%, 132 Fälle) wurde der Mib-1 Antikörper nicht von dem Drüsenepithel expremiert. Die andere Hälfte der gewerteten Läsionen zeigte im überwiegenden Maße (44%, 118 Fälle) nur eine sehr schwache Positivität von 0 bis 10,5% der Zellen einer Biopsie und nur eine sehr geringe Anzahl (7%, 18 Fälle) fiel in den weit gefassten Bereich von einer Expressionsintensität zwischen 11 bis 100%.

Der Medianwert des prozentualen Anteils der Mib-1 positiven Zellen an der Gesamtzahl erreichte somit nur 3%.

Mib-1 insg.268

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	132	49,3
0-10,5	2	118	44
11-100	3	18	6,7
	n	45	

Tabelle 12 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

4.1.6 Expression von Cyclin D1

Bei dem Cyclin D1-Antikörper konnten 34 der ursprünglich 313 Fälle nicht in die Wertung miteinbezogen werden, da kein Drüsenepithel angeschnitten war. Die übrigen 279 Läsionen zeigten zwischen 0 und 100% der Cyclin D1 exprimierenden Zellen der Biopsien eine recht ausgeglichene Verteilung. Keine Anfärbung auf den Cyclin D1- Antikörper wurde in 20% (57 Fälle) festgestellt. In 24% der Läsionen (67 Fälle) zeigten zwischen 0,5 bis 30,5% der Epithelzellen eine Cyclin-D1 Darstellung. Ein Expressionsmuster der Zellen zwischen 31 bis 60,5% wiesen 22% der untersuchten Läsionen auf (60 Fälle) und die restlichen 34% unterlagen einer stärkeren Positivität zwischen 61 bis 100%.

Somit errechnete sich ein Median des prozentualen Anteils der Cyclin D1 positiven Zellen an der Gesamtzahl von etwa 41%.

Cyclin D1 insg.279

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	57	20,4
0,5-30,5	2	67	24
31-60,5	3	60	21,5
61-100	4	95	34,1
	n	34	

Tabelle 13 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

4.1.7 Expression der Hormonrezeptoren ER und PR

Unter den 274 Fällen der Östrogenrezeptor- Expression und auch den 280 Läsionen der Progesteronrezeptor- Darstellung fanden sich in den untersuchten Läsionen eher wenige Zellen, die diese Antikörper exprimierten (zelluläre Anfärbung zwischen 0 bis 10,5%: beim ER 43% und beim PR 36%). Eine Expression der Hormonrezeptoren in über 50% der Zellen in einer Läsion fand sich beim ER in 9% (24 Fälle) und beim PR in 14% (39 Fälle) der gewerteten Biopsien. 23% der mit ER- Antikörper angefärbten Läsionen und bei 14% der mit PR-Antikörper angefärbten Läsionen waren für den jeweiligen Antikörper negativ. Die restlichen 26% beim ER- Antikörper und 36% beim PR- Antikörper wiesen eine schwache bis mittlere Positivität zwischen 11 bis 50,5% der exprimierenden Zellen auf.

Der Median des prozentualen Anteils der Antikörper positiven Zellen an der Gesamtzahl bewegte sich für den ER- Antikörper bei 5% und für den PR- Antikörper bei etwa 13%.

ER				PR			
insg.274				insg.278			
Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)	Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	62	22,6	0	1	38	13,7
0,5-10,5	2	117	42,7	0,5-10,5	2	100	36
11-50,5	3	71	25,9	11-50,5	3	101	36,3
51-100	4	24	8,8	51-100	4	39	14
	n	39			n	35	

Tabelle 14 Ergebnisliste der ER- und PR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

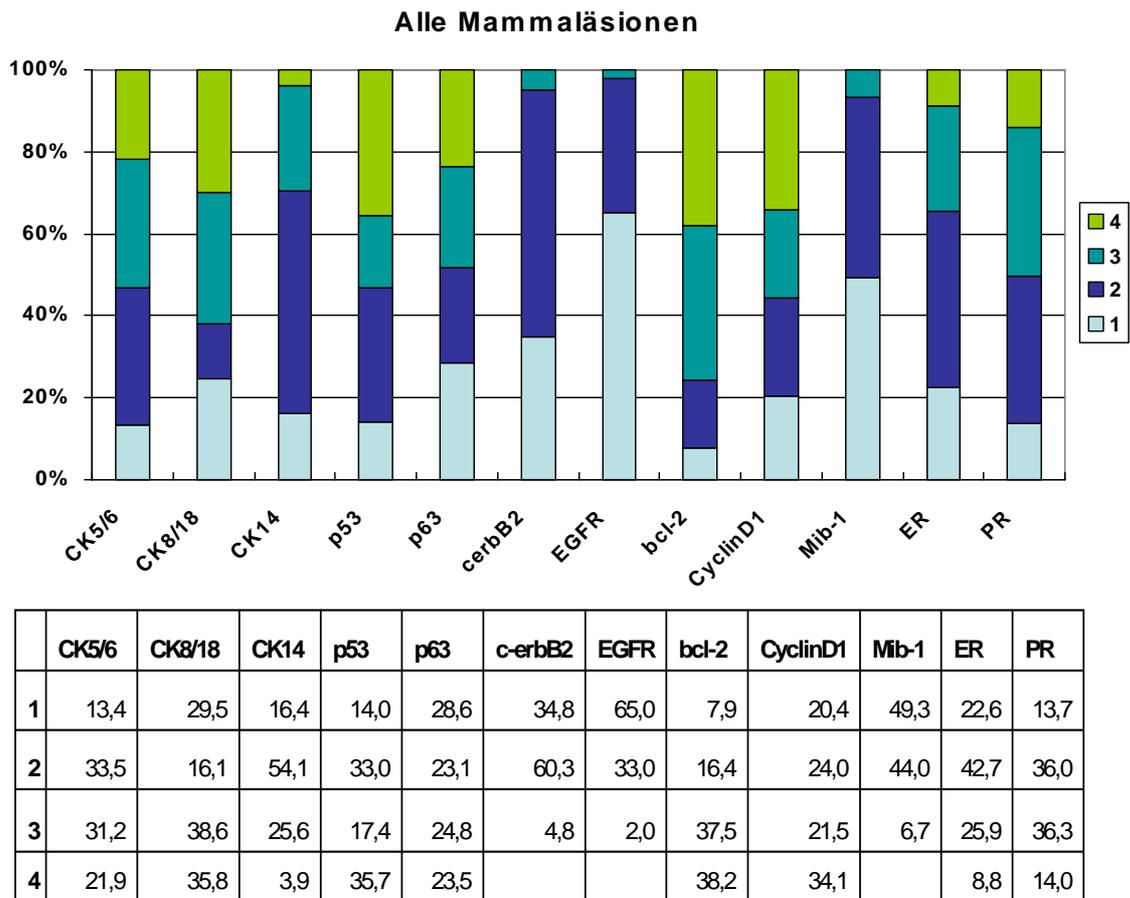


Abbildung 3 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.

4.2 Antikörper- Expression in den einzelnen Läsionen:

Fibroadenome, duktale Hyperplasien und Skleradenosen

Nachdem die 12 verschiedenen Antikörper in der Gesamtheit der 313 benignen und prämaligen Mammaläsionen (bestehend aus 167 Fibroadenomen (FA), 33 duktalem Hyperplasien (DH), 93 Skleradenosen (SA), 10 duktalem Hyperplasien/ Skleradenosen, 6 phylloide Tumore, 3 radiäre Narben und 1 atypische Hyperplasie/ FEH) untersucht worden sind, folgte noch eine statistische Auswertung der Antikörper- Expressionsmuster separat für die 167 FA, 33 DH und 93 SA.

In den Tabellen 15 bis 35 wurde der prozentuale Anteil der positiven Zellen in den jeweiligen Läsionen Fibroadenom, Skleradenose und duktalem Hyperplasie aufgelistet. Eine graphische Darstellung zu jeder Läsion folgt dann in den Abbildungen 4-6.

4.2.1 Expression der Cytokeratine CK5/6, CK8/18 und CK14

Bei den FA konnten 148 Läsionen von 167, bei den SA 79 von 93 und bei den DH 26 von 33 in die CK5/6- Auswertung einbezogen werden. Keine Expression des Antikörpers wurde in 17 FA (11%), 13 SA (16%) und 5 DH (19%) gefunden. Bei 36% der FA, 34% der SA und 15% der DH bestand eine CK5/6 Positivität von 0,5 bis 10,5% der untersuchten Zellen. Einen Anteil von 11-50,5% CK5/6-Positivität in den Gewebestücken konnten bei 29% der FA, 27% der SA und 38% der DH nachgewiesen werden. In 20% der FA, 23% der SA und 27% der DH waren 51 bis 100% der epithelialen Zellen für CK5/6 positiv.

Bei der Auswertung der CK8/18 Expression konnten 157 FA, 80 SA und 29 DH beurteilt werden. 9% der FA, 9% der SA und 10% der DH zeigten keine Antikörper- Darstellung. Ein 0,5 bis 30%iger Anteil CK8/18 positiver Epithelzellen wurde bei 16% der FA, 21% der SA und 14 % der DH gesehen. Eine Anfärbung von über 70% der Epithelzellen zeigten 38% der FA, 28% der SA und 34% der DH. Bei den übrigen Stücken konnten 31 bis 70,5% CK8/18

positive Zellen nachgewiesen werden (37% der FA, 43% der SA und 41% der DH).

Von den 153 gewerteten FA, 81 gewerteten SA und 23 gewerteten DH waren meistens weniger als 40 % der Zellen des angeschnittenen Epithels von dem CK14 Antikörper angefärbt (keine Expression: 13% der FA, 23% der SA, 26% der DH; 0,5 bis 10,5% Ck14 positive Zellen: 61% der FA, 40% der SA, 52% der DH; 11 bis 40,5 % Ck14 positive Zellen: 24% der FA, 28% der SA, 17% der DH). Nur bei 2% der FA, 9% der SA und 4% der DH wurde eine CK14 Expression von über 40% der angeschnittenen Epithelzellen festgestellt.

CK5/6 insg.148

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	17	11,1
0,5-10,5	2	55	36
11-50,5	3	45	29,4
51-100	4	31	20,3
	n	19	

CK8/18 insg.157

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	14	8,9
0,5-30,5	2	25	15,9
31-70,5	3	58	36,9
71-100	4	60	38,2
	n	10	

CK14 insg.153

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	20	13,1
0,5-10,5	2	93	60,8
11-40,5	3	37	24,2
41-100	4	3	2
	n	14	

Tabelle 15 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.

CK5/6 insg.26

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	5	19,2
0,5-10,5	2	4	15,4
11-50,5	3	10	38,5
51-100	4	7	26,9
	n	17	

CK8/18 insg.29

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	3	10,4
0,5-30,5	2	4	13,8
31-70,5	3	12	41,4
71-100	4	10	34,5
	n	14	

CK14 insg.23

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	6	26,1
0,5-10,5	2	12	52,2
11-40,5	3	4	17,4
41-100	4	1	4,4
	n	20	

Tabelle 16 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.

CK5/6 insg.79

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	13	16,5
0,5-10,5	2	27	34,2
11-50,5	3	21	26,6
51-100	4	18	22,8
	n	14	

CK8/18 insg.80

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	7	8,8
0,5-30,5	2	17	21,3
31-70,5	3	34	42,5
71-100	4	22	27,5
	n	13	

CK14 insg.81

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	19	23,5
0,5-10,5	2	32	39,5
11-40,5	3	23	28,4
41-100	4	7	8,6
	n	12	

Tabelle 17 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.

4.2.2 Expression von p53 und p63

Wie oben bereits bei der Ergebnispräsentation der Gesamtheit der Gewebeproben beschrieben, besteht auch bei der Einzelauswertung von FA, SA und DH eine etwa gleichmäßige Verteilung von 0 bis 100% bei der p53- und p63- Expression. Es konnte eine p53- Positivität bei 151 FA, 77 SA und 17 DH ausgewertet werden.

Die Einteilung der Expression in den gestanzten Gewebeproben erfolgte mithilfe eines Scores und ergab folgende Ergebnisse für die p53- Antikörperexpression: bei den FA: Score 1+2 36%, Score 3+4 17%, Score 6+9 35%, keine Positivität 12%; bei den SA: Score 1+2 33%, Score 3+4 20%, Score 6+9 31%, keine Positivität 23%; bei den DH: Score 1+2 33%, Score 3+4 10%, Score 6+9 43%, keine Positivität 13%.

Die p63- Antikörperexpression weist eine ähnlich gleichmäßige Konstellation auf und zeigt bei den FA Score 1+2 25%, Score 3+4 26%, Score 6+9 17%, keine Positivität bei 19%; bei den SA Score 1+2 19%, Score 3+4 22%, Score 6+9 33%, keine Positivität bei 26%; bei den DH Score 1+2 27%, Score 3+4 27%, Score 6+9 27%, keine Positivität bei 20%.

p53 insg.159

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	19	12
1;2	2	57	35,9
3;4	3	27	17
6;9	4	56	35,2
	n	8	

p63 insg.159

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	50	19
1;2	2	40	25,2
3;4	3	42	26,4
6;9	4	27	17
	n	8	

Tabelle 18 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.**p53** insg.30

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	4	13,3
1;2	2	10	33,3
3;4	3	3	10
6;9	4	13	43,3
	n	13	

p63 insg.30

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	6	20
1;2	2	8	26,7
3;4	3	8	26,7
6;9	4	8	26,7
	n	13	

Tabelle 19 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktalem Hyperplasien.**p53** insg.85

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	14	16,5
1;2	2	28	32,9
3;4	3	17	20
6;9	4	26	30,6
	n	8	

p63 insg.85

Score		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	22	25,9
1;2	2	16	18,8
3;4	3	19	22,4
6;9	4	28	32,9
	n	8	

Tabelle 20 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.

4.2.3 Expression von Antikörpern aus der erbB- Familie (c-erbB2, EGFR)

Auf den Mikroarrayblöcken, die zum Nachweis der c-erbB2 Expression dienen, konnte bei 8 der 159 FA- Stenzen, bei 10 der 83 SA- Stenzen und bei 13 der 30 DH- Stenzen kein Epithel nachgewiesen werden. Eine schwache Positivität der epithelialen Zellen zeigte sich mit einer etwa gleichmäßigen Verteilung unter den drei Tumorentitäten bei 60% der FA, 63% der SA und 67% der DH. Eine starke Positivität für c-erbB2 trat nur selten in den Biopsien auf (4% der FA, 4% der SA, 7% der DH). Die übrigen Biopsien wiesen keine c-erbB2 Expression auf (36% der FA, 34% der SA, 27% der DH).

Zur Auswertung der epithelialen Expression des EGFR konnten 151 FA, 77 SA und 17 DH herangezogen werden.

In etwa zwei Drittel der untersuchten Biopsien wurde keine EGFR Expression nachgewiesen (67% der FA, 67% der SA, 57% der DH). Stark EGFR positiv angefärbte Zellen traten nur bei wenigen Biopsien auf (1% der FA, 4% der SA, 3% der DH). Die übrigen 32% der FA, 29% der SA und 40% der DH zeigten eine schwache Positivität für den EGF Rezeptor.

c-erbB2 insg.159				EGFR insg.159			
Anfärbestärke		Anzahl	Proz. A. (%)	Anfärbestärke		Anzahl	Proz. A. (%)
kein Epithel	n	8		kein Epithel	n	8	
negativ	1	57	35,9	negativ	1	106	66,7
schwach pos	2	95	59,8	schwach pos	2	51	32,1
stark pos.	3	7	4,4	stark pos.	3	2	1,3

Tabelle 21 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.

c-erbB2 insg. 30				EGFR insg.30			
Anfärbestärke		Anzahl	Proz. A. (%)	Anfärbestärke		Anzahl	Proz. A. (%)
kein Epithel	n	13		kein Epithel	n	13	
negativ	1	8	26,7	negativ	1	17	56,7
schwach pos	2	20	66,7	schwach pos	2	12	40
stark pos.	3	2	6,7	stark pos.	3	1	3,3

Tabelle 22 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.

c-erbB2 insg. 83				EGFR insg.85			
Anfärbestärke		Anzahl	Proz. A. (%)	Anfärbestärke		Anzahl	Proz. A. (%)
kein Epithel	n	10		kein Epithel	n	8	
negativ	1	28	33,7	negativ	1	57	67,1
schwach pos	2	52	62,7	schwach pos	2	25	29,4
stark pos.	3	3	3,6	stark pos.	3	3	3,5

Tabelle 23 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.

4.2.4 Expression von bcl-2

In hohen Anteilen positiv war der bcl-2 Antikörper unter den 154 gewerteten FA, 83 gewerteten SA und 28 gewerteten DH. Eine Positivität von 91 bis 100% der epithelialen Zellen in den Biopsien konnte in 38% der FA, 38% der SA und 43% der DH nachgewiesen werden. 31% der FA, 46% der SA und 13% der DH erreichten einen Anteil positiver Zellen von 51 bis 90,5%. Eine bcl-2 Expression von weniger als 50% war eher selten (keine Expression: 8% der FA, 9% der SA, 4% der DH; 0,5 bis 50% positiver Anteil: 23% der FA, 7% der SA, 7% der DH).

bcl-2 insg. 154

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	12	7,8
0,5-50,5	2	35	22,7
51-90,5	3	49	31,8
91-100	4	58	37,7
	n	13	

Tabelle 24 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.

bcl-2 insg. 28

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	1	3,6
0,5-50,5	2	2	7,1
51-90,5	3	13	46,4
91-100	4	12	42,9
	n	15	

Tabelle 25 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktalem Hyperplasien.

bcl-2 insg. 81

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	7	8,6
0,5-50,5	2	6	7,4
51-90,5	3	37	45,7
91-100	4	31	38,3
	n	12	

Tabelle 26 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.

4.2.5 Expression von Mib-1

Nachdem 16 der 167 FA, 17 der 93 SA und 17 der 33 DH aufgrund fehlenden Anschnitt von Epithel aus der Auswertung genommen worden sind, wiesen in den einzelnen Biopsien entweder nur wenige Zellen eine Mib-1 Expression auf (0,5 bis 10,5% positiver Anteil: 48% der FA, 37% der SA, 42% der DH) oder der Antikörper wurde gar nicht expremiert (42% der FA, 61% der SA, 58% der DH). Gewebeproben bei denen 11 bis 100% der Epithelzellen diesen Proliferationsmarker darstellten, kamen nur bei 11% der FA, 36% der SA und 11% der DH vor.

Mib-1 insg.151

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	63	41,7
0-10,5	2	72	47,7
11-100	3	16	10,6
	n	16	

Tabelle 27 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.

Mib-1 insg.26

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	15	57,7
0-10,5	2	11	42,3
11-100	3	0	10,6
	n	17	

Tabelle 28 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.

Mib-1 insg.76

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	46	60,5
0-10,5	2	28	36,8
11-100	3	2	2,6
	n	17	

Tabelle 29 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.

4.2.6 Expression von Cyclin D1

Da kein Drüsenepithel angeschnitten war, konnten nur 157 der 167 FA, 78 der 93 SA und 28 der 33 DH ausgewertet werden. Es fand sich eine relativ gleichmäßige Verteilung von keiner Cyclin D1 Expression der epithelialen Zellen bis zur Anfärbung aller Zellen. Kein Cyclin D1 wurde in 23% der FA, 22% der SA und 11% der DH gesehen. Bei 21% der FA, 30% der SA und 29% der DH expremierten 0,5 bis 30,5% der Zellen diesen Antikörper. Eine Darstellung des Cyclin D1 mit einem Anteil von 31 bis 60% zeigten 22% der FA, 22% der SA und 21% der DH und von 61 bis 100% Positivität der Zellen ergab sich bei 35% der FA, 27% der SA und 39% der DH.

Cyclin D1 insg.157

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	35	22,3
0,5-30,5	2	33	21
31-60,5	3	34	21,7
61-100	4	55	35
	n	10	

Tabelle 30 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.

Cyclin D1 insg.28

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	3	10,7
0,5-30,5	2	8	28,6
31-60,5	3	6	21,4
61-100	4	11	39,3
	n	15	

Tabelle 31 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktalem Hyperplasien.

Cyclin D1 insg.78

Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	17	21,8
0,5-30,5	2	23	29,5
31-60,5	3	17	21,8
61-100	4	21	26,9
	n	15	

Tabelle 32 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.

4.2.7 Expression der Hormonrezeptoren ER und PR

Die Expression des Östrogenrezeptors verhält sich ähnlich wie die des Progesteronrezeptors. Weit über die Hälfte der untersuchten Biopsien von FA, SA und DH weisen eine Darstellung des ER in unter 50% der epithelialen Zellen auf (keine Expression: 25% der FA, 13% der SA, 31% der DH; Positivität von 0,5 bis 10,5% der Zellen: 43% der FA, 46% der SA, 38% der DH; Positivität von 11 bis 50,5% der Zellen: 27% der FA, 25% der SA, 24% der DH). Ähnlich erscheint es beim PR (keine Expression: 10% der FA, 19% der SA, 16% der DH; Positivität von 0,5 bis 10,5% der Zellen: 38% der FA, 39% der SA, 21% der

DH; Positivität von 11 bis 50,5% der Zellen: 40% der FA, 33% der SA, 40% der DH). Nur bei 12% der FA, 10% der SA und 21% der DH erscheinen über die Hälfte der epithelialen Zellen positiv.

ER				PR			
insg.149				insg.150			
Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)	Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	37	24,8	0	1	15	10
0,5-10,5	2	64	43	0,5-10,5	2	57	38
11-50,5	3	40	26,9	11-50,5	3	60	40
51-100	4	8	5,4	51-100	4	18	12
	n	18			n	17	

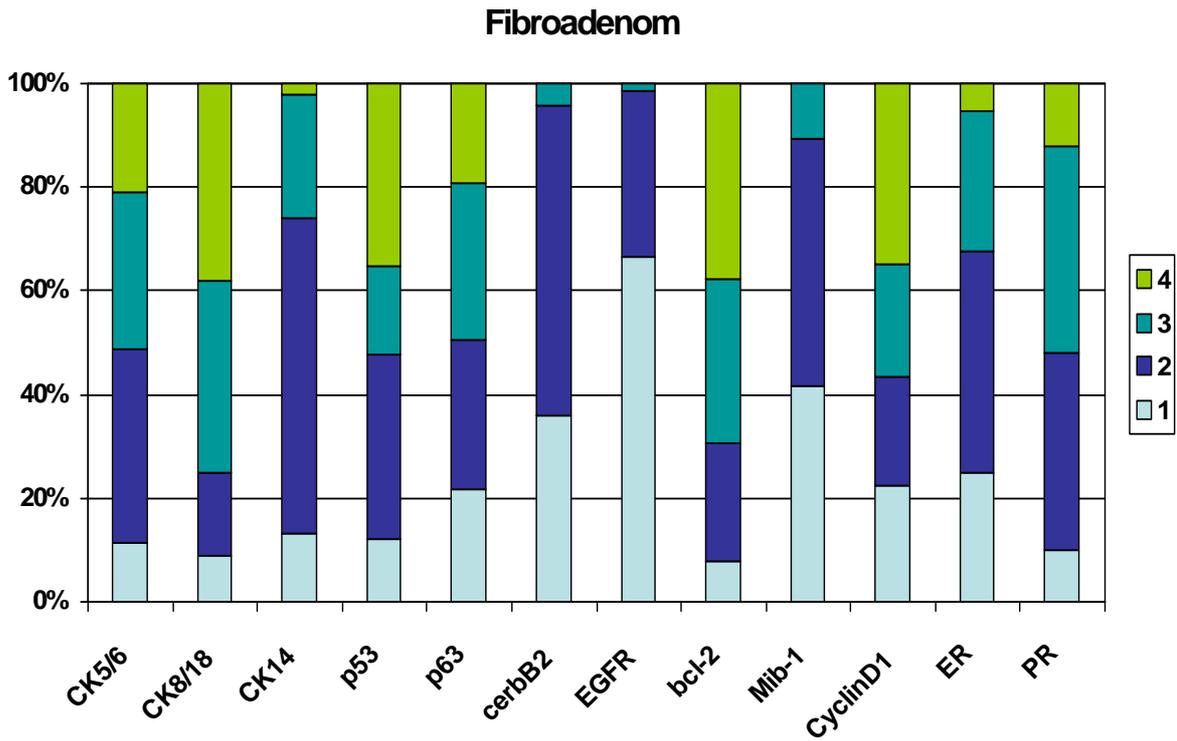
Tabelle 33 Ergebnisliste der Östrogen- und Progesteronrezeptor- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.

ER				PR			
insg.29				insg.28			
Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)	Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	9	31	0	1	5	17,9
0,5-10,5	2	11	37,9	0,5-10,5	2	6	21,4
11-50,5	3	7	24,1	11-50,5	3	11	39,3
51-100	4	2	6,9	51-100	4	6	21,4
	n	14			n	15	

Tabelle 34 Ergebnisliste der Östrogen- und Progesteronrezeptor- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.

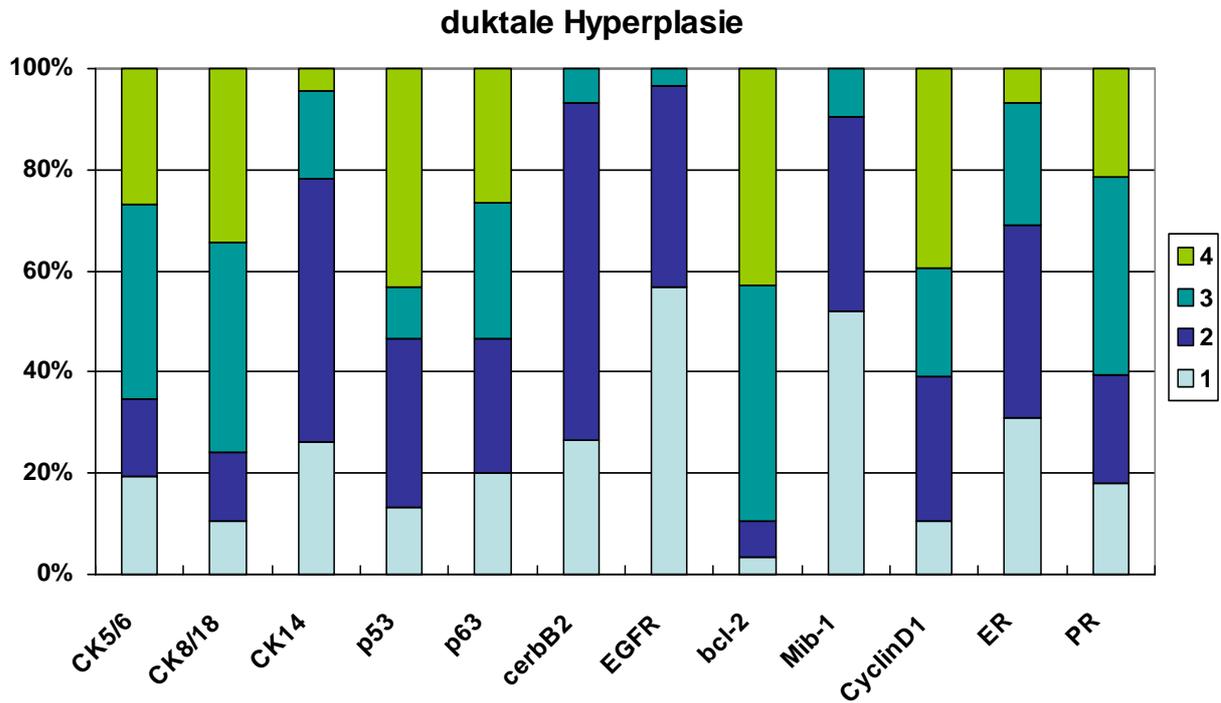
ER				PR			
insg.79				insg.82			
Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)	Prozente		Anzahl	Proz. A. (%)
0	1	11	12,9	0	1	15	18,3
0,5-10,5	2	39	45,9	0,5-10,5	2	32	39
11-50,5	3	21	24,7	11-50,5	3	27	32,9
51-100	4	8	9,4	51-100	4	8	9,8
	n	14			n	11	

Tabelle 35 Ergebnisliste der Östrogen- und Progesteronrezeptor- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.



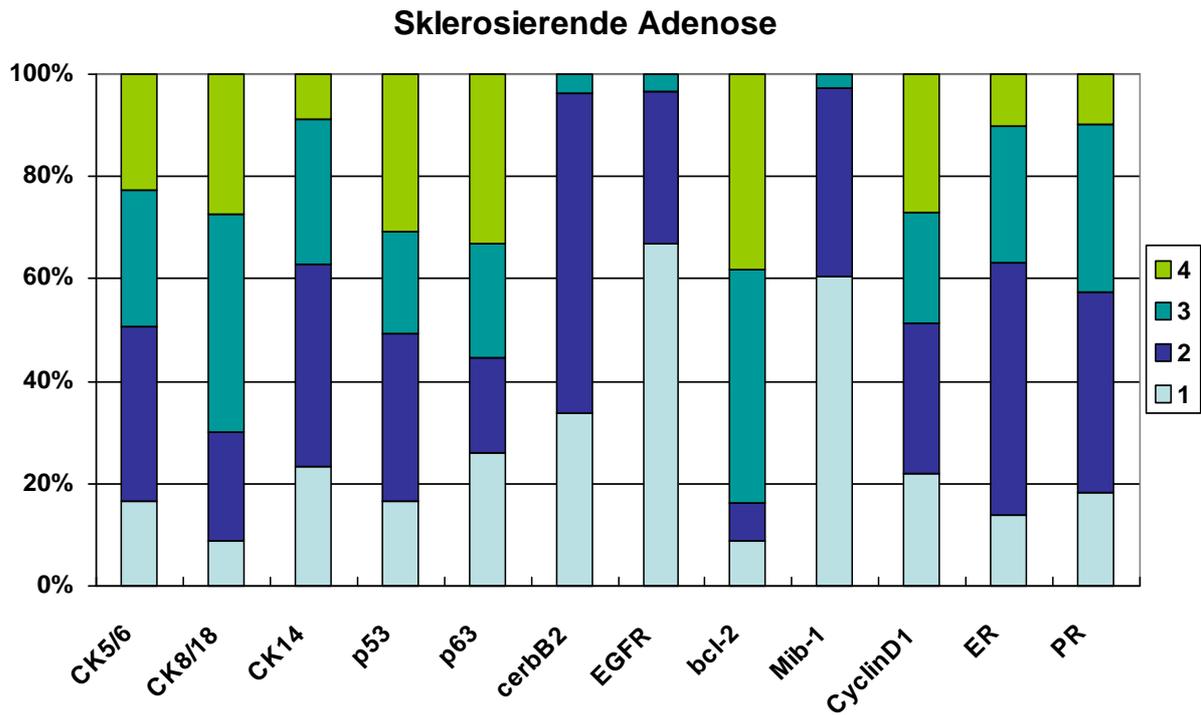
	CK5/6	CK8/18	CK14	p53	p63	c-erbB2	EGFR	bcl-2	Mib-1	CyclinD1	ER	PR
1	11,1	8,9	13,1	12,0	19,0	35,9	66,7	7,8	41,7	22,3	24,8	10,0
2	36,0	15,9	60,8	35,9	25,2	59,8	32,1	22,7	47,7	21,0	43,0	38,0
3	29,4	36,9	24,2	17,0	26,4	4,4	1,3	31,8	10,6	21,7	26,9	40,0
4	20,3	38,2	2,0	35,2	17,0			37,7		35,0	5,4	12,0

Abbildung 4 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in den untersuchten Fibroadenomen.



	CK5/6	CK8/18	CK14	p53	p63	c-erbB2	EGFR	bcl-2	Mib-1	CyclinD1	ER	PR
1	19,2	10,4	26,1	13,3	20,0	26,7	56,7	3,6	57,7	10,7	31,0	17,9
2	15,4	13,8	52,2	33,3	26,7	66,7	40,0	7,1	42,3	28,6	37,9	21,4
3	38,5	41,4	17,4	10,0	26,7	6,7	3,3	46,4	10,6	21,4	24,1	39,3
4	26,9	34,5	4,4	43,3	26,7			42,9		39,3	6,9	21,4

Abbildung 5 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in den untersuchten duktalem Hyperplasien.



	CK5/6	CK8/18	CK14	p53	p63	c-erbB2	EGFR	bcl-2	Mib-1	CyclinD1	ER	PR
1	16,5	8,8	23,5	16,5	25,9	33,7	67,1	8,6	60,5	21,8	12,9	18,3
2	34,2	21,3	39,5	32,9	18,8	62,7	29,4	7,4	36,8	29,5	45,9	39,0
3	26,6	42,5	28,4	20,0	22,4	3,6	3,5	45,7	2,6	21,8	24,7	32,9
4	22,8	27,5	8,6	30,6	32,9			38,3		26,9	9,4	9,8

Abbildung 6 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in den untersuchten Skleradenosen.

4.3 Auflistung der Antikörper- Expression in den einzelnen Läsionen in Form von Medianwerten

Um eine bessere Übersicht über die Ergebnisse zu erlangen und um diese besser beurteilen zu können, wurden für jeden verwendeten immunhistochemischen Marker (CK5/6, CK8/18, CK14, p53, p63, Mib-1, bcl-2, EGFR, c-erbB2, Cyclin D1, ER, PR) in den einzelnen und in der Gesamtheit der Läsionen die Medianwerte bestimmt.

Die Tabelle 36 stellt die Medianwerte der 12 Antikörper aus der Gesamtheit der untersuchten Läsionen und spezifisch aus den Fibroadenomen, den duktalem Hyperplasien und den Skleradenosen gegenüber, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit der vier ausgewerteten Fälle erreicht werden soll.

	Alle Läsionen	Fibroadenome	Duktale Hyperplasie	Skleradenose
CK5/6	20	20	20	20
CK8/18	60	60	60	60
CK14	7,5	7,5	5	7,5
p53	31,25	30	40	30
p63	22,5	22,5	25	22,5
c-erbB2	2	2	2	2
EGFR	1	1	1	1
bcl-2	90	90	90	90
Mib-1	3	3	3	3
CyclinD1	41,25	42,5	50	45
ER	5	5	5	5
PR	12,5	11,25	15	11,25

Tabelle 36 Medianwerte aus den Prozentangaben positiver Zellen der ausgewerteten Läsionen.

Der Median des prozentualen Anteils der CK5/6 positiven Zellen an der Gesamtzahl aller 313 Läsionen lag bei 20% und auch bei den Einzelauswertungen der Fibroadenome, duktalem Hyperplasien und Skleradenosen bildete sich ein Median der CK5/6 Expression von 20%. Somit zeigte der prozentuale Anteil der CK5/6 positiver Zellen der einzelnen Läsionen ein identisches CK5/6 Expressionsmuster wie die Gesamtheit der Läsionen.

Ein identischer Median des prozentualen Anteils Antikörper positiver Zellen in den vier Auswertungsmöglichkeiten (Gesamtheit aller Läsionen, nur die Fibroadenome, nur die Skleradenosen oder nur die duktalem Hyperplasien) konnte auch für die Antikörper CK8/18 (Median: 60%), c-erbB2 (Median: 2%), EGFR (Median: 1%), bcl-2 (Median: 90%), Mib-1 (Median: 3%) und dem ER (Median: 5%) errechnet werden. Der Antikörper CK14 zeigte in den vier ausgewerteten Möglichkeiten ähnlich wie die Antikörper p53, p63, Cyclin D1 und PR nur geringfügige Abweichungen der Medianwerte des prozentualen Anteils positiver Zellen untereinander in den entsprechenden Biopsien.

5 Diskussion

Es wird vermutet, dass das Mammakarzinom auf dem Boden verschiedener prämaligener Läsionen, wie z.B. Fibroadenomen, Skleradenosen, atypischen duktaalen Hyperplasien entsteht, oder diese Läsionen zumindest ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Mammakarzinoms anzeigen. Das Risiko für die spätere Entwicklung eines Mammakarzinoms auf dem Boden benigner, proliferativer Läsionen wird generell als leicht erhöht betrachtet. So besteht bei Frauen mit der Diagnose eines Fibroadenoms oder einer Skleradenose ein etwa 3-fach erhöhtes Risiko später an einem Mammakarzinom zu erkranken. Bei Vorliegen einer ADH ist ein 4 bis 5-fach, bei dem LCIS ein 7 bis 9-fach erhöhtes Risiko bekannt. Im Gegensatz zu diesen Läsionen ist das DCIS als eine obligate Präkanzerose mit je nach Differenzierungsgrad unterschiedlich hohem lokalem Krebsrisiko anzusehen [27; 28; 40; 70; 71; 72; 75].

Bis heute sind trotz einer sehr exakten histomorphologischen Typisierung und Klassifizierung der verschiedenen benignen, proliferativen Läsionen der Mamma und deren Abgrenzung zu den prämaligen Brustkrankungen die zugrundeliegenden Zellregulationsmechanismen nur in Ansätzen geklärt. Sowohl die Risikoabschätzung zur Entstehung eines Mammakarzinoms aus einer entsprechenden Läsion, als auch die Diagnosesicherung ist für die Frau als auch für die therapeutischen Maßnahmen von größter Wichtigkeit und fordert immer wieder neue Untersuchungsverfahren, die der Routinediagnostik eine einfache und sichere Differenzierung zwischen benignen und prämaligen Veränderungen erlaubt. In der letzten Zeit gab es verschiedenste Untersuchungen, bei denen Erklärungen für die Entwicklung eines Mammakarzinoms gesucht wurden. Es wurden Erkenntnisse über verschiedene Entwicklungswege des Mammakarzinoms und über die Expression verschiedener immunhistochemischer Marker wie Cytokeratine, Tumorsuppressorgene (p53, p63), Hormonrezeptoren (ER, PR) usw. erfasst. Aufgrund der Möglichkeit einer immunhistochemischen Anfärbung der verschiedenen Marker in entsprechenden Präparaten besteht eine Chance

Expressionsmuster in gesunden Geweben, benignen bzw. prämaligen Läsionen und invasiven Karzinomen lichtmikroskopisch sichtbar zu machen.

Auf der Grundlage verschiedenster Studien über immunhistochemische Marker und Genexpressionsmuster in verschiedenen Läsionen der Mamma wurde diese Arbeit angefertigt [55; 56; 75; 87].

Das Wissen um die Zusammenhänge der Cytokeratinexpression und anderer Zellproliferations- als auch Zelldifferenzierungsmarker in Risikoläsionen ist derzeit unklar. Grundhypothese unserer Studie war somit, dass verschiedene benigne bzw. prä maligne Brusttumore ähnliche Expressionsmuster wie das normale Brustdrüsenepithel aufweisen, sowie möglicherweise auch direkte Vorstufen des invasiven Mammakarzinoms bilden.

Dazu nahmen wir die Tissue- Microarray- Technik zur Hilfe. Anhand dieser Technik besteht durch die Darstellung von Expressionsmustern verschiedener immunhistochemischer Marker die Möglichkeit ein vollständigeres Bild von einer Läsion zu gewinnen. Bei der Einführung dieser Technik bestanden zunächst noch Zweifel über die Validität dieser Technik. Verschiedenste Studien haben jedoch gezeigt, dass trotz des 0,6 mm durchmessenden Gewebepreparates die Proteinexpression noch repräsentativ zum Ursprungsgewebe ist. Zudem wurde weiterhin eine hohe Konkordanz zur herkömmlichen Gewebeanalyse dargestellt [42; 84].

Durch die Tissue- Microarray- Technik kann, wie auch diese Arbeit zeigt, eine große Anzahl von verschiedenen Gewebeproben mit derselben immunhistochemischen Methode untersucht werden. Dies bedeutet, dass diese Methode einerseits im Gegensatz zur konventionellen Diagnostik histologischer Präparate, wie auch Packeisen et al. beschreiben, weniger zeitaufwendig ist, da die meiste Zeit bei den TMA´s in der Präparation des Rezipienten-Blockes aus Donor-Blöcken benötigt wird und nicht wie bei der bisherigen Methode bei dem Zuschnitt und der Anfärbung [66]. Andererseits können die Ergebnisse der Gewebeproben aus den Donorblöcken auf einem Rezipientenblock direkt miteinander verglichen werden, da es keine Unterscheidung bei der Färbemethode gibt.

Zudem erlaubt diese Technik eine umfangreiche Analyse über die Pathogenese verschiedener Tumore. Durch komplexe Methoden wie die Tissue- Microarray-Technik wird eine Bearbeitung verschiedener Gewebe und deren Anfärbung mit immunhistochemischen Antikörpern zur Darstellung der Proteinexpressionsmuster wie auch zur Darstellung der RNA-Expressionsmuster ermöglicht [42; 43; 73].

Aufgrund der limitierten Anzahl von drei Mammaläsionen vom Typ der radiären Narbe und sechs vom Typ der phylloiden Tumore war eine signifikante Auswertung nicht möglich und somit wurden diese in der Ergebnisaufstellung nicht mehr mit aufgeführt. Des Weiteren wurden Gewebeproben (10 duktale Hyperplasien/ Skleradenosen, 1 atypische Hyperplasie/ fibroepitheliale Hyperplasie), die nicht einer eindeutigen Entität zugeordnet werden konnten, nicht weiter beurteilt, da es sonst zu Verfälschung der Ergebnisse kommen könnte.

Somit erhoben wir unsere Daten anhand von 167 Fibroadenomen, 93 Skleradenosen und 33 duktalem Hyperplasien, die mit monoklonalen Primärantikörpern (CK5/6, CK8/18, CK14, p53, p63, Ki-67, bcl-2, EGFR, c-erbB2, Cyclin D1, ER, PR) angefärbt wurden.

Ziel dieser Arbeit ist zum Einen die Ermittlung einer Definition von immunhistochemischen Expressionsmustern in den untersuchten benignen Mammatumoren mit erhöhtem Karzinomrisiko und zum Anderen die Ausarbeitung eines Vergleichs der ermittelten immunhistochemischen Expressionsmuster in benignen Mammatumoren mit Ergebnissen von invasiven Mammakarzinomen.

In den letzten Jahren gewann die Cytokeratin- Bestimmung in Mammaläsionen immer mehr an Bedeutung. Es wurden verschiedenste Untersuchungen durchgeführt, wobei u.a. erkannt worden ist, dass Cytokeratine im gesunden Brustdrüsengewebe sowohl in den luminalen Zellen der Gänge und Azini als auch in den myoepithelialen Zellen exprimiert werden. Die luminalen Zellen weisen allerdings v.a. die zylinderepithelialen Cytokeratine (CK7, CK8, CK18, CK19) auf [55; 56; 75; 87]. Des Weiteren konnten im gesunden Brustdrüsenepithel zwei morphologisch unterschiedliche Zellstrukturen

beschrieben werden: die luminal gelegenen glandulären Zellen und die basal gelegenen myoepithelialen Zellen. Anhand weiterer Studien können diese zwei Zellstrukturen durch ihre Lokalisation und durch eine CK8/18 Positivität den glandulären Zellen und durch eine smooth muscle actin (SMA) Positivität den Myoepithelien zugeordnet werden [55]. In verschiedenen immunhistochemischen, in vitro und Genexpressions- Studien konnte zudem ein dritter CK5/14 positiver Zelltyp identifiziert werden, der sowohl im basalen wie auch im luminalen Epithel lokalisiert ist [11; 73].

In unserer Studie konnte zwischen den untersuchten Fibroadenomen, duktalem Hyperplasien und Skleradenosen kein signifikanter Unterschied in der Expression von CK5/6, CK8/18 und CK14 (Medianwerte: CK5/6=20, CK8/18=60, CK14=5 bis 7,5) festgestellt werden. Boecker et al. beschreiben in einer Studie den CK5 positiven Zelltyp, der zunächst als myoepitheliale Zelle identifiziert wurde, als sogenannte Vorläuferzelle bzw. Stammzelle [12].

Boecker zeigt auf, dass sich aus diesen Vorläuferzellen zunächst CK5/14+ und CK8/18/19+ intermediäre luminalen Zellen entwickeln können, die sich schließlich zum größten Teil zu CK5- und CK8/18/19+ und nur wenige zu CK5+ und CK8/18/19+ Mammakarzinomzellen differenzieren können. Außerdem beschreibt er CK5/14+ und SMA+ intermediäre myoepitheliale Zellen, die sich dann zu dem SMA+ Myoepithel entwickeln. Während CK5 in der Entwicklung der Mammakarzinomzellen runterreguliert wird, steigt im Gegenzug CK8/18 in den glandulären Zellen und SMA in den myoepithelialen Zellen an. Demnach würde eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Expression von CK5 und CK8/18/19 im Verlauf der Entwicklung von Mammakarzinomen bestehen [15; 16]. Diese Erkenntnis gab Anhaltspunkte dafür, dass anhand verschiedener Cytokeratinmuster in den Vorstufen eines Mammakarzinoms (v.a. CK5/6+) und im Mammakarzinom selbst (v.a. CK8/18+) eine Unterscheidung der Läsionen möglich ist. Somit könnte dieses sogenannte Stammzellmodell ein Hinweis auf unterschiedliche Regulationsmechanismen in der Zelle bei der Proliferation und Differenzierung sein [11; 15; 16; 17; 43].

In einer Studie zeigten Boecker et al. eine CK5- Positivität in duktalem Hyperplasien (UDH), die sich dann über ein intermediäres Zellstadium in

glanduläre Zellen differenzieren, ähnlich der Entwicklung in der gesunden Brustdrüse [16]. Zudem wurde jedoch bei der ADH und in über 95% der untersuchten DCIS eine CK8/18/19 Positivität und eine CK5 Negativität angetroffen, was eine glanduläre Differenzierung vermuten ließ. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien eine UDH (CK5+) als direkter Vorläufer einer ADH oder DCIS (CK5-, CK8/18/19+) eher unwahrscheinlich zu sein.

Diese Studien zeigen, dass die Expression der Cytokeratine bei der Entwicklung verschiedenster Zellen eine große Rolle spielen und dass durch das Auftreten dieser Intermediärfilamente Typ 1 und 2 ein entsprechender Weg der Zelle bis unter anderem zur Entwicklung von malignem Gewebe vorgezeigt wird.

In unserer Arbeit werden keine signifikanten Unterschiede bei der Expression von CK5/6, CK8/18 und CK14 in den verschiedenen untersuchten Läsionen der Fibroadenome, duktalem Hyperplasien und Skleradenosen gefunden. Die Begründung könnte darin liegen, dass es sich zum Einen bei dem bearbeiteten Gewebe nicht um direkte Vorläuferläsionen des Mammakarzinoms handelt. Zum Anderen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es doch Vorläufer von malignen Zellen sind. Dieses würde jedoch bedeuten, dass der Übergang vom benignen zu malignem Gewebe sehr unterschiedlich sein kann und dass der Entwicklungsweg der Zellen nicht immer nach dem gleichen Muster abläuft. Dieses würde somit auch eine nicht spezifische Verteilung der Cytokeratine bei der immunhistochemischen Anfärbung erklären. Auch Boecker et al. konnten keinen direkten Zusammenhang in der Entwicklung von der UDH zum ADH bzw. DCIS herstellen [16].

Auch Otterbach et al. beschreiben in einer Studie keine absoluten Ergebnisse zur Unterscheidung der duktalem Hyperplasien und ADH bzw. DCIS anhand alleiniger immunhistochemischer Methode mittels CK5/6 [65]. Der CK5/6-Antikörper kann in der Diagnostik nur als Ergänzung zum H&E gefärbten Präparat zur Differentialdiagnose duktalem Hyperplasien (starke CK5/6 Immunreaktion) und ADH bzw. DCIS (keine bis sehr geringe CK5/6 Immunreaktion) herangezogen werden. Ein identisches Reaktionsmuster des CK5/6-Antikörpers bei der ADH und DCIS ermöglichte keine

differentialdiagnostische Unterscheidung dieser beiden Läsionen und eine negative Immunreaktion in benignen proliferativen Läsionen ist auch nicht spezifisch für eine neoplastische Zelle.

In dieser Arbeit wurde jedoch nicht nur das Expressionsmuster der Cytokeratine CK5/6, CK8/18 und CK14 erarbeitet, sondern auch noch weitere immunhistochemische Marker wie die Tumorsuppressorgene (p53, p63), c-erbB2 und EGFR, bcl-2, Mib-1, Cyclin D1 und die Hormonrezeptoren (ER und PR) untersucht.

In der Gesamtschau zeigen jedoch die untersuchten Läsionen Fibroadenome, Skleradenosen und duktale Hyperplasien alle ein sehr ähnliches Expressionsmuster, so dass keine signifikanten immunhistochemischen Unterschiede in der Gesamtheit der drei untersuchten Tumore gefunden werden konnten. Diese Ergebnisse können Hinweis darauf sein, dass sich die epitheliale Struktur dieser drei untersuchten Mammatumore untereinander, aber auch im Vergleich zu Expressionsstudien an normalem Brustdrüsengewebe, nicht signifikant unterscheidet.

Ein guter Überblick über die Ergebnisse unserer Studie wird mithilfe der Errechnung der Medianwerte für jeden immunhistochemischen Marker in allen drei untersuchten Läsionen und in der Gesamtheit der Läsionen erreicht. Die Marker der erbB- Genfamilie (c-erbB2 und EGFR) zeigten anhand der Intensität der Anfärbung in den Zellen in allen Läsionen eine schwache Positivität. Zwischen den Antikörpern bcl-2 und Mib-1, die nach dem Prozentsatz positiver Zellen kategorisiert worden sind, besteht eher eine umgekehrte Proportionalität in den Geweben. (Medianwerte: bcl-2=90%, Mib-1=3%). Die Hormonrezeptoren (Östrogen- und Progesteronrezeptoren) werden in den untersuchten Läsionen eher weniger exprimiert (Medianwerte ER=5%, PR=11,25 bis 15%).

Kleine Abweichungen wurden bei der Expression des p53-Proteins, des p63-Proteins, des Cyclin D1 und des CK14 zwischen der dukталen Hyperplasie und den anderen beiden benignen proliferativen Läsionen (Fibroadenom und Skleradenose) gefunden.

Zur Diskussion steht, dass es sich hierbei um eine unterschiedliche Stammzellpopulation in der dukталen Hyperplasie gegenüber den anderen

Läsionen handelt, wie es auch bereits im Stammzellmodell von Boecker et al. beschrieben wird [17].

Es konnte jedoch keine signifikante Unterscheidung zwischen unseren untersuchten Läsionen gefunden werden, wie diese in früheren Studien bei In situ Karzinomen und invasiven Mammatumoren mithilfe des Cytokeratin-Expressionsusters aufgezeigt werden konnte [15; 16].

Es gibt somit in dieser Studie kein Hinweis darauf, dass Fibroadenome, Skleradenosen und duktale Hyperplasien sich als Vorstufen von invasiven Mammakarzinomen in der weiblichen Brust manifestieren.

Mithilfe immunhistochemischer Marker wurden bereits von Korsching et al. verschiedene Expressionsmuster in Mammakarzinomen dargestellt [43]. Hierbei wurde angenommen, dass CK5/6+ Mammakarzinome aus anderen Vorläuferzellen entstehen, als CK8/18+ Karzinomzellen. Mit Zunahme der CK8/18+ Zellen in den untersuchten Läsionen wurde eine deutliche Abnahme verschiedener immunhistochemischer Marker (Ki-67, EGFR, p53) beobachtet, wohingegen bei CK5/6 negativen bzw. reduzierten Expressionsmuster ein Anstieg von c-erbB2, ER, PR, bcl-2 auffällig war. Dies führte zur Vermutung, dass die Entstehung des Mammakarzinoms aus der glandulären Zellreihe (CK8/18+) mit einer besseren Prognose einhergehen könnte als die Entstehung aus den so genannten Stammzellen(CK5/6+).

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Expression verschiedener immunhistochemischer Marker in bestimmten Läsionen besteht in der Bildung bestimmter Gruppen, den sogenannten Clustern. Korsching et al. führten dieses bereits an invasiven Mammakarzinomen durch [43]. In der entsprechenden Studie konnten Korsching et al. bei der Analyse der invasiven Mammakarzinome zwischen drei Clustern unterscheiden, die sich aus CK5/6, CK8/18 und c-erbB2 Clustern bilden. Zudem wurde erkannt, dass CK5/6 positive Mammakarzinome im allgemeinen negativ für Östrogen- und Progesteronrezeptoren waren, aber eine hohe Proliferationsrate (Ki-67, Cyclin A) und eine vermehrte Expression von p53 und EGFR zeigten, was für eine aggressive Tumorentität spricht. Die CK5/6 negativen Tumore präsentierten eine deutlich geringere Proliferationsrate und eine vermehrte Expression von

bcl-2 und c-erbB2, sowie weniger genetische Alterationen. Diese Erkenntnisse weisen auf verschiedene Subgruppen in Mammakarzinomen hin, die unterschiedliche Proteinexpressionsmuster und genetische Alterationen aufweisen und somit eine Unterscheidung ermöglichen.

Auch in dieser Arbeit führten wir eine Clusteranalyse durch. Die Ergebnisse wurden jedoch nicht näher aufgeführt. In der Clusteranalyse unserer Studie konnten innerhalb der untersuchten benignen Tumore mit erhöhten Brustkrebsrisiko (Fibroadenome, duktale Hyperplasien, Skleradenosen) auch verschiedene Cluster herausanalysiert werden. Beim Vergleich der Clusterbäume der Fibroadenome, Skleradenosen und duktaalen Hyperplasien untereinander werden Übereinstimmungen gefunden. Gegenüber der Analyse an invasiven Mammakarzinomen von Korsching et al. stellte sich bei den prämaligen ein anderes Expressionsmuster der verschiedenen immunhistochemischen Marker dar. Zudem fanden wir bei den untersuchten Mammatumoren keine eindeutige Korrelation zwischen den Tumorsuppressorgenen, Hormonrezeptoren, Proliferationsmarkern usw. und der Expression bestimmter Cytokeratine.

Zusammenfassend müssen aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse verschiedene Erklärungsansätze für die Cytokeratinexpression in neoplastischen Zellen der weiblichen Brustdrüse angeführt werden.

Zum Einen wird angenommen, dass sich die neoplastischen Zellen der atypischen duktaalen Hyperplasien, der In-Situ Karzinome und der invasiven Karzinome aus bestimmten Vorläuferzellen entwickeln, die Ck5/6 nicht exprimieren. Da die Cytokeratine als relativ konservative Proteine angesehen werden, würde diese Hypothese auch die weitestgehend bestehende Kontinuität der Cytokeratinexpression von Epithelien in Bezug ihrer Leitkeratine auch bei maligner Zelltransformation stützen [53; 54; 55].

Des Weiteren gibt es anhand der Ergebnisse unserer Studie durch die Ermittlung von immunhistochemischen Expressionsmustern keine Hinweise darauf, dass es sich bei den untersuchten Tumoren um Vorstufen eines invasiven Mammakarzinoms handelt.

Dies führt zu nachstehenden Schlussfolgerungen aus dieser Studie.

Generell besteht eine Übereinstimmung zwischen konservierten Regulationsmechanismen zwischen normalen Brustdrüsenepithel, postulierten Vorstufen des invasiven Mammakarzinoms oder Läsionen mit erhöhtem lokalisiertem oder generalisiertem Brustkrebsrisiko, wie dem Fibroadenom, der Skleradenose und der duktalem Hyperplasie sowie dem sog. „basalen“ Mammakarzinom. Aufgrund des Expressionsprofils von CK5 und CK14 erscheint eine direkte Vorläuferrolle jedoch unwahrscheinlich.

Weitere zellbiologische Studien sind dringend notwendig um hierüber letztendlich Aufschluss geben zu können und um die komplexen Mechanismen in der Pathogenese des invasiven Mammakarzinoms entschlüsseln zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Ali IU, Merlo G, Callahan R, Lidereau R. The amplification unit on chromosome 11q13 in aggressive primary human breast tumors entails the bcl-1, int-2 and hst loci. *Oncogene* 1989 Jan;4(1):89-92.
2. Andersen JA, Vendelboe ML. Erkrankungsrate Cytoplasmic mucous globules in lobular carcinoma in situ. Diagnosis and prognosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 1981 Apr;5(3):251-255.
3. Bankfalvi A, Ludwig A, De Hesselte B, Buerger H, Buchwalow IB, Boecker W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod. Pathol.* 2004 Sep;17(9):1051-1061.
4. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001 Aug;25(8):1054-1060.
5. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986 Jan 16;319(6050):226-230.
6. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol. Pharmacol.* 1998 Jul;54(1):105-112.
7. Bässler R. Mamma- Anatomie und Embryologie. In Remmele W., ed. *Pathologie 4. 2. Auflage ed.* Springer Verl.; 2000. 136-144.

8. Bässler R. Spezielle Pathologie des Mammakarzinoms. In Remmele W., ed. Pathologie 4. 2. Auflage ed. Springer Verl.; 2000. 277-299.
9. Battifora H. The multi-tumour (sausage) tissue block. Novel method for immunohistochemical antibody testing. Lab Invest 1986;55:244-48.
10. Bertz J, Hentschel S, Hundsdörfer G, Kaatsch P, Katalinic A, Lehnert M, Schön D, Stegmaier C, Ziegler H (2008) Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert- Koch- Institut. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 2003-2004. Report No.: 6. überarbeitete Ausgabe.
11. Bocker W, Bier B, Freytag G, et al. An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins, alpha-smooth muscle actin, vimentin, collagen IV and laminin. Part II: Epitheliosis and ductal carcinoma in situ. Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol. 1992;421(4):323-330.
12. Bocker W, Bier B, Ludwig A, de Hessel B, Gerdes J. Benign proliferative lesions and in situ carcinoma of the breast: new immunohistological findings and their biological implications. Eur. J. Cancer Prev. 1993 Nov;2 Suppl 3:41-49.
13. Boecker W., Decker T., Ruhnke M., Schneider W. Duktale Hyperplasie und Duktales Carcinoma in situ. Pathologe. Springer- Verlag; 1997. 3-18.
14. Boecker W., Kunze K.D. Mamma. In Boecker W., Denk H., Heitz P.U., eds. Pathologie. 1. Ausgabe ed. München, Wien, Baltimore; Urban & Schwarzenberg; 1997. 849-869.
15. Boecker W, Moll R, Poremba C, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: A new cell biological concept. Lab. Invest. 2002;82(6):737-746.

16. Boecker W, Moll R, Dervan P, et al. Usual ductal hyperplasia of the breast is a committed stem (progenitor) cell lesion distinct from atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2002;in press.
17. Boecker W, Moll R, van Diest PJ, et al. A common progenitor (adult stem) cell gives rise to both the glandular and myoepithelial cell lineages. A new cell biological concept as the basis of breast pathology. *Laboratory Investigation* 2002 Jan;82(1):29A.
18. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990 Dec;17(6):489-503.
19. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J. Pathol.* 2001 Sep;195(1):72-79.
20. Caput D. [P73: a kin to the p52 tumor suppressor gene]. *Bull. Cancer* 1997 Nov;84(11):1081-1082.
21. Celli J, Duijf P, Hamel BC, et al. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 1999 Oct 15;99(2):143-153.
22. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002 May;40(5):403-439.
23. Culotta E, Koshland DE, Jr. p53 sweeps through cancer research. *Science* 1993 Dec 24;262(5142):1958-1961.
24. Dalquen P, Baschiera B, Chaffard R, et al. MIB-1 (Ki-67) immunostaining of breast cancer cells in cytologic smears. *Acta Cytol.* 1997 Mar;41(2):229-237.

25. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin. Cancer Res.* 2002 Feb;8(2):494-501.
26. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992 Mar 19;356(6366):215-221.
27. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N. Engl. J. Med.* 1985 Jan 17;312(3):146-151.
28. Dupont WD, Page DL, Parl FF, et al. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N. Engl. J. Med.* 1994 Jul 7;331(1):10-15.
29. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology* 2002 Sep;41(3A):151.
30. Ellis IO, Elston CW. Classification of benign breast disease. In Ellis IO, Elston CW, eds. *The Breast*. 3 ed. Nottingham: Churchill Livingstone; 1998. 47-186.
31. Gebhardt F, Burger H, Brandt B. Modulation of EGFR gene transcription by a polymorphic repetitive sequence--a link between genetics and epigenetics. *Int. J. Biol. Markers* 2000 Jan;15(1):105-110.
32. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J. Pathol.* 1992 Sep;168(1):85-86.
33. Gusterson BA, Machin LG, Gullick WJ, et al. c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. *Br. J. Cancer* 1988 Oct;58(4):453-457.

34. Haagensen CD, Lane N, Lattes R, Bodian C. Lobular neoplasia (so-called lobular carcinoma in situ) of the breast. *Cancer* 1978 Aug;42(2):737-769.
35. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990 Nov 22;348(6299):334-336.
36. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1991 Aug 15;88(16):6961-6965.
37. Holland R, Peterse JL, Millis RR, et al. Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Semin. Diagn. Pathol* 1994 Aug;11(3):167-180.
38. Howard BA, Gusterson BA. Human breast development. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 2000 Apr;5(2):119-137.
39. Jacobs TW, Byrne C, Colditz G, Connolly JL, Schnitt SJ. Radial scars in benign breast-biopsy specimens and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 1999 Feb 11;340(6):430-436.
40. Jensen RA, Page DL, Dupont WD, Rogers LW. Invasive breast cancer risk in women with sclerosing adenosis. *Cancer* 1989 Nov 15;64(10):1977-1983.
41. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995 Jul;104(1):42-49.
42. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 1998 Jul;4(7):844-847.

43. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest* 2002 Nov;82(11):1525-1533.
44. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997 Feb 7;88(3):323-331.
45. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991 Jun 6;351(6326):453-456.
46. Levine AJ, Perry ME, Chang A, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer* 1994 Mar;69(3):409-416.
47. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979 May;17(1):43-52.
48. Lishman SC, Lakhani SR. Atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ: surgical and molecular pathology. *Histopathology* 1999 Sep;35(3):195-200.
49. Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. The basic pathology of human breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2000 Apr;5(2):139-163.
50. McDivitt RW, Urban JA, Farrow JH. Cystosarcoma phyllodes. *Johns. Hopkins. Med. J.* 1967 Jan;120(1):33-45.
51. McIntosh GG, Anderson JJ, Milton I, et al. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene* 1995 Sep 7;11(5):885-891.

52. Micheli A, Mugno E, Krogh V, et al. Cancer prevalence in European registry areas. *Ann. Oncol.* 2002 Jun;13(6):840-865.
53. Moll R. [Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors]. *Veroff. Pathol.* 1993;142:1-197.
54. Moll R. Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren. *Veroff. Pathol* 1993;143:1-197.
55. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11-24.
56. Moll R, Krepler R, Franke WW. Complex Cytokeratin Polypeptide Patterns Observed in Certain Human Carcinomas. *Differentiation* 1983;23(3):256-269.
57. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin-20 in Human Carcinomas - A New Histodiagnostic Marker Detected by Monoclonal-Antibodies. *American Journal of Pathology* 1992 Feb;140(2):427-447.
58. Mommers ECM. Preinvasive ductal breast lesions cell biological, quantitative, and clinical aspects. S.l: s.n.; 2001.
59. Morrow M., Schnitt SJ, Harris J.R. Ductal Carcinoma in Situ and Microinvasive Carcinoma. In Harris J.R., ed. *Diseases of the Breast*. 2nd ed. ed. Philadelphia: Lippencott Williams& Wilkins; 2000. 383-401.
60. Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991 Apr 11;350(6318):512-515.
61. Nielsen BB, Ladefoged C. Fibroadenoma of the female breast with multinucleated giant cells. *Pathol. Res. Pract.* 1985 Dec;180(6):721-726.

62. Nielsen M, Christensen L, Andersen J. Radial scars in women with breast cancer. *Cancer* 1987 Mar 1;59(5):1019-1025.
63. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 1998 Aug 1;26(15):3505-3512.
64. Osada M, Ohba M, Kawahara C, et al. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat. Med.* 1998 Jul;4(7):839-843.
65. Otterbach F, Bankfalvi A, Bergner S, Decker T, Krech R, Boecker W. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. *Histopathology* 2000 Sep;37(3):232-240.
66. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol. Pathol.* 2003 Aug;56(4):198-204.
67. Page DL. Cancer risk assessment in benign breast biopsies. *Hum. Pathol.* 1986 Sep;17(9):871-874.
68. Page DL, AT, Rogers LW. Epithelial Hyperplasia. In Page DL, Anderson TJ, eds. *Diagnostic Histopathology of the breast*. UK: Churchill Livingstone ed. Edinburgh, 1987. 120-156.
69. Page DL, Dupont WD, Rogers LW. Ductal involvement by cells of atypical lobular hyperplasia in the breast: a long-term follow-up study of cancer risk. *Hum. Pathol.* 1988 Feb;19(2):201-207.

70. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS. Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 1985 Jun 1;55(11):2698-2708.
71. Page DL, Kidd TE, Jr., Dupont WD, Simpson JF, Rogers LW. Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Hum. Pathol* 1991 Dec;22(12):1232-1239.
72. Page DL, Schuyler PA, Dupont WD, Jensen RA, Plummer WD, Jr., Simpson JF. Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet* 2003 Jan 11;361(9352):125-129.
73. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 Aug 17;406(6797):747-752.
74. Ribeiro-Silva A, Zamzelli Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. Is p63 reliable in detecting microinvasion in ductal carcinoma in situ of the breast? *Pathol. Oncol. Res.* 2003;9(1):20-23.
75. Rosen PP, Kosloff C, Lieberman PH, Adair F, Braun DW, Jr. Lobular carcinoma in situ of the breast. Detailed analysis of 99 patients with average follow-up of 24 years. *Am. J. Surg. Pathol.* 1978 Sep;2(3):225-251.
76. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist.* 1998;3(4):237-252.
77. Schmale H, Bamberger C. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 1997 Sep;15(11):1363-1367.

78. Schnitt StJ, Connolly JL. Pathology of Benigne Breast Disorders. In Harris J.R., ed. Diseases of the Breast. 2nd ed. Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins; 2000. 75-93.
79. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T. A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1985 Oct;82(19):6497-6501.
80. Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. Cell 1995 Aug 25;82(4):621-630.
81. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. Lancet 1995 May 6;345(8958):1154-1157.
82. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987 Jan 9;235(4785):177-182.
83. Stein H, Gerdes J, Kirchner H, et al. Immunohistological analysis of Hodgkin's and Sternberg-reed cells: detection of a new antigen and evidence for selective IgG uptake in the absence of B cell, T cell and histiocytic markers. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1981;101(1):125-134.
84. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. Am. J. Pathol. 2001 Dec;159(6):2249-2256.

85. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984 Nov 30;226(4678):1097-1099.
86. Wei LL, Miner R. Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res.* 1994 Jan 15;54(2):340-343.
87. Wetzels RH, Kuijpers HJ, Lane EB, et al. Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer. *Am. J. Pathol* 1991 Mar;138(3):751-763.
88. Willett W.C. RBHSEHDJCGA. Epidemiology and Assessing and Managing Risk. In Harris J.R. LMEMMKOC, ed. *Diseases of the breast*. 2. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2003. 175-220.
89. Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 1998 Sep;2(3):305-316.
90. Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999 Apr 22;398(6729):714-718.
91. Zeeb H, Razum O, Blettner M, Stegmaier C. Transition in cancer patterns among Turks residing in Germany. *Eur. J. Cancer* 2002 Mar;38(5):705-711

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig zur Seite gestanden haben.

Ich danke Prof. Dr. med. W. Böcker (Direktor des Gerhard- Domagk- Institutes für Pathologie der WWU Münster) für die Möglichkeit, diese Arbeit am Gerhard- Domagk- Institut für Pathologie durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Horst Bürger für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und die sehr gute Betreuung bei der Ausführung der Arbeit, sowie seine Hilfsbereitschaft bei den Korrekturen.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Gerhard- Domagk- Institutes, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich waren.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums und bei der Entstehung dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich vor allem meinem Ehemann Andreas Wüller, der mich immer moralisch unterstützt hat und stets an mich geglaubt hat.

8 Lebenslauf

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung eines aus den Gewebeproben gestanzten Paraffinblockes [66].	25
Abbildung 2 Schematische Darstellung der LSAB-Methode.	27
Abbildung 3 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	40
Abbildung 4 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in den untersuchten Fibroadenomen.	54
Abbildung 5 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in den untersuchten duktalem Hyperplasien.	55
Abbildung 6 Säulendiagramm der prozentualen Anteile der Stärke der Antikörperanfärbung in den untersuchten Skleradenosen.	56

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Haupttypen intermediärer Filamente [53].	12
Tabelle 2 Die c-erbB-Onkogen-Familie [76].	17
Tabelle 3 Übersicht der untersuchten benignen und prämaligen Läsionen. ...	22
Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Antikörper (LSAB= Labelled Streptavidin Biotin Methode mithilfe alkalischer Phosphatase im DAKO-Autostainer).	28
Tabelle 5 Beschreibung der Kategorisierung verschiedener Antikörper.	31
Tabelle 6 Beschreibung der Kategorisierung von EGFR und c-erbB2.	32
Tabelle 7 Beschreibung der Kategorisierung von p53 und p63.	32
Tabelle 8 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentuale Anteile in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	34
Tabelle 9 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentuale Anteile in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	35
Tabelle 10 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	36
Tabelle 11 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	37
Tabelle 12 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	38
Tabelle 13 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	38
Tabelle 14 Ergebnisliste der ER- und PR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil in der Gesamtheit der untersuchten Mammaläsionen.	39
Tabelle 15 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.	42
Tabelle 16 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktalem Hyperplasien.	43
Tabelle 17 Ergebnisliste der Cytokeratin- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.	44
Tabelle 18 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.	45

Tabelle 19 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.	45
Tabelle 20 Ergebnisliste der p53- und p63- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.	45
Tabelle 21 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.	46
Tabelle 22 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.	47
Tabelle 23 Ergebnisliste der c-erbB2- und EGFR- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.	47
Tabelle 24 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.	48
Tabelle 25 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.	48
Tabelle 26 Ergebnisliste der bcl-2- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.	48
Tabelle 27 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.	49
Tabelle 28 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.	49
Tabelle 29 Ergebnisliste der Mib-1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.	50
Tabelle 30 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.	50
Tabelle 31 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.	51
Tabelle 32 Ergebnisliste der Cyclin D1- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen.	51
Tabelle 33 Ergebnisliste der Östrogen- und Progesteronrezeptor- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Fibroadenomen.	52
Tabelle 34 Ergebnisliste der Östrogen- und Progesteronrezeptor- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den duktaalen Hyperplasien.	52

Tabelle 35 Ergebnisliste der Östrogen- und Progesteronrezeptor- positiven Zellen und deren prozentualer Anteil bei den Skleradenosen. 53

Tabelle 36 Medianwerte aus den Prozentangaben positiver Zellen der ausgewerteten Läsionen. 57

9.3 Abkürzungen

ADH	atypische duktale Hyperplasie
ALH	atypische lobuläre Hyperplasie
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
Bcl-2	B-cell-leukaemia and lymphoma 2 gene
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	beziehungsweise
CDK	cyclin dependent proteinkinase
c-erbB2	erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
CK	Cytokeratin
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DH	duktales Hyperplasie
DNA	deoxyribonucleic acid
d.h.	das heißt
EDT	extralobulare ductus terminale
EEC	ectrodactily, ectrodermal dysplasia and facial clefts
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Estrogene Receptor
FA	Fibroadenom
FISH	Fluorescence in situ hybridization
g	Gramm
HE	Hämatoxylin- Eosin
HER-2	Human epidermal growth factor receptor type 2
HWZ	Halbwertszeit
kDA	Kilodalton
Ki-67	Kiel Type 67 (Antigen)
l	Liter
LCIS	Carcinoma lobulare in situ
LSAB	Labelled Strept Avidin Biotin
n	kein Epithel
M	Mol

mM	Milli Mol
Mib-1	Made in Borstel Type 1 (Antikörper)
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
p53	Phosphoprotein Typ 53
p63	Phosphoprotein Typ 63
PR	Progesteron Receptor
pRb	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonucleic acid
RNA- ISH	Ribonucleic acid in situ hybridization
SA	Sklerosierende Adenose, Skleradenose
SMA	smooth muscle protein
TDLE	Terminale duktulo- lobuläre Einheit
TMA	Tissue Microarray
u.a.	unter anderem
UDH	Usual Duktal Hyperplasia
USA	United States of America
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius