

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

**Evaluation von Kandidatenmarkern
für die Progression des östrogenrezeptor-positiven
Mammakarzinoms**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Cibis, Stephan Matthias

aus Salzkotten

2007

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

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

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz

Tag der mündlichen Prüfung: 10.08.2007

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

Referent: Prof. Dr. med. H. Bürger

Koreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz

ZUSAMMENFASSUNG

Evaluation von Kandidatenmarkern für die Progression des östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms

Cibis, Stephan Matthias

Die vorliegende Studie untersucht die Relevanz fünf mittels molekularbiologischer Verfahren ermittelter Kandidatengene für die Progression des östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms. Im Rahmen einer früheren Arbeit waren ER-positive, invasiv duktale Mammakarzinome (Grad 2 und 3) mit ähnlichen immunhistochemischen Charakteristika und einem hohem Maß an zytogenetischer Instabilität mittels Subtraktiver Suppressions Hybridisierung (SSH) auf ihre differenzielle Genexpression untersucht und Kandidatengene mit möglicher Relevanz in der Progression der Karzinome definiert worden.

MATERIAL UND METHODE: Für BMPR-IB, Dermcidin, 14-3-3 zeta, Tab-2 und SLBP wurde eine immunhistochemische Verifizierung an 366 Gewebeproben invasiver Mammakarzinome mittels der Tissue-Microarray-Technik durchgeführt, um Korrelationen zwischen dem Expressionsgrad und dem Tumorgade, der Anzahl genetischer Alterationen und klinischen Follow-up Daten herzustellen. Die Expression der Kandidatengene wurde hierfür mit immunhistochemischen Methoden dargestellt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

SIGNIFIKANTE ERGEBNISSE: Die Expression von BMPR-IB korrelierte signifikant mit unterschiedlichen Aspekten der Tumorprogression, wie dem Tumorgrad, der Anzahl zytogenetischer Alterationen, dem Auftreten von Fernmetastasen und der allgemein schlechten Prognose einer Subgruppe von östrogenrezeptorpositiven invasiv duktalem Mammakarzinomen. Die Signifikanzen verstärkten sich bei einer Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin. Insgesamt ergaben sich Hinweise, dass dem BMP/SMAD-Signaltransduktionsweg eine zentrale Rolle bei der Progression östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome zukommt.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.08.2007

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Definition	1
1.2	Epidemiologie des Mammakarzinoms	2
1.3	Ätiologie und Risikofaktoren	3
1.3.1	Geschlecht und Alter	3
1.3.2	Hereditäre Faktoren und genetische Disposition	3
1.3.3	Endogene hormonelle und reproduktive Faktoren	4
1.3.4	Exogene hormonelle Faktoren.....	5
1.3.5	Diätetische Faktoren und Lebensstil.....	5
1.3.6	Proliferative Mammaläsionen	6
1.4	Prognosefaktoren	7
1.5	Modelle der Karzinogenese.....	8
1.5.1	Anatomisch-histologisches Modell der Brustkrebsentstehung	8
1.5.2	Das Modell der Mehrschritt-Karzinogenese	8
1.6	Progressionsmodelle des invasiven Mammakarzinoms	10
1.6.1	Das serielle Progressionsmodell	10
1.6.2	Das parallele Progressionsmodell	11
1.7	Bestimmung der Kandidatengene.....	14
1.7.1	BMPR-IB (Bone Morphogenetic Protein Receptor Typ IB).....	14
1.7.2	Dermcidin	15
1.7.3	14-3-3 zeta	15
1.7.4	Tab-2 (TAK1-binding protein 2)	16
1.7.5	SLBP (Stem Loop Binding Protein).....	17
1.8	Fragestellung der Arbeit.....	18

2.	Material und Methode	19
2.1	Untersuchung der Expression der ermittelten Kandidatengene im Gewebe invasiver Mammakarzinome mit zwei Tissue Microarrays	19
2.1.1	Das Prinzip der „Tissue Microarray“ Technologie	19
2.1.2	Anwendungsgebiete der TMA-Technologie	21
2.1.3	Die Schritte bei der Erstellung der beiden Tissue Microarrays	22
2.2	Immunhistochemische Untersuchung	28
2.2.1	Das Prinzip der APAAP-Methode zur Detektion von BMPR-1B, Dermcidin, 14-3-3 zeta, Tab-2, SLBP, XIAP und IAP-2	29
2.2.2	Immunhistochemisches Färbeprotokoll für BMPR-1B, Dermcidin, Tab-2, SLBP, 14-3-3-zeta, XIAP und IAP-2	32
2.2.3	Das Prinzip der LSAB/AP-Methode zur Detektion von Ki-67	36
2.2.4	Immunhistochemisches Färbeprotokoll für Ki-67 (MIB-1)	37
2.3	Auswertung	39
2.4	Statistische Analyse	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Immunhistochemische Untersuchung der Kandidatengene auf Tissue Microarrays	41
3.1.1	Häufigkeit der Expression der untersuchten Marker	41
3.1.1.1	<i>Häufigkeit der Expression von BMPR-1B</i>	<i>41</i>
3.1.1.2	<i>Häufigkeit der Expression von Dermcidin</i>	<i>42</i>
3.1.1.3	<i>Häufigkeit der Expression von 14-3-3 zeta</i>	<i>43</i>
3.1.1.4	<i>Häufigkeit der Expression von Tab-2</i>	<i>43</i>
3.1.1.5	<i>Häufigkeit der Expression von SLBP</i>	<i>44</i>
3.1.2	Korrelation der Expression mit dem Östrogenrezeptorstatus	44
3.1.3	Assoziation der Expression der Marker mit dem Tumorgrade	44

3.1.4	Assoziation der Expression der Marker mit dem Grad an zyto-genetischer Instabilität	45
3.1.5	Assoziation der Expression der Marker mit proliferativer und anti-apoptotischer Aktivität	50
3.1.6	Auswertung des Prognosearrays.....	54
3.1.6.1	<i>Korrelation der Markerexpression mit T-, N- und M-Stadium</i>	<i>54</i>
3.1.6.2	<i>Überlebensfunktionen in Abhängigkeit von der Expression der Kandidatengene</i>	<i>55</i>
3.1.6.2.1	<i>Überlebensfunktionen für BMPR-1B.....</i>	<i>55</i>
3.1.6.2.2	<i>Überlebensfunktionen für Dermcidin.....</i>	<i>56</i>
3.1.6.2.3	<i>Überlebensfunktionen für 14-3-3 zeta.....</i>	<i>56</i>
3.1.6.3	<i>Einfluss der Markerexpression auf das Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen</i>	<i>57</i>
4.	Diskussion	60
5.	Schlussfolgerungen.....	71
6.	Literaturverzeichnis	72
7.	Danksagung.....	88
8.	Lebenslauf	89
9.	Anhang.....	I
9.1	Reagenzien	I
9.1.1	Citratpuffer	I
9.1.2	TRIS-Puffer (Spülpuffer bei APAAP-Methode).....	I
9.1.3	RPMI-Lösung	I
9.1.4	RPMI+HuSe	II
9.1.5	Neofuchsin-Lösung	II

9.2	Abbildungsverzeichnis.....	III
9.3	Tabellenverzeichnis.....	IV
9.4	Abkürzungen.....	V

1. Einleitung

1.1 Definition

Das Mammakarzinom stellt eine heterogene Gruppe von malignen epithelialen Tumoren des Brustdrüsenparenchyms dar, die sich hinsichtlich Verlauf, Prognose und Ansprechen auf eine Therapie unterscheiden [12].

Die gebräuchliche Unterscheidung von duktalem und lobulärem Typ beruht auf der Annahme, duktale Karzinome entstünden ausschließlich aus dem Epithel der Ausführungsgänge (Duktulus) und lobuläre aus dem der Läppchen (Lobulus). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass beide Subtypen aus der proliferationsaktiven terminalen duktulo-lobulären Einheit (TDLE), bestehend aus terminalem Duktulus und Läppchen, entstehen.

Anhand morphologischer Kriterien und bestimmter Wachstumsmuster werden spezifische histologische Karzinome von sogenannten „not otherwise specified“ Karzinomen unterschieden (Tabelle 1). Die Hälfte aller Karzinome wächst im oberen äußeren Quadranten der Brust, jeweils 10% entstehen in den übrigen Quadranten und 20% im Mamillenbereich [12].

<p><u>Nicht invasive Karzinome:</u> (regional zwischen 5-30% aller Mammakarzinome)</p> <ul style="list-style-type: none">• Lobuläre Karzinome<ul style="list-style-type: none">- Carcinoma lobulare in situ (LCIS) (5%)• Duktale Karzinome<ul style="list-style-type: none">- Duktales Carcinoma in situ (DCIS) (95%)
<p><u>Invasive Karzinome:</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Invasives lobuläres Karzinom (ca. 10-20%)<ul style="list-style-type: none">- pleomorphes Karzinom- Siegelringzell-Karzinom• Invasives duktales Karzinom<ul style="list-style-type: none">- invasives duktales Karzinom (sog. „Not Otherwise Specified“, ca. 80%)- medulläres Karzinom (< 1%)- muzinöses Karzinom (Gallertkarzinom) (2%)- tubuläres Karzinom (1-2%)- papilläres Karzinom (< 1%)- Morbus Paget der Mamille mit invasivem duktalem Mammakarzinom- weitere Subtypen: Azinuszellkarzinom, adenoidzystisches ~, apokrines ~, kribriiformes ~, glykogenreiches ~, entzündliches ~, lipidreiches ~, metaplastisches ~, sekretorisches ~, mikropapilläres ~, neuroendokrines ~, onkozytisches ~, Talgdrüsenkarzinom

Tabelle 1: Klassifikation der Mammakarzinome

1.2 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einer Neuerkrankungsrate von 70-80 pro 100000 Frauen pro Jahr [12] die häufigste maligne Neubildung bei Frauen in Deutschland und weltweit und stellte im Jahr 2005 mit 17455 Opfern (entspricht 4,0%) die fünfthäufigste Todesursache in Deutschland dar [121]. Jährlich erkranken nach Schätzungen der Dachdokumentation Krebs des Robert-Koch-Institutes in Deutschland etwa 47500 Frauen an Brustkrebs, was einem Anteil von 24,4% an allen Krebsneuerkrankungen bei Frauen entspricht [9]. 10-12% aller Frauen werden in ihrem Leben an Brustkrebs erkranken [103]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 60 Jahren deutlich früher als das anderer Malignome (67. Lebensjahr).

Obwohl die geschätzte Inzidenz in Deutschland seit 1995 rückläufig ist, haben sich die Mortalitätsraten seit den 70er Jahren nicht wesentlich verbessert. Die Tendenz zu einer sinkenden Mortalität seit 1997 wird einerseits der vermehrten Erkennung von Neubildungen in frühen, nicht-invasiven und damit prognostisch günstigeren Entwicklungsphasen und andererseits der Entwicklung neuer, spezifischer Therapien zugeschrieben. In den letzten Jahren wurden erheblich mehr In-situ-Brusttumoren registriert, was wahrscheinlich durch verbesserte radiologische Techniken und vermehrte Früherkennungsaktivitäten in Deutschland bedingt ist [41].

Die im Vergleich zu Nordeuropa und Nordamerika auffällig niedrigere Inzidenz der Mammakarzinome besonders in Südeuropa, Afrika und Asien [122] und die Tatsache, dass sich in Migrantenfamilien aus einem Land mit niedriger Inzidenz nach Umsiedlung die Erkrankungshäufigkeit über mehrere Generationen der höheren Inzidenz des Ziellandes angleicht, werden im Wesentlichen auf die unterschiedlichen exogenen Einflüsse des westlichen Lebensstils wie Umwelt und Ernährung auf die Karzinogenese zurückgeführt [144]. Insgesamt weisen früh industrialisierte Länder wie Nordamerika, Westeuropa und Australien eine hohe Inzidenz von Mammakarzinomen, aber auch von anderen Tumorentitäten wie Lungen-, Darm- oder Prostatakarzinomen auf [12, 10].

1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Brustkrebs stellt ein histopathologisch heterogenes Krankheitsbild mit einer multifaktoriellen Ätiologie dar, die genetische, hormonelle, Ernährungs- und Umweltfaktoren einschließt.

Obwohl durch epidemiologische Studien viele ätiologische Schlüsse gezogen und Risikofaktoren erarbeitet werden konnten, ist die genaue Ätiologie des Mammakarzinoms noch immer weitgehend unbekannt.

1.3.1 Geschlecht und Alter

Haupttrisikofaktoren des Mammakarzinoms sind das Geschlecht und das Alter. Das Brustkrebsrisiko ist beim weiblichen Geschlecht 400 mal so hoch wie beim männlichen [10]. Die Erkrankungshäufigkeit steigt mit dem Lebensalter.

Nach der Menopause zeigen sich unterschiedliche Entwicklungen der Inzidenz: Während die Inzidenz in einigen Ländern postmenopausal sinkt, zeigt sie in anderen eine bimodale Verteilungskurve mit verlangsamter Progredienz im Sinne von prä- und postmenopausal entstehenden Mammakarzinomen [28].

1.3.2 Hereditäre Faktoren und genetische Disposition

Eine positive Familienanamnese mit einer Erkrankung bei Verwandten ersten Grades (Mutter, Schwester, Tochter) stellt den wichtigsten individuellen Risikofaktor dar [104]. So ist das Risiko bei Erkrankung der Mutter auf 11%, bei Erkrankung von Schwester und Mutter sogar auf 33% erhöht (relatives Risiko (RR) 1,2-3,0) [95, 102].

Der Risikoanstieg ist zudem vom Erkrankungsalter der Verwandten abhängig: Erkrankt eine Mutter nach ihrem 50. Lebensjahr erhöht sich das relative Risiko für ihre Tochter auf 1,5. Bei Erkrankung der Mutter vor deren 50. Lebensjahr steigt es auf einen Wert von 4 [47].

Während das sogenannte *sporadische Mammakarzinom* nicht erblich gebunden ist, tragen etwa 0,3-0,4% aller Frauen dominante, hoch penetrante

Keimbahnmutationen bestimmter Brustkrebsgene, die in jedem Alter, am stärksten jedoch vor dem 35. Lebensjahr, zur Ausbildung des sogenannten *familiären Mammakarzinoms* disponieren [23, 72].

1.3.3 Endogene hormonelle und reproduktive Faktoren

Die bis zu zweifache Risikoerhöhung bei früher Menarche vor dem 12. Lebensjahr und/oder später Menopause nach dem 50. Lebensjahr wird durch die verlängerte Einwirkzeit oder erhöhte Konzentration des endogenen Östrogens erklärt. Auch Anzahl und Zeitpunkt von Schwangerschaften sind als Ursache hormoneller Umstellungen Risikofaktoren: Erfolgte die erste ausgetragene Schwangerschaft erst nach dem 35. Lebensjahr, so ist das Brustkrebsrisiko zwei- bis dreifach erhöht. Bei Nulliparität liegt das relative Risiko bei 3,0.

Primipara unter 24 Jahren jedoch haben ein verringertes allgemeines Brustkrebsrisiko, wobei weitere Schwangerschaften den Schutz noch erhöhen [112]. Die Erklärung hierfür liegt möglicherweise im Prozess der Zelldifferenzierung zu laktierenden Zellen in der Schwangerschaft und Stillzeit. Im Laufe des Abstillens kommt es zu einem Kollaps des Drüsenbaumes, der zu einem Verlust der bis zu diesem Zeitpunkt geschädigten Zellen führt. Die verbleibenden Stammzellen („stem cells 2“) sind gegenüber einer Karzinogenese weniger anfällig [112].

Für Frauen, die 25 Monate oder länger gestillt haben, wurde eine Reduktion des Brustkrebsrisikos um 33% im Vergleich zu Frauen, die nicht gestillt haben, beschrieben. Dieser protektive Effekt des Stillens scheint für junge Frauen ausgeprägter zu sein als für ältere [66, 76, 77].

1.3.4 Exogene hormonelle Faktoren

Die Zufuhr exogener Hormone im Rahmen der oralen Kontrazeption erhöht insbesondere bei Nullipara unter 20 Jahren reversibel das relative Brustkrebsrisiko auf 1,24 [26, 120].

Auch die jahrelange Einnahme von Östrogen, Östrogen-Progesteron-Kombinationspräparaten oder des hormonähnlichen, synthetischen Wirkstoffes Tibolon im Rahmen einer Hormonersatztherapie (HRT) in der Postmenopause bewirkt eine Risikoerhöhung (RR 1,26 bzw. 26%) [7, 8, 24, 87, 134]. Deshalb wird die Indikation von Hormonpräparaten heute auf ausgeprägte Formen der „Wechseljahresbeschwerden“ und Ausnahmefälle zur Vorbeugung der Osteoporose beschränkt.

1.3.5 Diätetische Faktoren und Lebensstil

Die vermehrte Aufnahme von Nahrungsfetten ist als potentieller Risikofaktor für Brustkrebs umstritten [51, 120]. Die Arbeitsgruppen um *Wu* und *Ziegler* konnten jedoch die Bedeutung exogener Einflüsse wie Umwelt und Ernährung auf die Brustkrebsentstehung durch ihre Untersuchungen der Krebsinzidenz in Migrantengruppen untermauern [135, 136, 144]. Der Verzehr von Obst und Gemüse senkt entgegen der früheren Annahme nach neuen Erkenntnissen der European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC) nicht das Brustkrebsrisiko [128]. Die Ursache der Risikoerhöhung durch Übergewicht bzw. Gewichtszunahme (Adipositas) in der Postmenopause liegt in der verstärkten Aromatisierung von androgenen Vorstufen in Östrogene im Fettgewebe, woraus ein erhöhter Östrogenspiegel resultiert [82]. Regelmäßiger Alkoholkonsum von 35-44 g/d erhöht das relative Brustkrebsrisiko auf 1,32. Für eine tägliche Alkoholmenge von ≥ 45 g ist RR 1,46 und steigt um 7,1% pro zusätzliche 10g/d Alkohol [49, 85, 98]. Rauchen scheint keine wesentliche Erhöhung des Brustkrebsrisikos zu bedeuten [49]. Aus dem Bereich der Umweltfaktoren sind erhöhte Konzentrationen an Umweltgiften wie Polychlorbiphenylen und Pestiziden im Brustfettgewebe, und die Exposition

gegen radioaktive Strahlung insbesondere vor dem 20. Lebensjahr mit einer Erhöhung des relativen Risikos auf einen Wert von 2,0-4,0 assoziiert [14, 80, 120].

1.3.6 Proliferative Mammaläsionen

Mammographische Studien konnten zeigen, dass das Brustkrebsrisiko bei erhöhter Drüsenkörperdichte erhöht ist, bei gleichzeitig reduzierter Sensitivität der Mammographie [15].

Eine Reihe von Brustdrüsenerkrankungen gehen mit einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos einher, welches mit dem Auftreten von histologischen Atypien deutlich ansteigt [101]. Nicht-proliferative Brustdrüsenerkrankungen sind mit keiner bis nur leichter Erhöhung des Brustkrebsrisikos assoziiert, während dieses bei proliferativen Erkrankungen ohne Atypien etwa verdoppelt und beim Vorliegen von Atypien mindestens vervierfacht ist [13]: So beträgt das relative Risiko im Falle der duktaalen Hyperplasie (DH) 1,5-2,4 und erhöht sich im Falle der atypischen duktaalen Hyperplasie (ADH) für die ipsilaterale Mamma und im Falle der atypischen lobulären Hyperplasie (ALH) für beide Brüste auf 4,0-5,3 [36, 12]. Das DCIS als direkte Vorläuferläsionen des invasiven Karzinoms ist mit einem zwölffach erhöhten lokalen Brustkrebsrisiko verbunden. Frauen mit diagnostiziertem Brustkrebs haben ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko, ein Karzinom in der anderen Brust zu entwickeln [120].

1.4 Prognosefaktoren

Eine Vielzahl unterschiedlicher Prognosefaktoren wurde bereits in der Literatur beschrieben und 1999 im College of American Pathologists Consensus Statement systematisch, anhand der Stärke der publizierten Evidenz kategorisiert, zusammengefasst [39] (Tabelle 2).

Aufgrund des unterschiedlichen klinischen Verlaufs der Erkrankung ist eine Prognose meist schwer zu stellen. Deshalb nimmt die Suche nach aussagekräftigen Prognosefaktoren eine zentrale Rolle in der Brustkrebsforschung ein. Die Kontrolle bestimmter Parameter im Rahmen der pathologischen Aufbereitung des Präparates wie z.B. des Hormonrezeptorstatus oder der Expression von erbB2/Neu haben neben der prognostischen auch prediktive Relevanz, da sie eine Vorhersage des Ansprechens auf bestimmte Therapiemaßnahmen ermöglichen.

<p><u>Kategorie I:</u> nachgewiesene prognostische Relevanz</p> <ul style="list-style-type: none">• TNM-Staging• histologisches Grading• histologischer Typ (Differenzierung)• Mitoserate (Anzahl mitotischer Figuren pro 10 HPF)• Hormonrezeptor-Status <p><u>Kategorie II:</u> biologische und klinische Relevanz erforscht, valide statistische Studien fehlen</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>c-erbB-2</i> (Her2-neu)• p53• Proliferationsmarker• Invasion von Lymph- und Blutgefäßen <p><u>Kategorie III:</u> keine nachgewiesene prognostische Relevanz</p> <ul style="list-style-type: none">• DNA-Ploidie• Dichte der Mikrogefäße (microvessel density)• EGFR (Epidermal Growth Factor-Rezeptor)• TGF-α• bcl-2• pS2• Cathepsin D

Tabelle 2: Prognosefaktoren des Mammakarzinoms nach College of American Pathologists Consensus Statement 1999 [39]

1.5 Modelle der Karzinogenese

1.5.1 Anatomisch-histologisches Modell der Brustkrebsentstehung

Die in den letzten zwanzig Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Karzinogenese spiegeln sich im anatomisch-histologischen Modell der Brustkrebsentstehung wider:

Normale Epithelzellen der terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLE) sind der Ursprung atypischer Hyperplasien, die sich zu In-situ-Karzinomen weiterentwickeln, aus denen letztendlich invasive, unter Umständen metastasierende Karzinome entstehen. Die oben genannten Vorläuferläsionen liegen laut diesem Modell also auf einem histologischen Kontinuum zwischen normalen TDLE und invasiven Mammakarzinomen (IBC). Sie treten gehäuft mit synchronen invasiven Mammakarzinomen auf, zeigen identische genetische Alterationen wie diese und sind Risikofaktoren für das Entstehen invasiver Mammakarzinome [1].

1.5.2 Das Modell der Mehrschritt-Karzinogenese

Das Modell der Mehrschritt-Karzinogenese beschreibt die Tumorentstehung als schrittweise Ansammlung einer Vielzahl genetischer Veränderungen. Diese Mutationen können angeborenen oder im Laufe des Lebens erworben, endogen oder exogen verursacht sein und neben- oder nacheinander auftreten, bevor aus einem schnell wachsenden, zunächst jedoch unter Umständen noch gutartigen „Tumorzellklon“ ein bösartig infiltrierender und destruierender Tumor mit der Fähigkeit zur Metastasierung entsteht [6, 114].

Das invasive Mammakarzinom entwickelt sich aus dem normalen Drüsenepithel schrittweise über die Stadien der Hyperplasie, der prämaligen Transformation und des Carcinoma in situ. Mit zyto- und molekulargenetischen Untersuchungen konnte in den letzten Jahren die generelle Akkumulation genetischer Alterationen als treibende Kraft der Transformation der Zellen und Progression maligner Tumoren auf molekularer Ebene identifiziert werden.

Diese betreffen wachstumsregulierende Gene, Zellzyklusregulatorgene, DNA-Reparaturgene und Fremdstoffmetabolismogene [11, 50, 30, 37, 40, 97].

1.6 Progressionsmodelle des invasiven Mammakarzinoms

1.6.1 Das serielle Progressionsmodell

Nach diesem Progressionsmodell liegen alle Brustdrüsenerkrankungen auf einem sogenannten biologischen Kontinuum, in dem sie obligat hin zu einem malignen Endstadium fortschreiten. Im invasiven Stadium des Karzinoms erfolgt parallel zum Größenwachstum des Tumors eine schrittweise Entdifferenzierung von Grad G1 über G2 zu G3 [35, 107], weil in einem Karzinom intermediären Malignitätsgrades der schlecht differenzierte Anteil schneller wächst als der gut differenzierte [referiert in: 123].

Die These einer seriellen Progression wird gestützt von epidemiologischen Studien, in welchen eine Korrelation zwischen zunehmenden morphologischen Veränderungen von Mammaläsionen und einer schrittweise Zunahme des Brustkrebsrisikos gezeigt wurde [36]. Bei fortgeschrittenen Karzinomen wurde häufig ein höheres Grading gefunden, und bei Zunahme des Tumorwachstums wurde auch ein Anstieg des Gratings festgestellt [55, 56]. Zudem ließen sich viele von invasiven Karzinomen bekannte Expressionsmuster von Zellzyklus- und Apoptoseproteinen auch in präinvasiven Läsionen wie der duktalem Hyperplasie vom gewöhnlichen Typ nachweisen [93]. Auch die nachgewiesene Akkumulation genetischer Alterationen, die Zunahme der proliferativen Aktivität zwischen den unterschiedlichen Vorläuferläsionen, die Modulation der Zellzyklus- und Apoptoseproteine und fortschreitende Veränderungen der Kernmorphologie und Chromatinverteilung wurden als Beweise der streng linearen Progression herangezogen [92, 96, 130].

O'Connell et al. kam bei der Analyse der LOH zu dem Ergebnis, dass 50% der prämaligen Proliferationen (typische und atypische Hyperplasien) und 80% der DCIS das gleiche Muster aufwiesen wie fortgeschrittene Läsionen der selben Brust [97]. Während im Falle des DCIS die genetischen Alterationen bestimmten Regeln folgten, schienen sie jedoch in benignen proliferativen Läsionen (BPBD) zufällig. Zudem ließen sich nicht alle in Vorläuferläsionen wie

z.B. der gewöhnlichen duktafen Hyperplasie gefundenen Alterationen auch in assoziierten DCIS und invasiven Karzinomen nachweisen [96].

Auch *Cserni* fand durch den Vergleich von primären Karzinomen und Rezidiven Hinweise dafür, dass zumindest ein Teil der gut-differenzierten Karzinome im Laufe der Zeit zum einem höheren Grade fortschreitet, während andere keine Progression zeigen [27].

1.6.2 Das parallele Progressionsmodell

Der stetige Fortschritt auf den Gebieten der Tumorgenetik und Molekularbiologie mit Einführung neuer Techniken zur Untersuchung chromosomaler Alterationen wie z.B. der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), der Mikrosatellitenanalyse oder der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) weckten Zweifel am seriellen Progressionsmodell und führten zur Erarbeitung eines morphologisch-genetischen Progressionsmodelles mit mehreren parallelen Progressionswegen der verschiedenen Tumorgade.

So konnte *Millis et al.* durch Vergleiche der Grades von invasiv duktafen Mammakarzinomen, Lokalrezidiven und axillären Lymphknotenmetastasen nachweisen, dass sich der Tumorgade zwischen diesen Phasen der Erkrankung nicht ändert. Zudem fand die Gruppe Assoziationen zwischen dem Grade des invasiv duktafen Karzinoms und dem Subtyp der duktafen in-situ Komponente [88]. *Hakama et al.* untersuchte die Aggressivität durch Screening diagnostizierter Mammakarzinome und bestärkte mit den Ergebnissen die Hypothese, dass die biologische Aggressivität der Karzinome im Laufe der Progression konstant bleibt [48].

Roylance et al. fand mittels CGH heraus, dass nur bei 16% der G3-Tumoren ein Verlust des kurzen Armes des Chromosoms 16 nachweisbar ist, während diese genetische Alteration in 65% der G1-Karzinome auftrat. Da jedoch eine einmal erworbene genetische Alteration im Laufe einer Entdifferenzierung nicht rückgängig gemacht werden kann, müssten im Falle einer schrittweisen Entdifferenzierung die genetischen Alterationen der G1-Tumoren eine

Teilmenge derer der G3-Tumoren darstellen. Aus ihren Ergebnissen schloss sie, dass sich die Mehrzahl der G1-Tumoren nicht zu G3-Tumoren entdifferenzieren. Vielmehr besitzen die unterschiedlichen Tumorgades verschiedene molekulare Ursprünge und Pathogenesewege und bieten aufgrund ihrer spezifischen biologischen Verhaltensmuster unterschiedliche molekulare Angriffspunkte für eine gezielte Forschung und Therapie [111].

Die Arbeitsgruppen um *Bürger* und Mitarbeiter konnten ebenfalls mittels CGH durch Analyse und Vergleich spezifischer chromosomaler Alterationen zwischen DCIS-Untergruppen und jeweils synchronen, assoziierten invasiven Karzinomen zeigen, dass die genetische und morphologische Heterogenität invasiver Karzinome bereits auf der Ebene ihrer jeweiligen In-situ-Vorläuferläsionen nachweisbar ist, und die genetischen Muster von DCIS und jeweiligem synchronen, assoziierten invasiv duktalem Karzinom fast identisch sind [18]. So findet sich ein 16q-Verlust fast nur bei gut- und intermediär-differenzierten DCIS. Intermediär-differenzierte DCIS unterscheiden sich von gut-differenzierten durch eine höhere durchschnittliche Anzahl genetischer Aberrationen (2.2 gegen 5.5) und mehr 1q-Zugewinne und 11q-Verluste. Schlecht differenzierte DCIS wiederum zeigen mehr Amplifikationen (17q12, 11q13) und eine höhere durchschnittliche Zahl genetischer Imbalancen (7,1).

In einer weiteren Arbeit konnte *Bürger et al.* zeigen, dass eine große genetische Ähnlichkeit einerseits zwischen gut-differenzierten DCIS und tubulären und tubulo-lobulären Karzinomen (als Vertretern von G1-Tumoren) und andererseits zwischen schlecht-differenzierten DCIS und inaktiv duktalem G3-Karzinomen besteht. So zeigten hoch differenzierte invasiv duktales Karzinome (G1) eine niedrige durchschnittliche Anzahl genetischer Aberrationen und den oben für DCIS beschriebenen Verlust des 16q-Arms, während letzterer bei invasiv duktalem Karzinomen vom Grad 3 viel seltener auftrat [19]. Aus ihren Erkenntnissen erarbeitete die Gruppe ein zytogenetisch-morphologisches Progressionsmodells des invasiven Mammakarzinoms mit parallelen Progressionswegen [20] (Abbildung 1).

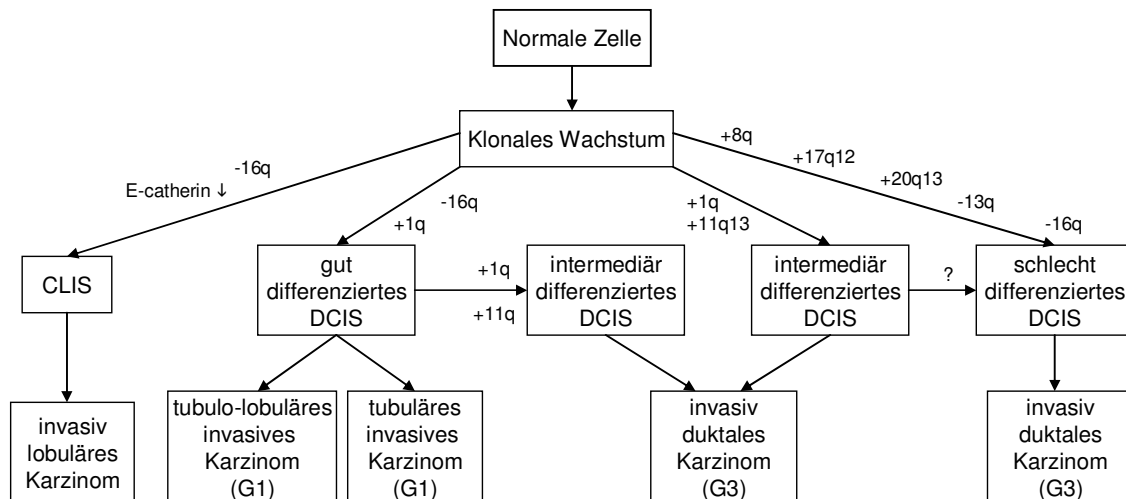


Abbildung 1: Zytogenetisch-morphologisches Progressionsmodell des invasiven Mammakarzinoms mit parallelen Progressionswegen nach Bürger et al. [20]

Da jedoch auch 20-30% der G3-Karzinome 16q-Verluste zeigen, kann zumindest für einen Teil dieser Karzinome eine schrittweise Progression ausgehend von gut-differenzierten G1- oder G2-Karzinomen nicht ausgeschlossen werden.

Korsching et al. identifizierte in einer retrospektiven Studie eine Untergruppe dieser G3-Karzinome als potentielle Vertreter schlecht differenzierter Karzinome, die durch Entdifferenzierung aus gut-differenzierten Tumoren entstanden sein könnten, welche ein hohes Maß an genetischer Instabilität erworben haben. Sie zeichnete sich durch Zugewinne an 7p und 5p, 16q-Verluste in 70% der Fälle, Verluste von 9q, ein hohes Maß an zytogenetischer Instabilität (mit durchschnittlich 16,6 Alterationen pro Tumor), starke ER-Expression und keine starke Expression von p53, c-erbB2 und Ck 5 aus [71].

1.7 Bestimmung der Kandidatengene

Mit dem Ziel, die der oben genannten möglichen Entdifferenzierung zugrunde liegenden genetischen Alterationen zu finden, untersuchte die Arbeitsgruppe um Mike Helms vom Institut für Klinische Chemie und Labormedizin und Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Universitätsklinik Münster sechs ER-positive, invasiv duktale Mammakarzinome vom Grad 2 und 3 mittels Subtraktiver Suppressions Hybridisierung (SSH) auf ihre differenzielle Genexpression. Die Karzinome zeichneten sich alle durch einen Verlust des kurzen Armes des Chromosoms 16, eine ähnliche Proteinexpression (PR-positiv, c-erbB2 0–2; DAKO score/no c-erbB2-amplification, EGFR negativ, p53 0–1, CK 5 negativ, CK 8/18 positiv) und ein hohes Maß an zytogenetischer Instabilität aus. Da 7p-Zugewinne von *Korsching et al.* als Charakteristikum der oben genannten Untergruppe schlecht-differenzierter ER-positiver Karzinome beschrieben wurden [71], wurden Grad 3-Karzinome mit 7p-Zugewinnen und Grad 2-Karzinome mit normalem 7p verglichen.

Letztendlich wurden die folgenden fünf Gene als potentielle Kandidatengene klassifiziert:

1.7.1 BMPR-IB (Bone Morphogenetic Protein Receptor Typ IB)

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMP) gehören zur TGF β -Superfamilie und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Gewebewachstum und –remodelling. Die Effekte der durch BMPs vermittelten Signaltransduktion sind wachstumshemmend.

BMPs binden an zwei Typen von transmembranösen Rezeptoren, BMPR-I und BMPR-II, die über Serin/Threonin-Kinaseaktivität verfügen. Durch die Ligandenbindung werden BMP-Rezeptoren vom Typ I durch BMP-Rezeptoren vom Typ II phosphoryliert. Die aktivierten BMPR-I phosphorylieren wiederum nachgeschaltete SMAD-Proteine, welche im Zellkern akkumulieren und als Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren [29, 54, 58, 64, 83, 108].

BMPP-IB, ein Subtyp der Bone Morphogenetic Protein Rezeptoren mit hoher Affinität für Bone Morphogenetic Proteins (BMP), wird während der Embryogenese und in adultem Gehirngewebe, Knochen und hämatopoetischen Stammzellen gebildet.

1.7.2 Dermcidin

Die Sequenz des Peptids Dermcidin wurde im Jahr 2001 erstmalig von *Schittek et al.* veröffentlicht, die es als antibiotisches Peptid charakterisierte, welches in den Zellen der Schweißdrüsen exprimiert, in den Schweiß sezerniert und auf die Hautoberfläche transportiert wird [113].

Dermcidin wird normalerweise nur von den Zellen menschlicher Schweißdrüsen und den Zellen der Pons des Gehirns und des parazentralen Gyrus des zerebralen Kortex exprimiert. In beiden Geweben verbessert es die Überlebenschancen der Zellen, indem es sie vor Schädigungen schützt und das Zellwachstum antreibt.

1.7.3 14-3-3 zeta

Die 14-3-3 Proteine sind eine große Familie von regulierenden Molekülen, die in allen eukaryonten Zellen exprimiert werden. Ihr besonderes Merkmal ist die Fähigkeit, eine Vielzahl von Signalproteinen unterschiedlicher Funktion zu binden und deren enzymatische Aktivität und subzelluläre Lokalisation zu verändern, darunter Kinasen, Phosphoserine, Phosphothreonine, Phosphatasen und transmembranöse Rezeptoren.

Meek et al. untersuchte Proteine, die an 14-3-3 Proteine während der Interphase und der Mitose binden [84]. Sie identifizierte unter den mit 14-3-3 Proteinen interagierenden Proteinen solche, die an der Regulation des Zellzyklus, an der Signaltransduktion, dem Metabolismus, der Proteinsynthese, der Bindung von Nukleinsäuren, der Chromatinstruktur, der Sekundär- und

Tertiärstruktur von Proteinen, der Proteolyse, der Funktion der Nukleoli, dem Transport in den Nukleus und anderen zellulären Prozessen beteiligt sind.

Die Bindung von 14-3-3 Proteinen war zum Teil abhängig vom Zellzyklus.

Diese Fülle von Interaktionen erlaubt es den 14-3-3 Proteinen, eine wichtige Rolle in einer Vielzahl vitaler Regulationsprozesse, wie der mitogenen Signaltransduktion, dem apoptotischen Zelltod, der Kontrolle des Zellteilungszyklus und der zellulären Stress-Response zu übernehmen.

1.7.4 Tab-2 (TAK1-binding protein 2)

Proteinen aus der Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen wird eine Rolle als zwischengeschaltete Proteine in Signaltransduktionswegen zugesprochen. Zu ihnen gehören ERK/MAP Kinasen, ribosomale S6 Kinase (Rsk) und Raf-1. Letzteres ist ein 74 kDa Protein mit intrinsischer Kinaseaktivität gegen Serin/Threonin-Reste und wird in vielen Geweben und Zelllinien exprimiert.

Die Aktivierung von Raf-1 ist abhängig von der niedermolekularen GTPase Ras, wobei die Mechanismen der Aktivierung weitgehend unbekannt sind. Zwei der wahrscheinlich involvierten Proteine sind Ksr-1 und Tak1.

Ksr-1 (kinase suppressor of Ras) ist eine neue Raf-verwandte Proteinkinase, deren Funktion für die Ras Signaltransduktion benötigt wird.

Tak1 (TGF β -aktivierte Kinase 1), einem Mitglied der MAPKKK-Familie (Mitogen-Aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase), wird eine Schlüsselrolle als Regulator der induzierbaren Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP-1 zugesprochen, weshalb sie eine wichtige Rolle in der Regulierung von Genen spielt, die Entzündungsreaktionen vermitteln. Tak1 ist an der durch TGF β -Stimulierung ausgelösten Aktivierung der MAP-Kinase-Familie beteiligt [140].

Zwei menschliche Proteine, TAB1 und TAB2 (*Tak1 binding protein 1* und *2*) wurden mittels „yeast two-hybrid system“ identifiziert. TAB1 und Tak1 können aus Säugetierzellen co-immunopräzipitiert werden, weshalb angenommen wird, dass TAB1 eine Rolle als Aktivator von Tak1 in der TGF β -vermittelten Signaltransduktion von Zellen spielt [118]. In biochemischen in-vitro Studien wurde ein Tak1-Komplex gefunden, der Tak1 und die Adaptorproteine TAB1

und TAB2 umfasst. Bisher ist jedoch noch unklar, welche Teile dieses Komplexes essentiell für die Signaltransduktion sind.

1.7.5 SLBP (Stem Loop Binding Protein)

Bei Eukaryonten ist die DNA mit spezifischen, basischen Proteinen, den Histonen, assoziiert und dadurch im Zellkern als Chromatin sehr stark kondensiert. Bei jeder Zellteilung wird in der S-Phase des Zellzyklus die DNA verdoppelt (Replikation). Die Biogenese der Histone ist stöchiometrisch an die DNA-Replikation gebunden, da ein Überfluss an Histonen hochgradig toxisch für die Zelle ist. Die Expression der für die Histonproteine kodierenden Gene unterliegt daher der strikten Regelung des Zellzyklus und findet ebenfalls nur in der S-Phase statt. Im Gegensatz zu allen übrigen eukaryontischen mRNAs endet die Histon-mRNA nicht mit einem Poly(A)-Schwanz, sondern mit einer 26 Nukleotide umfassenden Sekundärstruktur, die eine Haarnadel-Struktur, den sogenannten „stem-loop“, enthält [33]. Diese Struktur am nichttranslatierten 3'-Ende (auch UTR für "untranslated region" genannt) der Histon-mRNA ist erforderlich für die post-transkriptionelle Regulation der Histon-mRNA während des Zellzyklus.

Das Protein *SLBP* (Stem Loop Binding Protein) existiert sowohl im Nukleus als auch in den Polyribosomen von Säugetierzellen. Es bindet ausschließlich an den stem-loop der Histon-mRNA [126] und spielt eine zentrale Rolle in der zellzyklusabhängigen Expression der Histongene, da es an vielen Aspekten des Histon-mRNA-Metabolismus, wie der pre-mRNA-Prozessierung, dem nukleo-zytoplasmatischen mRNA-Export, der Translation und der Stabilitätsregulation (mRNA-Degradation) beteiligt ist [34, 94, 131, 142].

1.8 Fragestellung der Arbeit

Die Expression des Östrogen-Rezeptors gilt bei invasiven Mammakarzinomen im Allgemeinen als Zeichen einer höheren Tumordifferenzierung und einer vergleichsweise guten Prognose aufgrund der Möglichkeit einer adjuvanten antihormonellen Therapie. Dennoch gibt es auch östrogenrezeptorpositive, schlecht differenzierte Karzinome mit schlechter Prognose. Die diesem Verhalten zugrunde liegenden genetischen Mechanismen sind bislang unklar.

Vor Kurzem definierte *Korsching et al.* eine Untergruppe von invasiv duktalem Mammakarzinomen vom Grad 3, die durch mäßige bis starke ER-Expression, schwache Expression von c-erbB2, p53 und EGFR, eine hohe Proliferationsrate, ein hohes Maß an zytogenetischer Instabilität und eine schlechte Prognose charakterisiert sind. Im Gegensatz zu den meisten anderen Grad 3 Karzinomen, zeichnet sich diese Gruppe durch häufige chromosomale Verluste an 16q, wie sie für Karzinome niedrigeren Grades typisch sind, und 7p-Zugewinne/9q-Verluste aus. Deshalb werden diese G3-Tumoren als potentielle Endstadien einer schrittweisen Entdifferenzierung von ER-positiven, G1- oder G2-Karzinomen angesehen.

Die zugrunde liegenden, beteiligten Gene, welche mit dieser Entdifferenzierung assoziiert sind, sind weitestgehend unbekannt.

Im Rahmen einer vorausgegangenen Arbeit der Arbeitsgruppe wurde eine Reihe von Kandidatengenen definiert.

Die Relevanz dieser Kandidatengene in der Progression des Mammakarzinoms soll anhand immunhistochemischer Analysen an Mammakarzinomen mittels der Gewebemikroarraytechnik analysiert werden.

2. Material und Methode

2.1 Untersuchung der Expression der ermittelten Kandidatengene im Gewebe invasiver Mammakarzinome mit zwei Tissue Microarrays

2.1.1 Das Prinzip der „Tissue Microarray“ Technologie

Bei dieser Methode werden winzige zylindrische Gewebeproben mit einem Durchmesser von 0,6 – 3,0 mm aus hunderten von in Paraffin eingebetteten Primärtumoren, den sogenannten Geberblöcken (engl.: „donor“), entfernt und in einen Empfängerblock aus Paraffin (engl.: „recipient“) in einer standardisierten Anordnung überführt.

Von den resultierenden „Gewebesammlungen“ können am Microtom histologische Schnitte wie von jedem einzelnen Ursprungsblock angefertigt werden [99]. Die Färbung der gewonnenen Schnitte erfordert keine zusätzliche Aufbereitung und unterscheidet sich nicht von der bei Großflächenschnitten.

Mit Schnitten dieser Probensammlungen können anschließend in situ Analysen an bis zu 1000 Gewebeproben von Primärtumoren auf DNA-, RNA- oder Protein-Ebene simultan in einem einzigen Arbeitsgang durchgeführt werden, z.B. mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), in-situ-Polymerasekettenreaktion, in-situ-RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR), RNA-in-situ-Hybridisierung (RNA-ISH) oder Immunhistochemie (IHC).

Die Tissue-Microarray-Technologie ermöglicht so ein im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie deutlich schnelleres und effizienteres Screening großer Probenmengen und den immunhistochemischen Nachweis einer im Vergleich von Tumor- und Normalgewebe differentiellen Proteinexpression [86].

Sie basiert auf dem erstmals 1986 von *Battifora et al.* beschriebenen Multi-Tissue Tumor Block (MTTB) oder „Sausage“-Block, in dem eine damals noch geringere Anzahl (bis zu 100) größerer Gewebeproben ungeordnet in einen einzelnen Paraffinblock eingebracht wurden [5]. *Kononen et al.* [69] entwickelte dieses Verfahren weiter, indem er die erforderliche Größe und Form der

Gewebeproben standardisierte, wodurch eine präzisere Arrangement erreicht und die Anzahl der aus einem Gewebeblock entnehmbaren Biopsien maximiert werden konnte.

Dies wurde vor allem durch die Entwicklung eines speziellen Stanzgerätes durch die Firma Beecher Instruments (Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin, USA) unter Mithilfe des National Institute of Health möglich.

Mit Hilfe dieses Stanzgerätes konnten nun genormte zylindrische Biopsien mit zunehmend kleinem Durchmesser (Durchmesser = 0,6 mm) mit minimalem Materialverlust aus dem Spenderblock gewonnen und kontrolliert anhand eines Rasters/Musters in den Empfängerblock übertragen werden. Mehrere Autoren konnten zeigen, dass Biopsien dieser Größe in einem statistisch großen Kollektiv ausreichen, um die morphologischen Eigenschaften des Gewebes beurteilen zu können [59, 125]. Gleichzeitig bleibt die Interpretierbarkeit des gestanzten Tumorblockes bezüglich morphologischer und molekularer Analysen erhalten, wenn nicht zu viele Stenzen aus dem Geberblock entnommen werden [17].

Wenn die Kapazität eines Gewebeblockes erschöpft werden kann, so können aus einem einzelnen Tumorblock von 18x18 mm Größe mit dem Stanzgerät theoretisch 300 Proben entnommen werden. Da aus dem konstruierten TMA wiederum 300 Schnitte gewonnen werden können, ermöglicht dieses Vorgehen also theoretisch die Durchführung von 90000 (300x300) in situ Analysen eines einzigen Tumoren. Da häufig nur wenig Probenmaterial für Studien vorhanden ist, können an begrenzten Tumormengen mittels der TMA-Technologie somit sehr viel mehr Untersuchungen durchgeführt werden.

Durch die exakte Anordnung der Proben auf dem Array anhand von X-Y-Koordinaten sind mittlerweile eine computergestützte Konstruktion und ein Hochdurchsatz-Screening möglich, wobei der große Probendurchsatz eine direkte statistische Validierung der erhobenen Ergebnisse ermöglicht.

Ein weiterer Vorteil der Gewebearray-Technologie ist, dass eine Vielzahl von Analysen unter exakt gleichen Inkubationsbedingungen (z.B. Temperatur, Konzentration der verwendeten Reagenzien) durchgeführt wird, weshalb die

Ergebnisse durch methodische Unregelmäßigkeiten weitgehend unbeeinflusst bleiben.

Dieser hohe Grad an Standardisierung dient auch der Qualitätskontrolle pathologischer Untersuchungen, da auf diese Weise die Varianz der Untersuchungsergebnisse innerhalb eines Labors und zwischen unterschiedlichen Laboren reduziert wird.

Zudem bietet das Verfahren ökonomische Vorteile, da es den Zeitaufwand und nicht zuletzt die Menge der genutzten Reagenzien reduziert [17, 63, 69, 119].

2.1.2 Anwendungsgebiete der TMA-Technologie

Die abgeschlossene Sequenzierung des menschlichen Genoms hat zur Identifikation von zehntausenden von Genen und deren Struktur geführt [75, 129]. Deren Funktion ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt. Hochdurchsatzverfahren wie die cDNA- oder DNA-Microarray-Technologie ermöglichen zwar die Identifizierung aller in einer Zelle vorkommenden Gene, jedoch keine Aussage über deren Bedeutung im Zellstoffwechsel. Sie basieren auf der Expression auf RNA-Ebene und erlauben keine zwingende Aussage über die Expression oder Funktion des jeweiligen Genproduktes.

Die Validierung potentieller Biomarker auf Proteinebene ist jedoch die Voraussetzung zur Übertragung gewonnener Kenntnisse in eine klinische Anwendung.

Die Tissue-Microarray-Technik hingegen ermöglicht die Verifizierung und Lokalisierung von Zielstrukturen (Proteinen, RNA, mRNA und DNA-Sequenzen) *in situ*, d.h. an ihrem Wirkort in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen (IHC), der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), mRNA-in-situ-Hybridisierung oder RNA-in-situ-Hybridisierung (RNA-ISH) [16, 69, 74, 90].

Das Design der Tissue Microarrays richtet sich nach der zugrunde liegenden Fragestellung.

2.1.3 Die Schritte bei der Erstellung der beiden Tissue Microarrays

Um die Expression der durch die molekularbiologischen Untersuchungen ermittelten Kandidatengene im Gewebe invasiver Mammakarzinome zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Tissue Microarrays erstellt. Während die Gewebeproben des ersten TMA vollständig mittels CGH charakterisiert waren, war das zweite ein prognostisches Gewebearray.

Die beiden TMAs enthielten Tumorgewebe aller Stages (u.a. drei Stage IV-Patienten) und Differenzierungsgrade (n = 366, G1 = 46, G2 = 194, G3 = 113). Für 13 Tumoren war der Tumorgade nicht (mehr) bekannt.

Die verwendeten Gewebeproben waren zuvor im Rahmen der allgemeinen pathologischen Aufbereitung in gepuffertem 4%-igem Formaldehyd fixiert und anschließend gemäß gängiger Protokolle in Paraffin eingebettet worden.

Für das erste Gewebearray wurden jeweils eine Stanzbiopsie, für das zweite jeweils zwei Proben aus dem Bereich der infiltrativen Tumorfront der jeweiligen Tumoren entnommen.

In beiden TMAs betrug der Durchmesser der Gewebezylinder 0,6 mm und der Abstand zwischen den Biopsien im Empfängerblock 1,0 mm.

Für die Herstellung des ersten Tissue Microarrays wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 144 Mammakarzinomen aus den Archiven des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der Universität Münster genutzt.

Das Kollektiv beinhaltete alle Subtypen invasiver Mammakarzinome.

Die Tumoren waren zum Zeitpunkt der Erstbefundung gemäß *anerkannter Protokolle* [38] als G1 (n=17), G2 (n=74) oder G3 (n=49) gegradet worden.

Im Rahmen einer früheren Forschungsarbeit war der Grad an zytogenetischer Instabilität dieser 144 Proben mittels CGH bestimmt worden [70]:

Die durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen betrug 8,0 (durchschnittlich 7,2 Alterationen bei den ER-positiven Tumoren und 9,8 bei den ER-negativen Tumoren).

Um Einblicke in die prognostische Relevanz und intratumorale Heterogenität der Expression der Kandidatengene zu gewinnen, wurde mit

formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben von weiteren 222 Mammakarzinomen, für die ein klinisches Follow-up von wenigstens 5-Jahren vorlag, ein zweiter prognostischer TMA hergestellt.

Am Anfang der Konstruktion der beiden Arrays stand die Erstellung des Kollektivs durch Auswahl geeigneter Gewebeproben anhand der vorliegenden Befunde der pathohistologischen Untersuchungen.

Anhand der Journal-Nummern der Befundbögen wurden die entsprechenden Gewebelöcke aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Münster herausgesucht.

Um für die Konstruktion der beiden Gewebearrays repräsentative Tumorareale zu ermitteln, wurde, sofern noch nicht vorhanden, von jedem Geberblock ein histologisches Schnittpräparat angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Anschließend wurden die HE-Schnitte von Prof. Dr. med. Bürger, Facharzt für Pathologie der Universitätsklinik Münster, lichtmikroskopisch auf ihre Eignung für die Gewebearray-Technik untersucht und das Gewebeareal, aus dem die Gewebestanden entnommen werden sollten, auf den Schnitten mit einem farbigen Stift markiert. Diese Schnitte dienten so im weiteren Vorgehen als Schablone zur Identifizierung der gewünschten Areale auf den Paraffinblöcken. In diesem Arbeitsschritt wurde auch, falls notwendig, eine Revision des Gradings und eine erneute Klassifikation der verwendeten Tumoren gemäß aktualisierter Klassifikationen vorgenommen.

Für das erste Array wurden die Journalnummer, das histologische Grading (G1 bis G3), die Anzahl genetischer Alterationen und der ER-Status (positiv oder negativ); für das prognostische Array die Journalnummer, der ER-Status, der Tumorgrade, das T-Stadium (1 bis 4), N-Stadium (0 bis 2) und M-Stadium (0 oder 1) gemäß TNM-Klassifikation, das Beobachtungsintervall bis zum Auftreten des Ereignisses (BI in Monaten), das Versterben (TD, ja oder nein) und das Zeitintervall bis zum Auftreten eines Tumorrezidivs (RF in Monaten) oder Fernmetastasenrezidivs (MF in Monaten) dokumentiert.

Die Daten wurden für das jeweilige Array in eine Datenmaske übertragen (Microsoft Office XP: Excel 2002).

Anschließend wurden die markierten Schnitte und die Paraffinblöcke in der Reihenfolge sortiert, wie sie später auf dem Array angeordnet werden sollten, und den Feldern der zu erstellenden Gewebearrays zugewiesen („TMA map“). Die logische Anordnung der Gewebeproben erfolgte dabei zum leichteren Wiederfinden der Stanzten auf den Arrays folgendem Schema: Auf den beiden Empfängerblöcken wurden die Gewebeproben in Quadranten mit jeweils einhundert Biopsien angeordnet. Die Quadranten wurden mit römischen Zahlen durchnummeriert (I-IV). Jeder Quadrant wiederum enthielt 10 Reihen (a – j) mit jeweils 10 Spots (1 – 10) (Abbildungen 2 und 3).

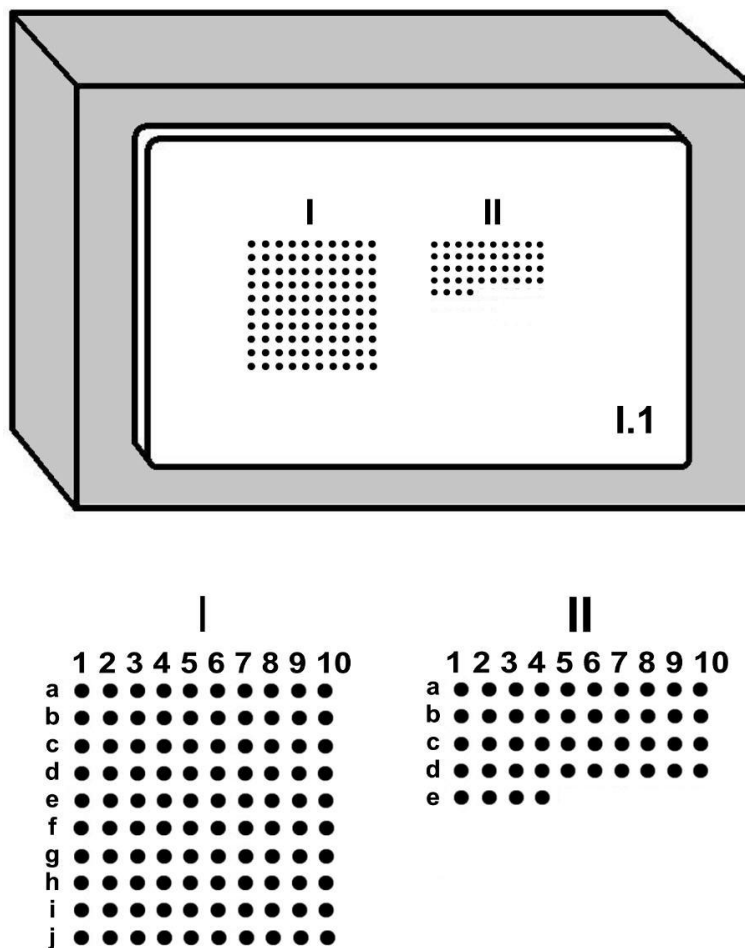


Abbildung 2: Anordnung der 144 Proben auf dem TMA I.1 (CGH-Array)

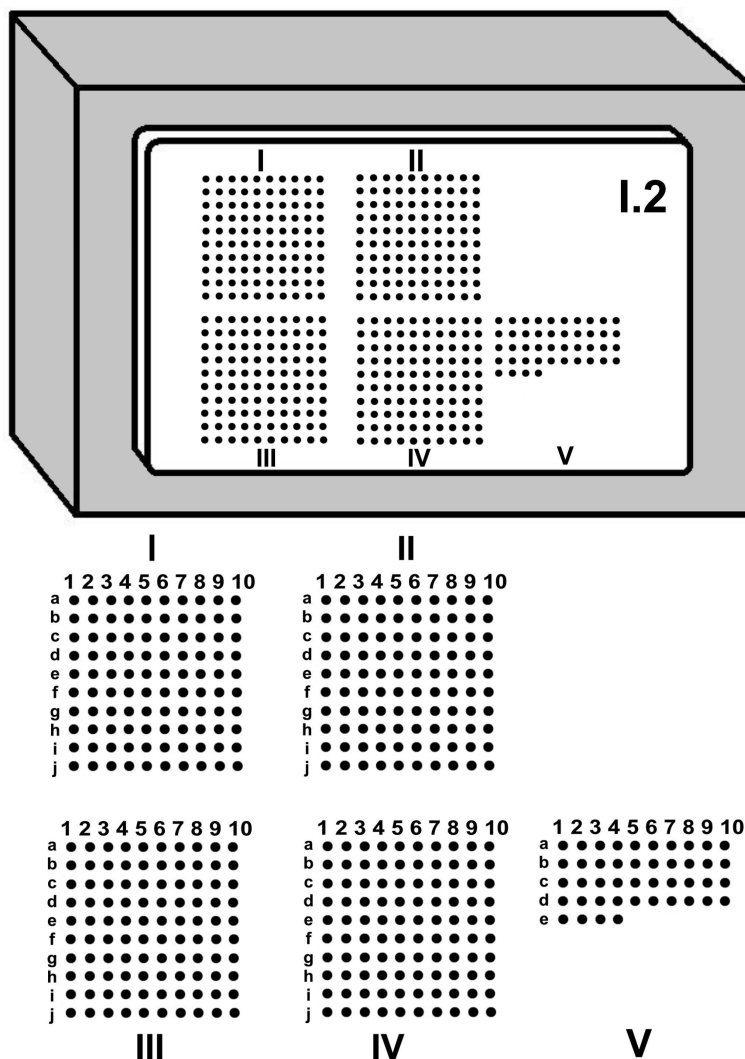


Abbildung 3: Anordnung der 444 Proben auf dem TMA I.2 (Prognosearray)

Somit ließ sich jede Gewebestanze auf dem Array anhand der Koordinaten exakt beschreiben und leicht wiederfinden.

Die TMA-Blöcke wurden mit einer Kombination aus römischen und arabischen Zahlen bezeichnet: I.1 (CGH-TMA) und I.2 (prognostisches TMA).

Block I.1 enthielt je eine Probe, Block I.2 je zwei Proben der betreffenden Primärtumoren. Für den ersten Empfängerblock ergaben sich somit bei 144 Patienten 144 Biopsien (144 x 1), für das prognostische TMA mit 222 Patienten folglich 444 Biopsien (222 x 2).

Tabelle 3 zeigt exemplarisch das Schema der Feldbezeichnung für einen Datensatz:

Paraffin-Block	Quadrant	Reihe	Zellen	Datensatz
I.2	I	A	a1a2	Primärtumor 1

Tabelle 3: Schema der Feldbezeichnung für einen Datensatz

Für die Herstellung der Tissue Microarrays wurde das Stanzgerät der Firma Beecher Instruments (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, Maryland, USA) genutzt, dessen Hauptbestandteile zwei dünnwandige Hohladeln aus rostfreiem Stahl und eine Haltevorrichtung für die Paraffinblöcke sind.

Mit der ersten Hohladel wurde die erforderliche Anzahl Paraffinzylinder aus einem leeren Paraffinblock (Empfänger-Block) ausgestanzt.

Durch einen Stempel in der Nadel wurde das Paraffin nach jedem Stanzen aus der Nadel herausgedrückt und verworfen.

Nun wurde mit einer zweiten Nadel aus jedem Geber-Block die gewünschte Anzahl exakt in die Hohlräume des Empfänger-Blockes passender zylindrischer Gewebeproben aus dem Bereich der infiltrativen Tumorfront gestanzt und in den entsprechenden Empfängerblock an die gewünschte Stelle übertragen.

Der Durchmesser der Biopsien betrug 0,6 mm, der Abstand zwischen ihnen im Empfängerblock 1,0 mm.

Durch Auflegen der zuvor markierten HE-Schnitte auf die entsprechenden Geberblöcke konnte die gewünschte Region auf jedem Block leicht wiedergefunden werden. Durch eine digitale Präzisionssteuerung wurden die Platzierung der Biopsien und die Abstände zwischen ihnen genau kontrolliert.

Die fertige Gewebezusammenstellung wurde umgekehrt mit geschmolzenem Paraffin bedeckt und in einem Ofen für fünf Minuten bei 50° C erwärmt. Durch die Erwärmung homogenisierte das Paraffin der Gewebeproben und des Empfängerblocks und es resultierten die soliden Tissue Microarrays, von denen am Mikrotom histologische Schnitte für die immunhistochemischen Untersuchungen angefertigt werden konnten [99].

Zur Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurden die zuvor erstellten Excel-Tabellen um Spalten für den lichtmikroskopisch zu bestimmenden IHC-Score der untersuchten Marker ergänzt.

2.2 Immunhistochemische Untersuchung

Die immunhistochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an Schnitten von 4 µm Dicke durchgeführt. Für das prognostische Array wurde der durchschnittliche Wert beider Gewebestanzten jedes Tumors als Basis der weiteren Untersuchung genutzt.

Die immunhistochemische Expression jedes Markers wurde evaluiert, um die Hypothese zu prüfen, dass die Expression des jeweiligen Kandidatengenes bei ER-positiven Karzinomen einen Einfluss auf die Tumorphiliferation, die zytogetische Instabilität und eine Abhängigkeit vom Tumor-Grade zeigte.

Der Grad an zytogetischer Instabilität war für die Biopsien des ersten Arrays (I.1 CGH-Array) bereits im Rahmen einer früheren Arbeit mittels der Comparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) bestimmt worden.

Zur Klärung des Einflusses der Kandidatengene auf die Tumorphiliferation wurden die Proben zusätzlich mit dem Proliferationsmarker *Ki-67 (Mib-1)* und den Apoptosemarkern *XIAP* und *IAP-2* gefärbt.

Das Proliferationsantigen *Ki-67* kommt in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus vor. Da ruhende Zellen in der G0-Phase das Antigen nicht exprimieren, lässt sich am Anteil der gefärbten Zellen die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation, d.h. die Proliferationsaktivität, unmittelbar ableiten [42, 43, 67, 115].

XIAP, der *X-linked inhibitor of apoptosis*, wird in allen fetalen und adulten Geweben außer in peripheren Lymphozyten exprimiert. *XIAP* inhibiert die durch Serum-Deprivation induzierte Apoptose und den von Menadion, einem potenten Inducer freier Radikale, verursachten Zelltod [78, 79].

Die Familie der *IAP (inhibitor of apoptosis)* besteht aus baculoviralen Proteinen, die in Insektenzellen die Apoptose verhindern können [52]. Homologe werden auch in Säugetierzellen exprimiert [127]. Zudem reduziert die Expression von *IAP* in Säugetierzellen signifikant die von IL1-beta Convertase vermittelte Apoptose [53].

2.2.1 Das Prinzip der APAAP-Methode zur Detektion von BMPR-IB, Dermcidin, 14-3-3 zeta, Tab-2, SLBP, XIAP und IAP-2

Zur Detektion wurde in allen Färbungen außer bei Ki-67 (Mib-1) die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) angewendet.

Bei dieser Komplexmethode werden 3-4 Antikörperlösungen eingesetzt, um die Antigen-Antikörper-Reaktion im Gewebe indirekt mithilfe zusätzlicher immunologischer bzw. chemischer Reaktionen sichtbar zu machen:

der Primärantikörper, der Brücken-Antikörper und der APAAP-Komplex.

Der spezifisch gegen das Antigen gerichtete *Primärantikörper* wird für den Laborbedarf produziert, indem man das entsprechende humane Antigen in gereinigter Form in ein Tier (z.B. Maus, Kaninchen, Ziege) injiziert, welches dann tierische Antikörper bildet, die aus dem Serum des Tieres isoliert und gereinigt werden. Da diese sogenannten *polyklonalen Antikörper* von unterschiedlichen B-Zell-Linien gebildet werden, sind sie gegen mehrere Epitope des Antigenmoleküls gerichtet.

Benötigt man einen hochspezifischen Antikörper, der nur gegen ein einziges Epitop des Antigens gerichtet ist, so muss nach dem oben beschriebenen Vorgehen aus dem Versuchstier diejenige B-Zell-Linie (Klon) selektiert werden, die eben diesen sogenannten *monoklonalen Antikörper* produziert. Hierzu wird das Tier getötet und die Milz, die viele B-Lymphozyten enthält, entnommen. Nun werden die B-Zellen in einem speziellen Medium mit Myelom-Zellen, das sind immortale tumoröse B-Zellen, fusioniert. Sobald die Hybrid-Myelom-Zelle (Hybridom), die den gewünschten Antikörper produziert, identifiziert und isoliert wurde, kann sie entweder in einer Zellkultur praktisch unbegrenzt lange wachsen und Antikörper produzieren, die aus dem Überstand der Zellkultur isoliert werden können, oder sie wird wiederum in eine Maus injiziert, wo sie die Bildung eines Tumors induziert. In diesem Fall lassen sich die gewünschten Antikörper dann aus der Aszitesflüssigkeit des Tumors isolieren.

Der *APAAP-Komplex* ist ein gegen das Markerenzym „Alkalische Phosphatase“ gerichteter Immunkomplex.

Er besteht aus monoklonalen IgG-Antikörpern (z.B. aus der Maus) gegen das Enzym alkalische Phosphatase, deren Fab-Teile spezifisch mit dem Enzym konjugiert sind (Enzym-anti-Enzym-Komplex).

Das Enzym hat die Funktion, ein farbloses Chromogen in einen lichtmikroskopisch nachweisbaren Farbstoff umzuwandeln und die Antigen-Antikörper-Bindung so im Gewebe sichtbar zu machen.

Der *Brückenantikörper* stellt die Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem APAAP-Komplex dar, muss also einen anderen tierischen Ursprung aufweisen als der Primärantikörper und der APAAP-Komplex. Er ist mit einem Fab gegen die Fc-Region des Primärantikörpers und mit dem anderen Fab gegen die des Immunkomplex-Antikörpers gerichtet.

Entstammen der Primärantikörper und der Antikörper des Immunkomplexes unterschiedlichen Spezies ist der zusätzliche Einsatz eines *Sekundärantikörpers* erforderlich.

Der sequentielle Ablauf mehrerer Reaktionen führt durch die Vervielfachung der Bindungsstellen für die Markersubstanz zu einer kaskadenartigen Amplifikation des Nachweissignals, wodurch auch geringe Antigenmengen nachgewiesen werden können. Zudem ist durch eine bis zu zweimalige Wiederholung der Schritte Brückenantikörper und APAAP-Komplex eine Verstärkung der Reaktion und Erhöhung der Sensitivität möglich.

Im Ablauf der APAAP-Methode wird der Gewebeschnitt zunächst mit dem jeweiligen spezifischen, aber unkonjugierten Primärantikörper (z.B. aus der Maus) inkubiert, der gegen das gesuchte Antigen im Gewebe gerichtet ist.

Je nachdem, aus welchem Tier der Primärantikörper gewonnen wurde, muss im nächsten Arbeitsschritt der Brückenantikörper eingesetzt werden, welcher in einem dritten Schritt den zur Detektion benötigten APAAP-Komplex bindet.

Damit der Primärantikörper und der Immunkomplex über den Brückenantikörper miteinander verbunden werden können, müssen der Primärantikörper und die Antikörper des Immunkomplexes aus derselben Spezies stammen.

Bei monoklonalen Antikörpern aus der Maus wird der Primärantikörper durch den Brückenantikörper mit dem APAAP-Komplex verbunden.

Der Brückenantikörper wird im Überschuss zugegeben, damit eine seiner Antigenbindungsstellen an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet und die andere für die Bindung des APAAP-Komplexes frei bleibt.

Wird ein Primärantikörper aus einer anderen Spezies als der des Antikörpers im Immunkomplex eingesetzt (z.B. dem Kaninchen), so ist ein zusätzlicher Zwischenschritt mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (z.B. Maus-anti-Kaninchenantikörper = MAR) erforderlich, damit der APAAP-Komplex binden kann.

Nach Zugabe eines Chromogens, im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *Neufuchsin-haltige Entwicklungslösung* verwendet, erhält man durch die anschließende Enzym-Substrat-Reaktion ein auswertbares, hier rotes, Farbprodukt, welches den Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar macht.

Die Gegenfärbung erfolgte in unserem Fall mit *Hämatoxylin nach Mayer*.

Da der Neufuchsinfarbstoff nach der Entwicklung nicht alkoholbeständig war, musste er abschließend mit *Kaiser's Glycerin Gelatine* wässrig eingedeckt werden.

2.2.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll für BMPR-1B, Dermcidin, Tab-2, SLBP, 14-3-3-zeta, XIAP und IAP-2

1. Anfertigung von 4 µm dicken Schnitten und Aufbringen derselben auf Objektträger:

Die TMA-Blöcke wurden gekühlt, die Schnitte am Mikrotom hergestellt, in warmem Wasser gespreitet und auf Objektträger aufgezogen.

Anschließend wurden die Schnitte bei einer Temperatur von 60° C über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

2. Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin:

- a. Eintauchen in 0,25 M NH₄-Ac
- b. Trocknung bei 60° C (über Nacht im Trockenschrank)
- c. Inkubation in 50 mg/ml Poly-L-Lysin bei Raumtemperatur für 30 min
- d. Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur

3. Entparaffinierung der Schnitte:

Die Schnittpräparate wurden zu einer besseren Penetration der Antikörper in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

- a. Inkubation für 2 x 10 min in Xylol
- b. Inkubation für 2 x 5 min in 99%igem Alkohol
- c. Inkubation für 1 x 5 min in 96%igem Alkohol
- d. Inkubation für 1 x 5 min in 80%igem Alkohol
- e. Inkubation für 1 x 5 min in 70%igem Alkohol
- f. zweimalige Spülung mit Aqua dest.

4. Vorbehandlung zur Antigendemaskierung:

Bei sechs der Antikörper war eine Vorbehandlung der Schnittpräparate zur Demaskierung der antigenen Strukturen erforderlich.

Diese umfasste für BMPR-1B eine Inkubation für 10 Minuten im Autoklaven im Citratpuffer bei pH 6,0, für 14-3-3 zeta und SLBP eine Inkubation für 15 Minuten

in der Mikrowelle im Citratpuffer bei pH 7,0, für Tab-2 eine Inkubation für 10 Minuten in Trypsin und für XIAP und IAP-2 eine Inkubation im Autoklaven im Citratpuffer bei pH 6,0 für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur abgekühlt und im Puffer gespült.

Für Dermcidin war keine Vorbehandlung erforderlich.

5. Färbung nach APAAP-Methode:

- Blockierung der endogenen Peroxidase mit 1,5% Wasserstoffperoxid für 15 min zur Reduktion von unspezifischen Hintergrundreaktionen

5.1. Inkubation mit den Primärantikörpern für 45 min bei 20° C

- verwendete Antikörper:

BMPR-IB: R&D systems
monoklonaler Maus-Antikörper, hergestellt mit einem Hybridom einer mit der gereinigten, NS0-derived, rekombinanten Extrazellulardomäne des Human Bone Morphogenetic Protein Receptor IB (rhBMPR-IB) immunisierten Maus

Dermcidin: polyklonaler Kaninchen-Antikörper
bereitgestellt von Dr. rer. nat. Birgit Schittek
(Hautklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland, Sektion für Dermatologische Onkologie)

Tab-2: Santa Cruz
polyklonaler Ziegen-Antikörper, der gegen eine Peptidstruktur am Carboxylende des humanen Tab-2 gerichtet ist

SLBP: polyklonales Kaninchen-IgG
bereitgestellt von Prof. WF Marzluff

(Department of Biology der University of North Carolina,
Chapel Hill, NC, USA)

- 14-3-3 zeta:** IBL
polyklonales Kaninchen-IgG, produziert unter Verwendung
eines synthetischen Peptids, das dem N-terminalen Ende
menschlichen 14-3-3 zeta entspricht
- XIAP:** Transduction
monoklonales Maus-IgG
- IAP-2:** Santa Cruz
polyklonales Kaninchen-IgG

- **Verdünnungen** (verdünnt in RPMI-Lösung):

BMPR-IB:	1:5
Dermcidin:	1:1500
Tab-2:	1:50
SLBP:	1:200
14-3-3 zeta:	1:200
XIAP:	1:50
IAP-2:	1:400

5.2. 3x Spülung mit TRIS-Puffer

5.3. Sekundärer Antikörper (Brückenantikörper):

Die Lösung der Antikörper in RPMI+Humanserum diene der Bindung
nicht-spezifischer antigener Bestandteile des Gewebes.

- für die monoklonalen Primärantikörper **BMPR-IB** und **XIAP** (Maus):
- Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin-Brückenantikörper (RAM)
Inkubation für 30 min in RAM (1:30), verdünnt in RPMI+HuSe (1:8)

- für die polyklonalen Primärantikörper
Dermcidin, SLBP, 14-3-3 zeta und **IAP-2** (Kaninchen):
 - Maus-Anti-Kaninchen Immunglobulin-Brückenantikörper (MAR)
Inkubation für 30 min in MAR (1:125), verdünnt in RPMI
 - Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin-Brückenantikörper (RAM)
Inkubation für 30 min in RAM (1:30), verdünnt in RPMI+HuSe (1:8)
- für den polyklonalen Primärantikörper **Tab-2** (Ziege):
 - Kaninchen-Anti-Ziege Immunglobulin-Brückenantikörper (RAG)
Inkubation für 30 min in RAG (1:100)
 - Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin-Brückenantikörper (GAR)
Inkubation für 30 min in GAR (1:50)

5.4. 3x Spülung mit TRIS-Puffer

5.5. APAAP-Komplex:

- Inkubation für 60 min in APAAP-Komplex

5.6. 3x Spülung mit TRIS-Puffer

5.7. Chromogen-Substratlösung

- Neofuchsin-Lösung, 30 min auf dem Rüttler

5.8. 3x Spülung mit TRIS-Puffer

5.9. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 2 min

5.10. 5 min fließend wässern zum Bläuen

6. *Wässriges Eindecken aus frischem Aqua dest. mit KAISER's Glycerin Gelatine*

2.2.3 Das Prinzip der LSAB/AP-Methode zur Detektion von Ki-67

Die Expression von Ki-67 wurde mittels LSAB/AP-Methode (LSAB = *labeled streptavidin biotin-alkaline phosphatase*) detektiert.

Diese Methode nutzt die Affinität von Streptavidin, einem aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isolierten Glykoprotein, zu Biotin, einem wasserlöslichen Vitamin H. Letzteres lässt sich gut an einen Sekundärantikörper (sogenannter biotinylierter Brückenantikörper) koppeln und stellt die Verbindung zum Antikörper-Antigen-Komplex her.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wird im folgenden Schritt das mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) gebundene Streptavidin aufgetragen, dessen vier Bindungsstellen für das am Sekundärantikörper vorhandene Biotin frei sind. Anschließend reagiert das Enzym bei Zugabe eines Enzym-Substrat-/Chromogengemisches, und es entsteht ein farbiges Endprodukt.

2.2.4 Immunhistochemisches Färbeprotokoll für Ki-67 (MIB-1)

1. Anfertigung von 4 µm dicken Schnitten und Aufbringen auf Objektträger

2. Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin

3. Entparaffinierung der Schnitte

wie unter 2.2.2. beschrieben

4. Vorbehandlung zur Antigendemaskierung:

Zur hitzeinduzierten Demaskierung der antigenen Strukturen wurden die Schnitte für 30 Minuten im Dampfgerät (Steamer, Firma Braun) im Citratpuffer bei pH 6,0 inkubiert.

Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur abgekühlt und im Puffer gespült.

5. Färbung nach LSAB/AP-Methode:

5.1. Inkubation mit dem **Primärantikörper** für 25 min bei Raumtemperatur:

- verwendeter Antikörper:

Ki-67 (Klon Mib-1) Dako
monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane Antigen Ki-67

- **Verdünnung:** 1:100 mit Antibody Diluent Dako REAL™
(Fa.: DAKO, Dänemark)

5.2. Spülung mit Waschpuffer DCS LabLine

(20fach konzentrierte TRIS-Pufferlösung mit Detergenz, enthält 0,05% Proclin 300, Fa.: Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg)

1:20 mit Aqua dest. verdünnt

5.3. Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper

(„DAKO-LSAB-KITT“, Fa.: DAKO, Dänemark):

- Link-AP für 20 min
- 3x Spülung mit Waschpuffer
- Streptavidin/AP für 20 min

5.4. 3x Spülen mit Waschpuffer DCS LabLine

5.5. Auftragen des Enzym-Substrat- / Chromogengemisches

(DAKO-LSAB-KITT, Fa.: DAKO, Dänemark)

- Inkubation für 8 min
- Spülen
- Inkubation für 8 min

5.6. 3x Spülen mit Waschpuffer DCS LabLine

5.7. Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer für 10 sec,
anschließend zum Bläuen unter Leitungswasser 5 min spülen

6. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol

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

(Fa.: R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland)

8. Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur

2.3 Auswertung

Die semi-quantitative Auswertung der Kandidatenmarker erfolgte unabhängig durch Prof. Dr. H. Bürger, Facharzt für Pathologie des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Münster und Dr. J. Packeisen, Facharzt für Pathologie des Instituts für Pathologie des Klinikums Osnabrück.

Die Bewertung der Detektion erfolgte nach folgendem Schema:

Die Expression von **Dermcidin, XIAP und IAP-2** wurde jeweils binär gewertet (jede positive Färbung).

Die Expression von **BMPR-IB, SLBP, Tab-2 und 14-3-3 zeta** wurde wie unten aufgeführt von 0 bis 2 gewertet:

- BMPR-IB:** 0 = keine Reaktion
1 = schwache membranständige oder intrazytoplasmatische Färbung in weniger als 10% der Zellen
2 = mäßige bis starke, fast vollständige Membranfärbung in mehr als 10% der Zellen
- SLBP:** 0 = keine Färbung
1 = Färbung in < 50% aller Zellen
2 = Färbung in > 50% aller Zellen
- Tab-2:** 0 = keine Färbung
1 = Färbung in < 30% der Tumorzellen
2 = Färbung in > 30% der Tumorzellen
- 14-3-3 zeta:** 0 = keine Färbung
1 = Färbung in < 50% der Tumorzellen
2 = Färbung in > 50% der Tumorzellen

Die Bewertung der Expression von **Ki-67** erfolgte gemäß dem folgenden Schema:

- 1 = Färbung in < 10% der Zellkerne
2 = Färbung in $\geq 10\%$, < 25% der Zellkerne
3 = Färbung in $\geq 25\%$ der Zellkerne

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Korrelation zwischen den Ergebnissen der immunhistochemischen und zytogenetischen Untersuchungen, dem Tumorgrade und dem Gesamtüberleben erfolgte mit dem statistischen Auswertungsprogramm SPSS für Windows, Release 13.0 (1. September 2004), der Firma SPSS Inc.

Die Analyse der Korrelation der Marker untereinander, der Marker mit dem Tumorgrade und der Marker mit T-, N- und M-Stadium erfolgte mittels „Frequency Tables“/Chi²-Test nach Pearson.

Die Korrelation der Marker mit der Anzahl genetischer Alterationen erfolgte mittels Student's t-Test.

Anschließend wurden die Gesamtüberlebenszeit und das Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen in Abhängigkeit von der Expression der Kandidatenmarker (BMPR-IB, Dermcidin, 14-3-3 zeta) nach der Kaplan Meier Methode analysiert.

Das Signifikanzniveau wurde mittels log rank Test ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Untersuchung der Kandidatengene auf Tissue Microarrays

Für die fünf potentiellen Kandidatenmarker (BMPR-IB, Dermcidin, 14-3-3 zeta, Tab-2 und SLBP) wurde eine immunhistochemischer Verifizierung der Ergebnisse durchgeführt.

Die immunhistochemische Expression jedes Markers wurde evaluiert, um die Hypothese zu prüfen, dass die Expression des jeweiligen Kandidatengenes bei ER-positiven Karzinomen einen Einfluss auf die Tumorproliferation, die zytogenetische Instabilität und eine Abhängigkeit vom Tumorgade zeigte.

3.1.1 Häufigkeit der Expression der untersuchten Marker

Während auf dem Array I.1 (CGH-Array) Färbungen für alle fünf Kandidatenmarker, Ki-67, XIAP und IAP-2 durchgeführt wurden, wurden die Proben des Arrays I.2 (prognostisches TMA) nur auf die Expression von BMPR-IB, Dermcidin, 14-3-3 zeta und Ki-67 untersucht, weshalb sich im folgenden die absoluten Zahlen nicht zur vollen Probenanzahl (366) summieren.

3.1.1.1 Häufigkeit der Expression von BMPR-IB

In 76,9% der Fälle wurde eine Expression des Bone Morphogenetic Protein Receptor IB (BMPR-IB) nachgewiesen. 15,0% aller Tumoren zeigten eine mäßige bis starke, fast vollständige Membranfärbung in mehr als 10% der Zellen (IHC-Score=2), 61,9% der Proben eine schwache membranständige oder intrazytoplasmatische Färbung in weniger als 10% der Zellen (IHC-Score=1) (Tabelle 4).

BMPR-IB IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozente
0	63	17,2	23,1
1	169	46,2	61,9
2	41	11,2	15,0
Gesamt	273	74,6	100,0
nicht evaluierbar	93	25,4	
Gesamt	366	100,0	

Tabelle 4: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von BMPR-IB

3.1.1.2 Häufigkeit der Expression von Dermcidin

Eine Expression von Dermcidin konnte bei 26,3% aller Karzinome nachgewiesen werden (Tabelle 5).

Dermcidin IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozente
0	202	55,2	73,7
1	72	19,7	26,3
Gesamt	274	74,9	100,0
nicht evaluierbar	92	25,1	
Gesamt	366	100,0	

Tabelle 5: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von Dermcidin

Zudem korrelierte die Dermcidin-Expression positiv mit der Expression von BMPR-IB (Kreuztabellen, Chi²-Test, p=0,01).

24,2% der Tumoren zeigten eine Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin.

3.1.1.3 Häufigkeit der Expression von 14-3-3 zeta

In 83,8% der Fälle war eine Expression von 14-3-3 zeta nachweisbar.

Die Färbung umfasste bei 27,3% aller Tumoren mehr als 50% der Tumorzellen (IHC-Score=2). 56,5% der Proben zeigten eine Färbung in weniger als 50% der Tumorzellen (IHC-Score=1) (Tabelle 6).

14-3-3 zeta IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozente
0	44	12,0	16,2
1	153	41,8	56,5
2	74	20,2	27,3
Gesamt	271	74,0	100,0
nicht evaluierbar	95	26,0	
Gesamt	366	100,0	

Tabelle 6: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von 14-3-3 zeta

3.1.1.4 Häufigkeit der Expression von Tab-2

47,7% der Tumoren exprimierten Tab-2. Bei 5,5% war eine Färbung in mehr als 30% der Tumorzellen (IHC-Score=2), bei 42,2% in weniger als 30% der Tumorzellen zu finden (IHC-Score=1) (Tabelle 7).

Tab-2 IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozente
0	57	39,6	52,3
1	46	31,9	42,2
2	6	4,2	5,5
Gesamt	109	75,7	100,0
nicht evaluierbar	35	24,3	
Gesamt	144	100,0	

Tabelle 7: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von Tab-2

3.1.1.5 Häufigkeit der Expression von SLBP

Die Auswertung ergab eine positive Reaktion in 55,1% der Biopsien. Bei 14,0% der Tumoren umfasste die Färbung mehr als 50% aller Zellen (IHC-Score=2) Fälle. Bei 41,1% der Proben waren weniger als 50% aller Zellen angefärbt (IHC-Score=1) (Tabelle 8).

SLBP IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozente
0	48	33,3	44,9
1	44	30,6	41,1
2	15	10,4	14,0
Gesamt	107	74,3	100,0
nicht evaluierbar	37	25,7	
Gesamt	144	100,0	

Tabelle 8: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von SLBP

3.1.2 Korrelation der Expression mit dem Östrogenrezeptorstatus

Eine signifikant positive Korrelation der Expression des betreffenden Markers mit dem Östrogenrezeptorstatus konnte nur für BMPR-IB ($p=0,029$), Dermcidin ($p=0,020$) und 14-3-3 zeta ($p=0,028$) aufgezeigt werden.

3.1.3 Assoziation der Expression der Marker mit dem Tumorgade

Die ausgeprägteste signifikante Korrelation ergab sich zwischen der Expression von BMPR-IB und dem Tumorgade (Kreuztabellen, χ^2 -Test, $p=0,003$).

Bei Dermcidin war für ER-positive Karzinome eine Tendenz zu statistischer Signifikanz erkennbar ($p=0,065$).

Gleiches galt für den Expressionsgrad von 14-3-3 zeta ($p=0,059$). Signifikanz erreichte die Korrelation zwischen der Expression von 14-3-3 zeta und dem Tumorgrade jedoch nur bei ER-negativen Tumoren ($p=0,021$).

Für Tab-2 und SLBP ließen sich keine Korrelationen mit dem Tumorgrade ermitteln, weder unabhängig vom ER-Status, noch allein für ER-positive oder ER-negative Tumoren ($p>0,1$). Lediglich für SLBP lag eine Tendenz zu einer statistisch signifikanten Korrelation bei ER-negativen Karzinomen vor ($p=0,06$).

Tabelle 9 fasst die ermittelten p-Werte zusammen.

Marker	alle Tumoren	ER+ Tumoren	ER- Tumoren
BMPR-IB	$p = 0,003^*$	$p = 0,678$	$p = 0,001^*$
Dermcidin	$p = 0,224$	$p = 0,065^{(*)}$	$p = 0,905$
14-3-3 zeta	$p = 0,059^{(*)}$	$p = 0,210$	$p = 0,021^*$
Tab-2	$p = 0,295$	$p = 0,277$	$p = 0,557$
SLBP	$p = 0,142$	$p = 0,365$	$p = 0,061^{(*)}$

Tabelle 9: Übersicht über die Korrelation der Expression der Kandidatengene mit dem Tumorgrade

(* signifikante Korrelationen ($p<0,05$) ; ^(*) Tendenz zu statistischer Signifikanz)

3.1.4 Assoziation der Expression der Marker mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität

Die durchschnittliche Anzahl zytogenetischer Alterationen pro Gewebeprobe betrug 8,0. Tumoren mit positivem Östrogenrezeptorstatus wiesen durchschnittlich 7,2 Alterationen, ER-negative Tumoren 9,8 Alterationen auf.

Tabelle 10 stellt die Ergebnisse der Analyse der Assoziation der Markerexpression mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität, gemessen als durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen pro Fall mittels CGH, zusammen. Signifikante Korrelationen und Assoziationen mit Tendenz zu statistischer Signifikanz sind markiert.

Verglichen wurden für BMPR-IB, 14-3-3 zeta, Tab-2 und SLBP jeweils Tumoren mit starker (IHC-Score=2) gegenüber schwacher oder fehlender Expression

(IHC-Score<2) des jeweiligen Markers bzw. für Dermcidin Tumoren mit positiver (IHC-Score=1) gegenüber fehlender Expression (IHC-Score=0).

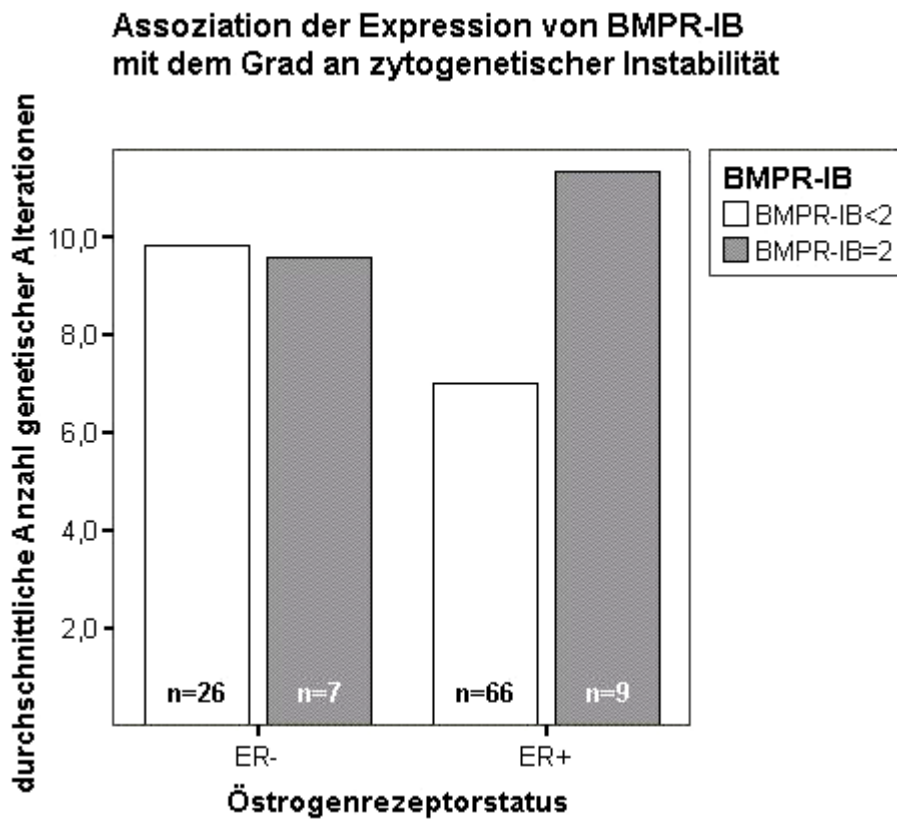
Kandidatengen	alle Tumoren	ER+ Tumoren	ER- Tumoren
BMPR-IB	$p = 0,068^{(*)}$	$p = 0,021^*$	$p = 0,936$
Dermcidin	$p = 0,163$	$p = 0,008^*$	$p = 0,655$
14-3-3 zeta	$p = 0,053^{(*)}$	$p = 0,145$	$p = 0,444$
Tab-2	$p = 0,132$	$p = 0,069^{(*)}$	$p = 0,775$
SLBP	$p = 0,120$	$p = 0,101$	$p = 0,560$
Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin	$p = 0,085$	$p = 0,004^*$	$p = 0,551$

Tabelle 10: Korrelation der Expression der Kandidatengene mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität

(* signifikante Korrelation, (*) Tendenz zu statistischer Signifikanz)

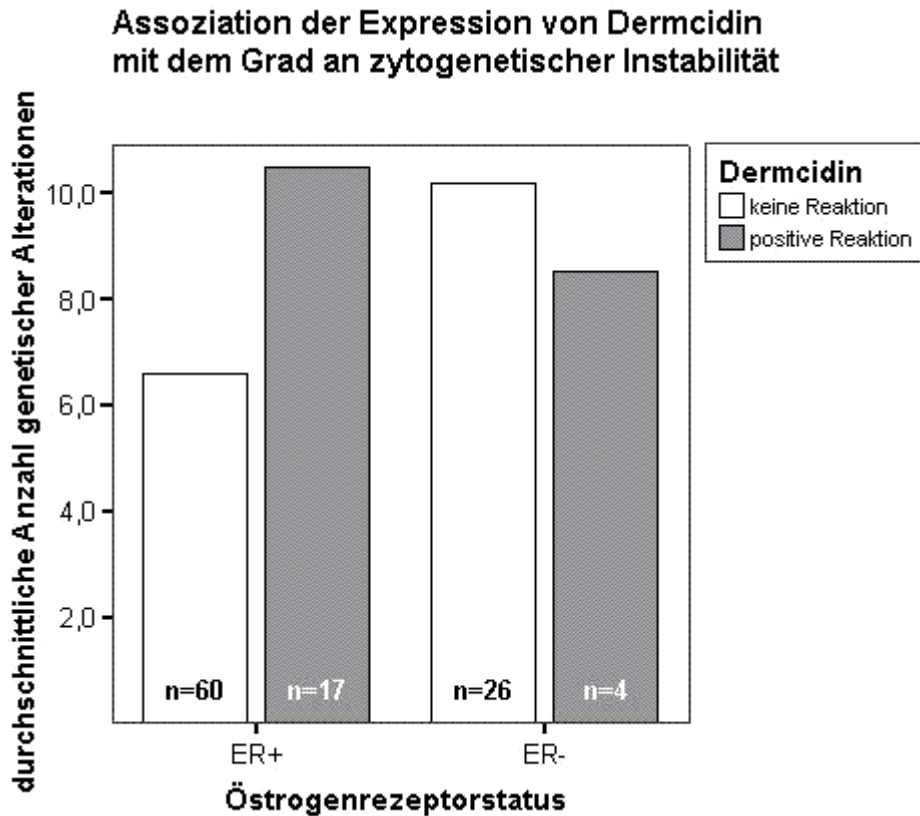
Statistisch signifikante Assoziationen waren nur bei östrogenrezeptorpositiven Karzinomen zu finden.

So zeigte der Expressionsgrad von *BMPR-IB* nur bei ER-positiven Tumoren eine statistisch signifikante Assoziation mit der durch CGH bestimmten durchschnittlichen Anzahl zytogenetischer Alterationen ($p=0,021$), nicht jedoch bei den ER-negativen Karzinomen ($p=0,936$). Östrogenrezeptorpositive Tumoren mit starker Expression von BMPR-IB zeigten also mit durchschnittlich 10,6 Alterationen signifikant mehr genetische Alterationen als Tumoren, die BMPR-IB nur schwach oder gar nicht exprimierten (durchschnittlich 7,7 Alterationen pro Tumor). (Abbildung 4)



**Abbildung 4: Assoziation der Expression von BMPR-IB
mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität
(gemessen als durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen)**

Eine signifikante Korrelation war auch für *Dermcidin*, jedoch erneut nur bei ER-positiven Karzinomen, nachweisbar ($p=0,008$). Unter Nichtberücksichtigung des ER-Status, bzw. für ER-negative Karzinome war sie nicht signifikant ($p=0,163$ bzw. $p=0,655$) (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Assoziation der Expression von Dermcidin
mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität
(gemessen als durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen)**

Auffällig war die ausgeprägte Korrelation zwischen einer *Co-Expression* von *BMPR-IB* und *Dermcidin* und dem Grad an zytogenetischer Instabilität bei ER-positiven Karzinomen ($p=0,004$). Dieser Zusammenhang ließ sich erneut nicht für ER-negative Karzinome aufzeigen ($p=0,551$) (Abbildung 6).

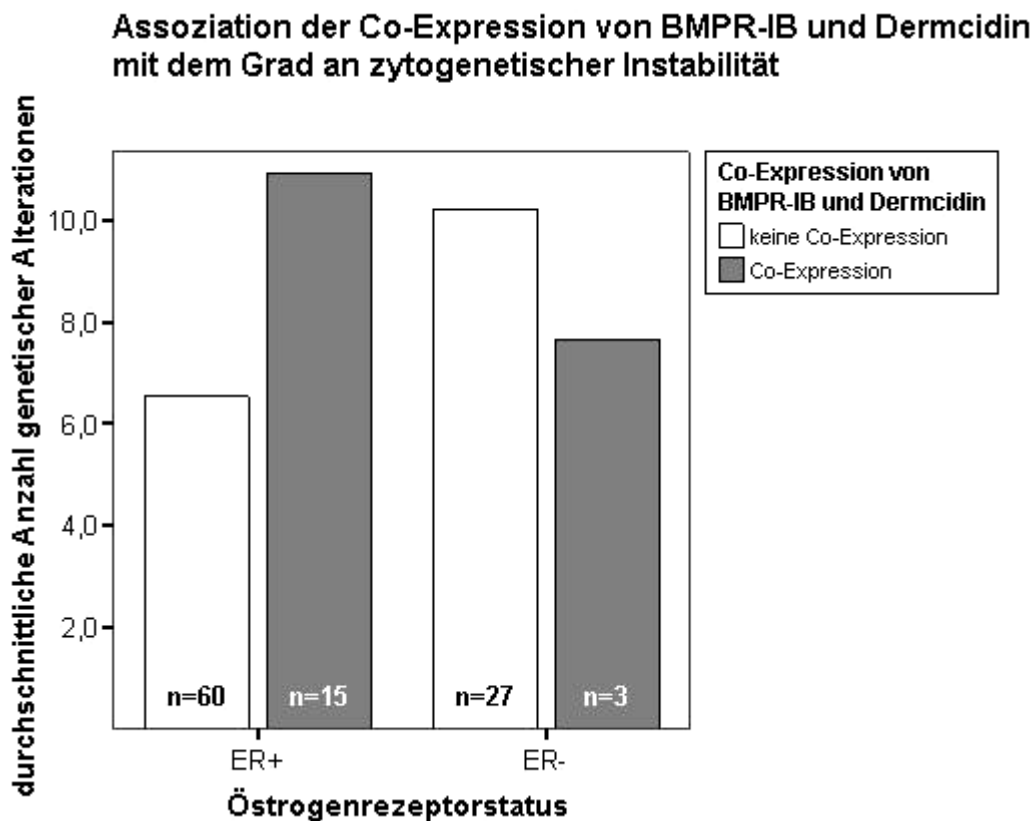


Abbildung 6: Assoziation der Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität (gemessen als durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen)

Für *14-3-3 zeta* war unabhängig vom ER-Status eine Tendenz zu einer signifikanten Korrelation erkennbar ($p=0,053$), die sich bei Differenzierung zwischen ER-positiven und ER-negativen Karzinomen jedoch relativierte.

Die Korrelation des Expressionsgrades von *Tab-2* mit der Anzahl genetischer Alterationen zeigte für ER-positive Tumoren eine Tendenz zu statistischer Signifikanz ($p=0,069$), während für *SLBP* keine Korrelation erkennbar war.

3.1.5 Assoziation der Expression der Marker mit proliferativer und anti-apoptotischer Aktivität

Zur Untersuchung des Einflusses der Markerexpression auf die proliferative Aktivität und Apoptoserate der Tumoren waren immunhistochemische Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67, und den Apoptosemarkern XIAP und IAP-2 durchgeführt worden.

Die Tabellen 11, 12 und 13 fassen die jeweiligen absoluten und relativen Häufigkeiten der Expression des jeweiligen Markers zusammen:

Ki-67 IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozente
1	117	32,0	36,3
2	103	28,1	32,0
3	102	27,9	31,7
Gesamt	322	88,0	100,0
nicht evaluierbar	44	12,0	
Gesamt	366	100,0	

Tabelle 11: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Ki-67 (Mib-1)

XIAP IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozente
0	47	32,6	37,6
1	78	54,2	62,4
Gesamt	125	86,8	100,0
nicht evaluierbar	19	13,2	
Gesamt	144	100,0	

Tabelle 12: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von XIAP

IAP-2 IHC-Score	n	Prozent	Gültige Prozepte
0	2	1,4	1,6
1	121	54,2	98,4
Gesamt	123	86,8	100,0
nicht evaluierbar	21	13,2	
Gesamt	144	100,0	

Tabelle 13: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von IAP-2

Die Expression von BMPR-IB war allgemein korreliert mit Ki-67 ($p < 0,001$), signifikant jedoch nur für ER-positive Karzinome. Hingegen konnte bei ER-negativen Karzinomen kein Einfluss der BMPR-IB-Expression auf die Ki-67-Expression beobachtet werden.

Tumoren mit einer starken, membrangebundenen Expression von BMPR-IB zeichnen sich also durch eine hohe Proliferationsrate aus.

Eine starke anti-apoptotische Aktivität spiegelte sich in der positiven Korrelation zwischen BMPR-IB und XIAP ($p < 0,001$; ER+ $p = 0,014$; ER- $p = 0,957$) und IAP-2 ($p < 0,05$) wider (Tabellen 15 und 16).

Im Gegensatz dazu exprimierten Tumoren mit fehlender oder schwacher Expression von BMPR-IB wenig Ki-67 und XIAP (Abbildung 7).

Auffällig war, dass sich *bei ER-positiven Karzinomen* außer für BMPR-IB und für eine Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin bei keinem der anderen Marker eine Korrelation mit Ki-67 feststellen ließ.

Jedoch zeigten bis auf Tab-2 auch die anderen Kandidatenmarker allgemein signifikante Korrelationen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (Tabelle 14).

Marker	alle Tumoren	ER+ Tumoren	ER- Tumoren
BMPR-IB	$p < 0,001^*$	$p = 0,041^*$	$p = 0,440$
Dermcidin	$p = 0,013^*$	$p = 0,083$	$p = 0,281$
14-3-3 zeta	$p < 0,001^*$	$p = 0,115$	$p = 0,007^*$
Tab-2	$p = 0,208$	$p = 0,540$	$p = 0,455$
SLBP	$p = 0,003^*$	$p = 0,083$	$p = 0,018^*$
Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin	$p = 0,005^*$	$p = 0,038^*$	$p = 0,190$

Tabelle 14: Korrelation der Markerexpression mit Ki-67 (Mib-1)

Die statistische Auswertung der XIAP-Färbung ergab eine positive Korrelation mit BMPR-IB ($p < 0,001$) und 14-3-3 zeta ($p = 0,001$). Diese war bei für 14-3-3 zeta bei ER-positiven Karzinomen noch ausgeprägter ($p < 0,001$) (Tabelle 15).

Marker	alle Tumoren	ER+ Tumoren	ER- Tumoren
BMPR-IB	$p < 0,001^*$	$p = 0,014^*$	$p = 0,957$
Dermcidin	$p = 0,250$	$p = 0,293$	$p = 0,576$
14-3-3 zeta	$p = 0,001^*$	$p < 0,001^*$	$p = 0,698$
Tab-2	$p = 0,136$	$p = 0,145$	$p = 0,875$
SLBP	$p = 0,667$	$p = 0,895$	$p = 0,348$
Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin	$p = 0,329$	$p = 0,353$	$p = 0,671$

Tabelle 15: Korrelation der Markerexpression mit XIAP

Die Abbildung 7 dokumentiert repräsentative immunhistochemische Färbemuster BMPR-IB-positiver Karzinome für Ki-67 und XIAP.

Tumoren, die BMPR-IB stark exprimieren (a), zeigen eine starke Ki-67 Färbung (b) und eine hohe XIAP-Expression (c) als Hinweise für eine erhöhte

Proliferationsrate. Tumoren mit schwacher oder fehlender Expression von BMPR-IB (d) hingegen, exprimieren Ki-67 (e) und XIAP (f) nur schwach.

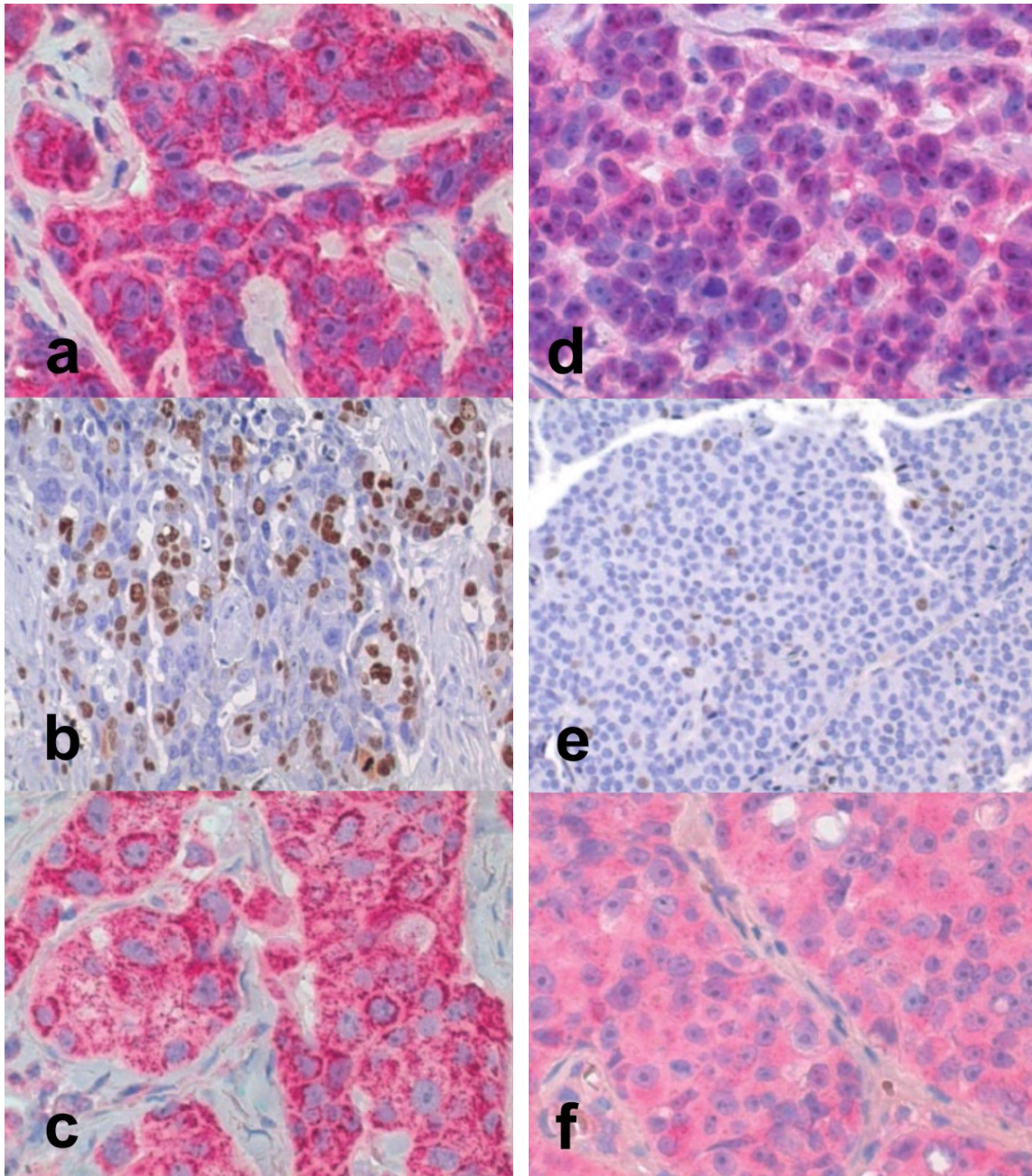


Abbildung 7: Repräsentative immunhistochemische Färbemuster für BMPR-IB, Ki-67 und XIAP bei invasiven Karzinomen.

a-c: Tumoren mit starker, membrangebundener Expression von BMPR-IB (a) zeigen eine starke Ki-67 Färbung (b) und eine hohe Expression von XIAP (c) als Hinweise für eine erhöhte Proliferationsrate.

d-f: Im Gegensatz dazu zeigen Tumoren mit schwacher oder fehlender Expression von BMPR-IB (d) eine schwache Expression von Ki-67 (e) und XIAP (f).

Bis auf BMPR-IB war keiner der Kandidatenmarker signifikant mit IAP-2 korreliert (Tabelle 16).

Marker	alle Tumoren	ER+ Tumoren	ER- Tumoren
BMPR-IB	p < 0,05*	p = 0,395	p = 0,549
Dermcidin	p = 0,349	p = 0,449	p = 0,574
14-3-3 zeta	p = 0,256	p = 0,200	p = 0,528
Tab-2	p = 0,430	p = 0,767	p = 0,462
SLBP	p = 0,797	p = 0,958	p = 0,431
Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin	p = 0,448	p = 0,490	p = 0,632

Tabelle 16: Korrelation der Markerexpression mit IAP-2

3.1.6 Auswertung des Prognosearrays

Der Beobachtungszeitraum betrug im Mittel 31,70 Monate (Minimum 1, Maximum 76 Monate).

60% der Tumoren hatten einen negativen ER-Status, 40% waren ER-positiv.

3.1.6.1 Korrelation der Markerexpression mit T-, N- und M-Stadium

Keiner der Marker war mit dem T-Stadium (Tumorgroße) oder dem M-Stadium (Vorliegen von Fernmetastasen) signifikant assoziiert.

Allein für das N-Stadium (Lymphknotenstatus) ließ sich eine allgemeine Korrelation mit BMPR-IB aufzeigen (p=0,019), die jedoch bei Unterscheidung zwischen ER-positiven und ER-negativen Karzinomen ihre Signifikanz verlor (p=0,086 bzw. p=0,071).

3.1.6.2 Überlebensfunktionen in Abhängigkeit von der Expression der Kandidatengene

Da für die Kandidatenmarker Tab-2 und SLBP wie oben beschrieben keine signifikanten Korrelationen zum Östrogenrezeptorstatus, zum Tumorgrade, zur zytogenetischen Instabilität und zur pro-proliferativen und anti-apoptischen Aktivität gezeigt werden konnten, wurde für diese beiden Marker auf eine Erhebung der Ergebnisse des prognostischen Arrays verzichtet.

3.1.6.2.1 Überlebensfunktionen für BMPR-IB

Die statistische Evaluation der Überlebensfunktion mit dem log rank Test zeigte einen signifikanten Unterschied in der Kaplan-Meier Analyse ($p=0,001$).

Patientinnen, bei denen eine starke, membrangebundene Expression von BMPR-IB der Tumorzellen nachgewiesen wurde (IHC-Score=2, $n=25$), zeichneten sich durch ein signifikant schlechteres Überleben (29% 5-Jahres-Überleben, $p=0,0017$ im log-rank-Test) aus als Patienten, deren Karzinome eine schwache, partiell zytoplasmatische oder gar keine Expression von BMPR-IB (IHC-Score<2, $n=132$) aufwiesen (Tabelle 17, Abbildung 8).

Im multivariaten Cox-Regression-Test, der die Tumorgröße, den Status der regionären Lymphknoten, die ER-Expression und die Kandidatengene berücksichtigt, hatte BMPR-IB im Gegensatz zu den anderen beiden Markern einen zusätzlichen prognostischen Wert ($p=0,010$).

BMPR-IB IHC-Score	n	Überlebenszeit (Monate)	Standartabweichung (Monate)	Median (Monate)	5-Jahres Überlebensquote (Prozent)
<2	97	59,9	3,1	76,0	66
=2	17	38,7	6,9	23,0	29

Tabelle 17: Überlebenszeiten und -quoten in Abhängigkeit von BMPR-IB

Überlebensfunktionen in Abhängigkeit vom BMPR-IB - Expressionsgrad

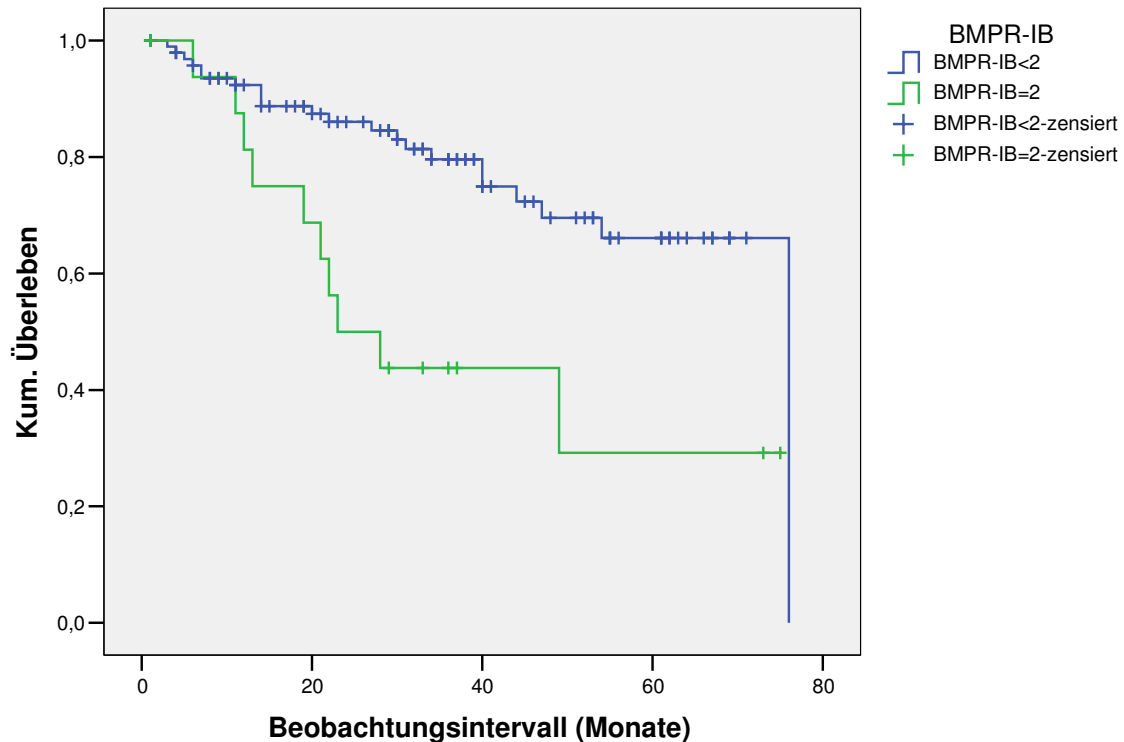


Abbildung 8: Überlebenszeit in Abhängigkeit von BMPR-IB

3.1.6.2.2 Überlebensfunktionen für Dermcidin

Für Dermcidin ergab sich kein signifikanter Einfluss des Expressionsgrades auf das Gesamtüberleben (resp. die mittlere Überlebenszeit und 5-Jahres-Überlebensquote) (log rank $p=0,68$).

3.1.6.2.3 Überlebensfunktionen für 14-3-3 zeta

Auch für den Marker 14-3-3 zeta konnte keine signifikante Beeinflussung des Gesamtüberlebens gefunden werden (log rank $p=0,13$).

3.1.6.3 Einfluss der Markerexpression auf das Auftreten von Rezidiven und Fernmetastasen

Die Analyse mit dem Log-Rank-Test nach Kaplan-Meier zeigte nur für BMPR-IB einen hochsignifikanten Unterschied für die Markerexpression und das Rezidivintervall:

Tumoren mit starker Expression von BMPR-IB bildeten häufiger und früher ein Rezidiv aus als solche, die BMPR-IB nicht oder nur schwach exprimierten ($p < 0,001$) (Tabelle 18, Abbildung 9).

BMPR-IB IHC-Score	n	rezidivfreie Zeit (Monate)	Standart- abweichung (Monate)	Median (Monate)	Rezidiv aufgetreten (Prozent)
<2	95	59,7	3,2	76,0	22,1
=2	17	36,8	7,6	23,0	58,8

**Tabelle 18: Rezidivquote und rezidivfreie Zeit in Abhängigkeit von der
BMPR-IB- Expression**

Länge des rezidivfreien Intervalls in Abhängigkeit von BMPR-IB

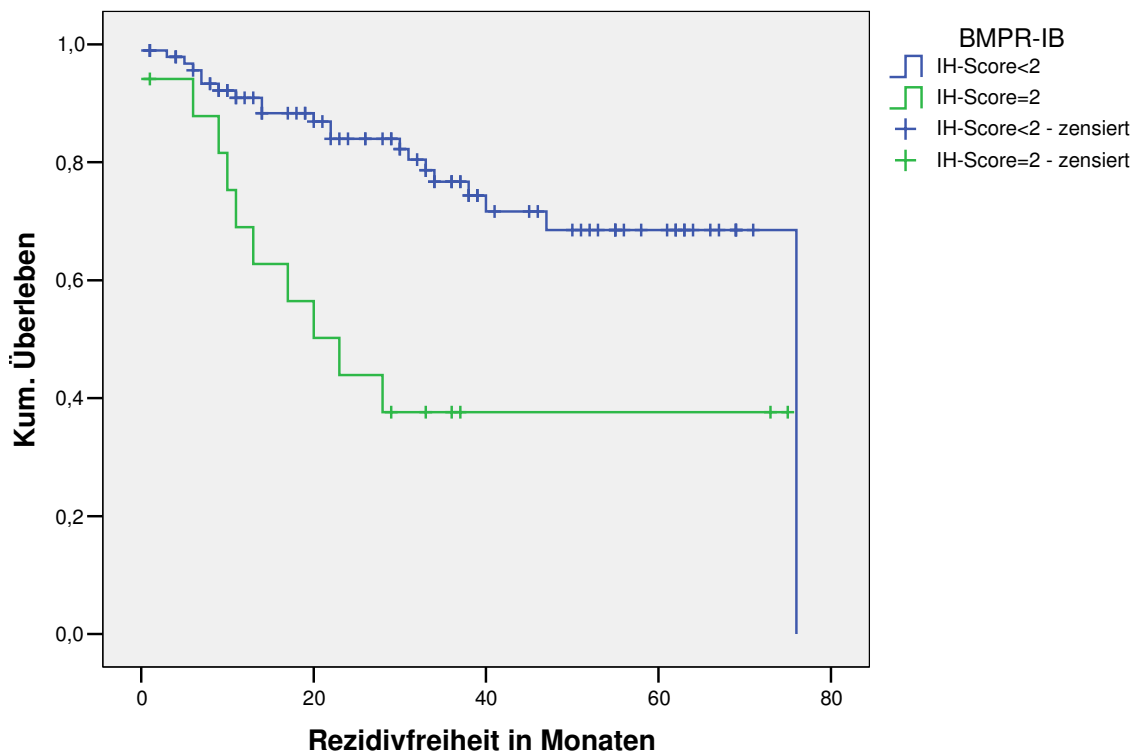


Abbildung 9: Rezidivfreie Zeit in Abhängigkeit von der BMPR-IB-Expression

Zudem ließ sich ein hochsignifikanter Einfluss der BMPR-IB Expression auf die Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen aufzeigen:

Im untersuchten Kollektiv traten bei Patientinnen, deren Tumor BMPR-IB stark exprimierte, Fernmetastasen hochsignifikant früher und häufiger auf (log rank $p < 0,001$; Tabelle 19, Abbildung 10).

BMPR-IB IHC-Score	n	fernmetastasenfreie Zeit (Monate)	Standartabweichung (Monate)	Median (Monate)	Fernmetastase (Prozent)
<2	97	59,1	3,3	76,0	22,7
=2	18	33,0	7,7	19,0	61,1

Tabelle 19: Fernmetastasenquote und fernmetastasenfreie Zeit in Abhängigkeit von der BMPR-IB- Expression

Auftreten von Fernmetastasen in Abhängigkeit von Bmpr-IB

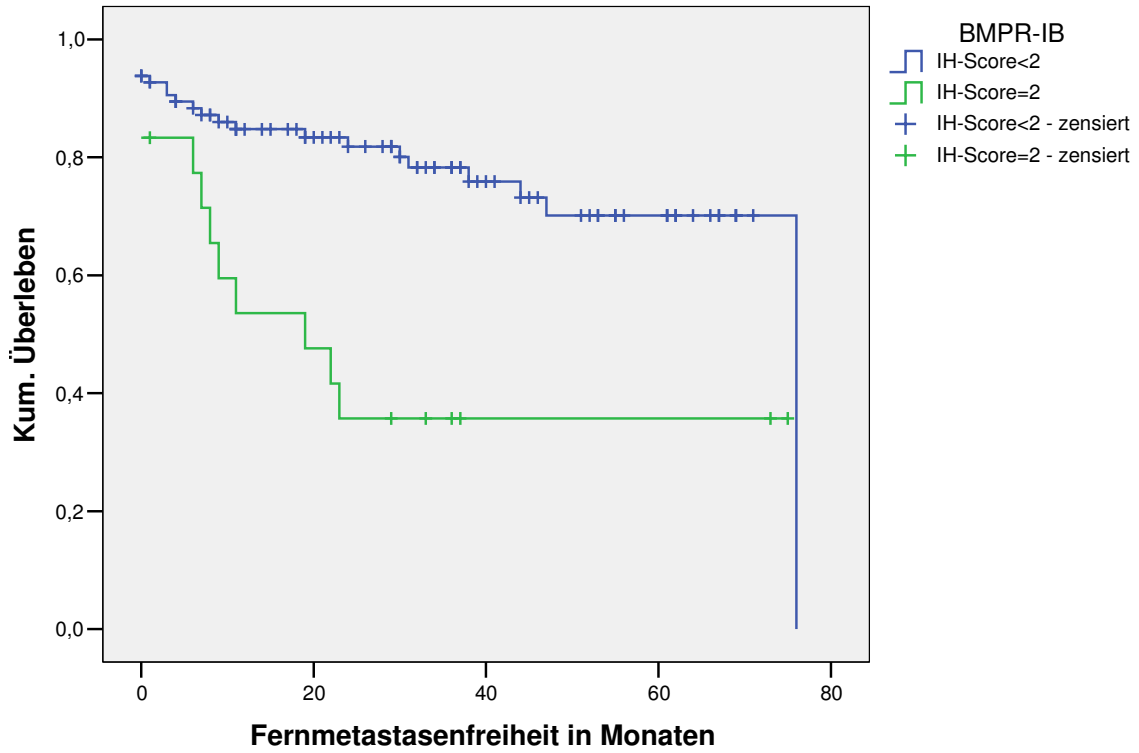


Abbildung 10: Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen in Abhängigkeit von der Bmpr-IB-Expression

4. Diskussion

Wie bei anderen Tumorerkrankungen auch, ist es bei der Behandlung von Mammakarzinomen das Ziel, das Ausmaß der Erkrankung zu kennen, bevor ein suffizientes Therapiekonzept erarbeitet werden kann.

Die klassischen prognostischen Parameter, wie die Größe und Art des Primärtumors, seine Lokalisation sowie die Ausbreitung von Tumorzellen im Organismus sind hierbei ausschlaggebend. Erhoben werden diese Variablen durch klinische (Inspektion, Palpation), bildgebende (Mammographie, Sonographie) und pathohistologische (lichtmikroskopische Untersuchung des bei der Probeexzision gewonnenen Gewebes) Verfahren.

Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie und -genetik ist es jedoch zunehmend möglich geworden, die Aussagen zur Aggressivität, Progression und Prognose der Erkrankung durch den Nachweis bestimmter Merkmale des individuellen Tumors zu präzisieren. So gilt die Expression des Östrogenrezeptors bei invasiven Mammakarzinomen im Allgemeinen als Zeichen einer höheren Tumordifferenzierung und geht mit einer vergleichsweise guten Prognose einher. Es existieren jedoch auch östrogenrezeptorpositive, schlecht differenzierte Karzinome mit schlechter Prognose. Vor kurzer Zeit wurde erstmalig eine Untergruppe von schlecht differenzierten, östrogenrezeptorpositiven, invasiv duktalem Grad 3-Karzinomen beschrieben, deren Hauptmerkmal Zugewinne am kurzen Arm des Chromosoms 7 sind. Bisher ist nicht klar, ob diese Zugewinne an genetischem Material die Ursache oder aber die Folge einer Progression der Tumorerkrankung sind [71].

Deshalb wurden in einer vorausgegangenen Untersuchung ER-positive invasiv duktalem Karzinome vom Grad 2 und 3, die sich hinsichtlich der Anzahl genetischer Alterationen und der proliferativen Aktivität deutlich unterschieden, jedoch gleichzeitig sehr ähnliche immunohistochemische Färbemuster (PR, c-erbB2, EGFR, p53, Ck 5, Ck 8/18 positiv) aufwiesen, mittels Subtraktiver Suppressions Hybridisierung (SSH) auf ihre unterschiedliche Genexpression untersucht.

Die Analyse der Genexpression ergab fast 277 Gene, die zwischen den beiden Tumorgruppen (Grad 2 und 3) unterschiedlich exprimiert wurden. Abhängig von der bekannten Funktion und der jeweiligen Datenverfügbarkeit und nach Durchführung einer RT-PCR zur Quantifizierung der relativen Expression verblieben jedoch nur fünf Gene, die als Kandidatengene mit einer Bedeutung für die Tumorprogression in Frage kamen.

Für die fünf Gene BMPR-IB, Dermcidin, 14-3-3 zeta, Tab-2 und SLBP wurde im Rahmen dieser Arbeit eine immunhistochemische Verifizierung unter Verwendung der Tissue-Microarray-Technologie durchgeführt.

Die Validierung solcher Marker und ihrer Relevanz für die Tumorgenese und Progression war bislang logistisch und ökonomisch sehr aufwändig.

Durch das 1998 von *Kononen et al.* eingeführte und im Rahmen dieser Arbeit angewendete Tissue-Microarray-Verfahren [69] wird das Screening dieser molekularen Marker jedoch deutlich erleichtert.

Da die Gewebeproben eines Gewebemikroarrays jeweils nur einen kleinen Ausschnitt des jeweiligen Tumors darstellen, wurden bei Einführung der Technik Zweifel an der Validität des Verfahrens geäußert [17, 60]. So wurde gegen die Technik eingewandt, dass sie, insbesondere bei Untersuchung von Tumoren mit heterogener Morphologie, das untersuchte Gewebe auf eine dünne Gewebescheibe mit einem Durchmesser von 0,6 mm reduziere, die hinsichtlich ihrer Proteinexpression nicht mehr repräsentativ für den Ursprungstumor sei. Zahlreiche Autoren wie *Schraml et al.* (1999), *Kononen et al.* (1998), *Gillet* (2000), *Torhorst* (2001) und *Moch et al.* (2001) haben dem Verfahren jedoch übereinstimmend eine hohe Konkordanz mit der herkömmlichen Gewebeanalyse nachgewiesen und die Technologie somit für die Erforschung unterschiedlicher Tumorentitäten validiert [116, 69, 44, 125, 89]. *Camp et al.* fand heraus, dass zwei Biopsien pro Tumor die Antigenexpression des zugehörigen kompletten Gewebeschnittes in mehr als 95% der Fälle adäquat repräsentieren können. Zusätzlich konnte er zeigen, dass die meisten Proteine in archivierten formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben ihre Antigenität über bis zu 70 Jahre behalten hatten, und stützte so die Validität von retrospektiven Studien an archiviertem

Biopsiematerial [21]. Im Hinblick auf einen zu fordernden Mindestdurchmesser der Gewebesspots verglich *Skacel et al.* zwei TMAs mit jeweils unterschiedlichen Biopsiedurchmessern und -anzahlen von 25 Mammakarzinomen, die er auf die Expression von ER und PR sowie auf die Amplifikation von Her-2/neu untersuchte. Er zeigte, dass ein Biopsiedurchmesser von 0,6 mm adäquat ist, um die Expression und Amplifikation der untersuchten Marker wiederzugeben, jedoch das erhöhte Risiko eines Core-Verlustes während der Aufarbeitung birgt [119].

Insgesamt geben die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse Hinweise darauf, dass insbesondere dem Kandidatengen BMPR-IB eine Schlüsselrolle in der Entdifferenzierung der oben genannten Subgruppe von ER-positiven Mammakarzinomen mit schlechter Prognose zukommt, da eine Überexpression des Proteins bei ER-positiven Karzinomen signifikant mit unterschiedlichen Aspekten der Tumorprogression, wie dem Tumorgrad oder der Anzahl zytogenetischer Alterationen und der schlechten Prognose dieser Tumoren korreliert ist. Hinweise auf die Bedeutung des aktivierten BMPR-Signalweges auf klinischer Ebene ergeben sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Überlebensfunktionen in Abhängigkeit von der BMPR-IB-Expression: Patientinnen, deren Tumoren BMPR-IB stark exprimierten, hatten ein signifikant schlechteres Überleben als solche, deren Tumoren eine schwache oder keine Expression zeigten ($p=0,0017$).

Auf die Bedeutung der BMP-vermittelten Signaltransduktion in unterschiedlichen Tumorentitäten ist in der Literatur bereits vielfach hingewiesen worden. Während für bestimmte Tumorentitäten die Apoptoseinduzierung durch BMPs beschrieben wird [65, 57], wird ihr bei anderen Tumorarten eine Rolle für ein erhöhtes Metastasierungspotential zugeschrieben [4, 68]. *Kim et al.* untersuchte mittels Western Blot und immunhistochemischer Analysen 10 benigne und 40 maligne menschliche Prostatagewebeproben, um das fehlende Ansprechen auf BMP bei menschlichen Prostatakarzinomzellen zu erklären. Er fand heraus, dass Prostatakarzinome in der Tumorprogression die BMPR-Expression verlieren, während gutartiges Prostatagewebe und Gewebe von gut differenzierten

Prostatakarzinomen eine positive Expression von BMPR-II, BMPR-IA und BMPR-IB zeigt.

Die Gruppe folgerte daraus, dass BMPR eine wichtige Rolle in der Progression des Prostatakarzinoms spielen [68]. Zusammenfassend schloss sie aus ihren Ergebnissen, dass BMPs wachstumshemmende Faktoren sind, gegen die einige Prostatakarzinomzellen durch Herunterregulierung der Rezeptorexpression Resistenzen entwickeln. Der häufige Verlust der BMPR-Expression in Prostatakarzinomen von hohem Tumorgrad bietet zudem einen Erklärungsansatz für die häufig auftretenden Knochenmetastasen in diesem Tumortyp: Die relativ hohen BMP-Konzentrationen in normalem Knochengewebe unterdrücken die Proliferation von Prostatakarzinomzellen, die den BMP-Rezeptor exprimieren, während BMPR-negative Karzinomzellen im Knochen proliferieren können.

Unsere Ergebnisse stehen in Kontrast zu denen von *Kim et al.* [68]. Die Aktivität von BMPR-IB scheint in unseren Untersuchungen insbesondere durch einen Anstieg der Tumorzellproliferation und die Induktion von Proteinen mit antiapoptischen Qualitäten/Fähigkeiten vermittelt zu sein. Andererseits ist jedoch auch für andere Tumorentitäten eine vermehrte Expression von BMPR-IB beschrieben worden. So untersuchte *Yamada et al.* mittels immunhistochemischer Methoden die Expression von BMP-Rezeptoren Typ I bei 16 Gliomen und verglich sie mit der Expression bei fünf Fällen von nicht-tumorösem Gliosisgewebe. Er fand eine signifikante Steigerung von BMPR-IB bei malignen Gliomen als Hinweis auf eine Bedeutung des BMP-Signalweges bei dieser Tumorart [138]. Auf die Bedeutung des BMP-Signalweges in der Pathogenese des Ovarial- und Mammakarzinoms wurde bereits von *Shepherd* und *Nachtigal* und *Clement* und *Raida* hingewiesen.

Shepherd und *Nachtigal* beschrieben die Existenz und mögliche Funktion einer autokrinen BMP-Signaltransduktion in normalem Ovarialepithel und in Ovarialkarzinomen. Sie konnten eine erhöhte Expression der Zielgene von BMP, ID1 und ID3, nachweisen und sahen darin eine Möglichkeit der Früherkennung und Therapie von Ovarialkarzinomen [117].

Von einer gesteigerten Expression dieser Zielgene ID1, ID2 und ID3 in bestimmten Brustkrebszelllinien berichteten die Arbeitsgruppen um *Clement* und *Raida*. Sie schlossen auf einen auto- oder parakrinen Mechanismus unter Beteiligung von BMP-2/4 [25, 106].

Unsere Ergebnisse decken sich mit ihren Hypothesen und weiteren Berichten in der Literatur, dass dieser Signaltransduktionsweg in verschiedenen Geweben und Tumorarten mit unterschiedlichen Expressionsmustern seiner Komponenten einhergeht. Da Mammakarzinome häufig in den Knochen metastasieren, liegt es nahe, dass zumindest einige dieser Karzinome Proteine exprimieren, die diese Tatsache erleichtern. Die Arbeitsgruppe um *Arnold* untersuchte die hochgradig metastasierende Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 und eine weniger stark metastasierende Zelllinie MCF-7 auf ihren Gehalt an Bone Morphogenetic Proteins. Sie fand bei beiden Zelllinien mRNA für die BMPs 2 und 3 und die BMP-Rezeptoren IA, IB und II. In der Zelllinie mit höherem Metastasierungspotential wurde BMP2 stärker exprimiert [2]. Unsere Ergebnisse stützen somit diese Hinweise bezüglich eines Einflusses der Expression von Komponenten des BMP-Signalweges auf das Metastasierungspotential:

Die Analyse der Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen im von uns untersuchten Kollektiv ergab einen signifikanten Einfluss der Überexpression von BMPR-IB auf die Häufigkeit von Fernmetastasen und die Zeit bis zu ihrem Auftreten. Patientinnen, deren Tumor BMPR-IB stark exprimierte, metastasierten hochsignifikant früher und häufiger. Zudem korrelierte die Expression von BMPR-IB im Gegensatz zu den übrigen Markern signifikant mit dem regionären Lymphknotenstatus.

Zusammenfassend bieten unsere Ergebnisse zwei Erklärungen für die Korrelation der starken Expression von BMPR-IB mit der schlechten Prognose der Karzinome: pro-proliferative und anti-apoptotische Effekte der Überexpression von BMPR-IB bei ER-positiven Karzinomen.

Die SMAD-Proteine repräsentieren das verbindende und balancierende Glied zwischen dem wachstumshemmenden TGF- β Rezeptor und den wachstumsfördernden BMPR-Wegen. Die Aktivierung des BMPR-Pathways

könnte zum Überwiegen pro-proliferativer Faktoren führen. *Gobbi et al.* hat diesbezüglich bereits 1999 berichtet, dass das Risiko für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms bei Patientinnen mit epithelialen Hyperplasien ohne Atypien erhöht ist (Odds Ratio 1,98-3,41), wenn die epithelialen Zellen der Läsion eine verminderte oder fehlende Expression des TGF- β RII aufweisen. Ein Verlust der Expression von TGF- β RII war korreliert mit einem aggressiveren Phänotyp von in-situ und invasiven Karzinomen [45, 46]. Theoretisch wäre es demnach sogar möglich, dass durch eine Überexpression von BMPR-IB das Tumorstadium in einer Subgruppe von ER-positiven Karzinomen mit einem Verlust des TGF- β Rezeptors kombiniert ist. Ein gleicher Effekt wäre bei einer Inhibition der TGF- β Signalübertragung, z.B. durch das von *Zhang et al.* beschriebene Protein SnoN (Ski-related novel protein N), bei ER-positiven Karzinomen denkbar [143].

Kretschmar et al. wies darauf hin, dass SMAD 1, das die Transduktion von BMP-Signalen vermittelt, neben BMP auch von anderen mitogenen Wachstumsfaktoren durch EGF (epidermal growth factor) und hepatocyte growth factor receptor protein tyrosine kinases (RTKs) angesprochen wird. Im Gegensatz zur von BMP stimulierten Signalübertragung, welche eine Akkumulation von SMAD 1 im Zellkern induziert, wird diese Akkumulation durch die Erk-vermittelte Phosphorylierung der SMAD jedoch verhindert. Auf SMAD 1 konvergieren also regulatorische Signale, die durch RTKs (receptor protein *thyrosin* kinases) und RS/TKs (receptor protein *serine/threonine* kinases) vermittelt werden, und diese Balance bestimmt das Level der SMAD 1-Aktivität im Zellkern [73].

Da ER-positive Karzinome jedoch in der Regel EGFR-negativ sind und auch die in dieser Arbeit auf ihre differenzielle Genexpression untersuchten sechs Karzinome EGFR-negativ waren, liegt dieser Mechanismus im Fall der Subgruppe ER-positiver Karzinome mit schlechter Prognose nicht vor.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivität von BMPR-IB insbesondere durch einen Anstieg der Tumorzellproliferation und der Induktion von Proteinen mit anti-apoptischen Qualitäten vermittelt ist, was sich in der signifikanten positiven Korrelation einer starken Expression von BMPR-IB mit

Ki-67 ($p < 0,001$) und XIAP ($p < 0,001$) widerspiegelte. Tumoren mit fehlender oder schwacher Expression von BMPR-IB exprimierten im Gegensatz dazu in unserem Kollektiv wenig Ki-67 und XIAP.

Diesen anti-apoptotischen Effekt der Aktivierung von BMPR hat auch *Yamaguchi et al.* beschrieben. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass XIAP direkt an BMPR und dessen nachgeschaltetes Signalmolekül TAB1, einen Aktivator von TAK1 aus der Familie der MAP Kinase Kinase Kinasen bindet. XIAP ist scheinbar ein Teil des BMP-Signaltransduktionsweges als positiver Regulator und Bindeglied zwischen BMP-Rezeptoren und TAB1-TAK1 [139]. Im Detail sind jedoch die Mechanismen, die die Expression von BMPR-IB bestimmen zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt, und die Kenntnisse über die Transkription des Proteins spärlich.

Auch wenn die Verbindung zwischen BMPR-IB Expression und zytogenetischer Instabilität unklar bleibt, stützen unsere Ergebnisse jedoch frühere Studien von *Paez-Pereda* (2003) [100] und *Yamamoto* (2002) [141], die besagen, dass BMP direkt mit der ER-Expression verbunden ist oder sogar von einem intakten ER-Signalling kontrolliert wird.

Die hormonelle Beeinflussung der BMP-Signaltransduktion wurde auch von der Arbeitsgruppe um *Idé* beschrieben, die für Prostatagewebe Zusammenhänge der Expression von BMPR-IB mit dem Androgenspiegel fanden [61].

Bei Androgenentzug war der Expressionsgrad von BMPR-IB signifikant erniedrigt, ebenso bei Prostatakrebszelllinien.

Bei der androgensensitiven Prostatakarzinomzelllinie LNCaP induzierte Androgen jedoch die Bildung von BMPR-IB mRNA, nicht jedoch die Expression von BMPR-IA und BMPR-II.

Bei Zugabe von rekombinantem BMP-2 wurde in Anwesenheit von Androgen das Zellwachstum inhibiert, während die Wachstumsrate in Abwesenheit von Androgen durch denselben Liganden gesteigert wurde. In Abwesenheit von Androgen war die Menge an BMPR-IB mRNA signifikant reduziert.

Nur die Expression von BMPR-IB wurde also durch Androgen reguliert. BMPR-IA und -IB schienen also unter dem Einfluss von Bone Morphogenetic Protein

das Wachstum von Prostatakarzinomzellen unter verschiedenen hormonellen Konditionen unterschiedlich zu modulieren.

Auch bei unseren Untersuchungen fand sich eine Korrelation der BMPR-IB Expression mit dem Östrogenrezeptorstatus ($p=0,029$). Zudem war die signifikante Assoziation zwischen dem BMPR-IB Expressionsgrad und der Anzahl genetischer Alterationen als Ausdruck der zytogenetischen Instabilität der Tumoren ausschließlich bei östrogenrezeptorpositiven Karzinomen zu finden. Dementsprechend ist also auch für Mammakarzinome eine Modulation der von BMP vermittelten Signaltransduktion durch hormonelle Einflüsse denkbar.

Unsere Ergebnisse zu dem Peptid Dermcidin stützen die Berichte von *Porter* und zeigen zudem eine Assoziation von Dermcidin mit BMPR-IB auf:

Dermcidin, erstmalig 2001 von *Schittek et al.* als antimikrobielles Peptid beschrieben [113], wurde 2003 von *Porter et al.* als onkogener Wachstumsfaktor bei Mammakarzinomen bezeichnet [105].

Letztere untersuchte die Genexpressionsmuster von 600 Gewebeproben von normalem Brustdrüsenepithel, in situ Karzinomen, invasiven und metastasierten Karzinomen mittels serieller Genexpressionsanalyse (SAGE). Sie fand ein SAGE-tag, das nur bei invasiven Karzinomen und ihren Lymphknotenmetastasen, nicht jedoch in frühen Tumorstadien vorlag und welches zu Dermcidin korrespondierte [105]. Mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und immun-histochemischer Analysen stellte sie fest, dass Dermcidin in etwa 10% der invasiven Karzinome überexprimiert wird, während es in normalem Brustdrüsengewebe nicht vorkommt. In einigen Fällen war die Überexpression an eine Genamplifikation seines Genlokus 12q13.1 gekoppelt. In ihrer statistischen Analyse der Überlebensdaten waren Dermcidin-positive Brusttumoren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von fortgeschrittenem klinischem Stadium. Die Expression korrelierte mit dem T-Stadium, dem Auftreten von Fernmetastasen, einem niedrigeren Gesamt- und einem reduzierten fernmetastasenfreien Überleben. In weitergehenden Experimenten zeigte die Gruppe, dass die Expression von Dermcidin in Brustdrüsenzellen das

Zellwachstum insbesondere in reduziertem Medium beschleunigte und das Überleben der Zellen verlängerte, indem es diese resistenter gegen oxidativen Stress und Glukoseentzug machte.

Auch entdeckte die Gruppe mutmaßliche Rezeptoren für Dermcidin mit hoher und niedriger Affinität auf der Zelloberfläche von Mammakarzinomzellen und Neuronen im Hirngewebe, was sie als Hinweis für einen auto- oder parakrinen Mechanismus der Dermcidin-Aktivität interpretierten. Aus ihren Ergebnissen schloss die Gruppe, dass Dermcidin bei einem Teil der Karzinome eine Rolle als Wachstums- und Überlebensfaktor in der Tumorgenese spielt, indem es das Zellwachstum beschleunigt und anti-apoptotisch wirkt. Zudem schien Dermcidin zur tumorassoziierten Kachexie beizutragen, da sich der sogenannte "cachexia-and-proteolysis-inducing factor" von ihm abzuleiten scheint.

Die von *Porter* beschriebenen Korrelationen der Dermcidin-Expression mit dem T-Stadium, dem Auftreten von Fernmetastasen, einem niedrigeren Gesamt- und einem reduzierten fernmetastasenfreien Überleben wurden durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt. Die Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus war jedoch signifikant, mit dem Tumorgrade zeigte sich zumindest eine Tendenz zu statistischer Signifikanz. Auffällig war in unseren Analysen die stark signifikante Korrelation der Markerexpression mit der Anzahl genetischer Alterationen für ER-positive Karzinome, die noch deutlicher war, wenn die Tumoren gleichzeitig BMPR-IB exprimierten. Ebenso verstärkte sich die gefundene signifikante Korrelation mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 bei einer Co-Expression von Dermcidin und BMPR-IB. Diese Korrelation war dann auch für ER-positive Karzinome signifikant.

Hinweise auf eine Bedeutung von Dermcidin insbesondere für die Progression des Mammakarzinoms fand auch die Arbeitsgruppe um *Carlsson*. Sie untersuchte 2005 die Unterschiede der Genexpressionsmuster zwischen DCIS und invasiven und metastasierenden Brusttumoren ebenfalls mittels SAGE. Sie konnte nachweisen, dass Dermcidin neben anderen Genen wie HIN-1 und S100A7 (Psoriasisin) zwischen den beiden Tumorentitäten unterschiedlich stark exprimiert wurde [22].

Jedoch scheint das Peptid auch in anderen Tumorentitäten von Bedeutung zu sein. So untersuchte *Lowrie et al.* 2006 die Expression von Dermcidin in Leberzellen und kam zu dem Schluss, dass es auch in Leberzellen als Onkogen wirken könne [81].

Das genaue Zusammenspiel von Dermcidin und BMPR-IB und die Rolle von Dermcidin in der Progression des Mammakarzinoms bleiben jedoch unklar und erfordern zukünftige Forschungen.

Unsere Ergebnisse lassen aber bereits darauf schließen, dass Dermcidin als potenzielles Ziel therapeutischer Interventionen bei Mammakarzinomen genutzt werden könnte. So könnte eine Blockierung der von *Porter et al.* [105] gefundenen Dermcidinrezeptoren bei invasiven Mammakarzinomen eine Verlangsamung des Tumorwachstums bewirken.

Bezüglich des Kandidatengenes 14-3-3 zeta decken sich unsere Ergebnisse mit den Berichten in der Literatur. Unter anderem konnten die Arbeitsgruppen um *Jang* [62] (2004, Magenkarzinom), *Diamond* [31] (2003, Lymphom), *Wang* [132] (2003, Kolonkarzinom), *Arora* [3] (2004, Mundhöhlenkarzinom) und *Wulfkuhle* [137] (2002, DCIS) nachweisen, dass 14-3-3 zeta in unterschiedlichsten Tumorentitäten des Menschen hochreguliert ist, was dafür spricht, dass das Molekül eher an der Progression als an der Entstehung des Tumors beteiligt ist.

Auch in unserem Kollektiv wurde 14-3-3 zeta von einem Großteil der Tumoren exprimiert, bei 27,3% sogar sehr stark. Die Korrelationen der Expression mit dem Tumorgrade und dem Grad an zytogenetischer Instabilität waren zwar fast signifikant ($p=0,059$ bzw. $p=0,053$), spiegeln jedoch wahrscheinlich eher die Teilnahme des Proteins an einer Vielzahl von metabolischen Prozessen im stark proliferierenden Tumorgewebe mit resultierenden hemmenden Effekten auf die Progression des Zellzyklus und auf die Apoptose wider, als dass ihnen eine spezifische Rolle in der Progression zukommt. Dies spiegelt sich auch in der hochsignifikanten Korrelation mit Ki-67 ($p<0,001$) und XIAP ($p=0,001$) und insbesondere mit XIAP bei ER-positiven Karzinomen ($p<0,001$) wider. Die ebenfalls hochsignifikante Korrelation mit XIAP bei ER-positiven Karzinomen könnte als ein Hinweis auf einen aktivierten Signaltransduktionsweg unter Beteiligung von BMPR-IB und XIAP interpretiert

werden, da der Gruppe der 14-3-3 Proteine bei der Signaltransduktion eine Rolle als stimulierende oder inhibierende Faktoren zugesprochen wird.

Für das Protein Tab-2 ließen sich in unseren Analysen keine Korrelationen aufzeigen. Eine relevante Rolle in der Progression des Mammakarzinoms ist unwahrscheinlich. In der Literatur finden sich ebenfalls keine Hinweise.

Ebenso sind in der Literatur keine Angaben zu einer Bedeutung von SLBP bei malignen Tumoren zu finden. Auch unsere Ergebnisse liefern keine Hinweise darauf, dass dem Protein eine Rolle in der Entstehung oder Progression des Mammakarzinoms zukommt. Es konnten keine Korrelationen der Expression des Proteins mit dem Tumorgrade oder dem Grad an zytogenetischer Instabilität oder ein Einfluss des Expressionsgrades auf die Gesamtüberlebenszeit aufgezeigt werden. Die Korrelation der SLBP-Expression mit der Expression von Ki-67 war in unseren Analysen zwar signifikant ($p=0,003$), spiegelt jedoch wahrscheinlich lediglich die Funktion des Proteins im Zellzyklus der Wachstumsfraktion des Tumorgewebes wider.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen dieser Arbeit Hinweise auf ein besonderes Genexpressionsmuster in der Progression einer Subgruppe ER-positiver invasiv duktaler Mammakarzinome gewonnenen wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die morphologische und klinische Tumorprogression mit einer gesteigerten Zellproliferation, einer Zunahme der zytogenetischen Instabilität und einer Verschlechterung der Prognose verbunden ist, wobei dem BMP/SMAD-Signaltransduktionsweg eine zentrale Rolle bei der Progression östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinome zuzukommen scheint.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse können vielleicht zukünftig neue therapeutische Angriffspunkte für gezielt patientenorientierte Behandlungsmaßnahmen definiert werden, insbesondere für ER-positive Mammakarzinome im fortgeschrittenen Stadium.

Erste Ansätze für eine Übertragung der Erkenntnisse über die Bedeutung des BMP-Signaltransduktionsweges in der Progression verschiedener Tumorentitäten in die therapeutische Praxis sind bereits entwickelt worden [124].

Da alle in der Arbeit untersuchten Kandidatengene nicht auf Chromosom 7p lokalisiert sind, scheinen die von *Korsching et al.* genannten 7p-Zugewinne eher die Folge als die Ursache der Tumorentdifferenzierung zu sein und mit der Expression der Kandidatengene in keinem ursächlichen Zusammenhang zu stehen.

6. Literaturverzeichnis

1. Allred DC, Mohsin SK (2000) Biological features of premalignant disease in the human breast. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(4): 351-364
2. Arnold SF, Tims E, Mcgrath BE (1999) Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2. *Cytokine* 11(12): 1031-1037
3. Arora S, Matta A, Shukla NK, Deo SVS, Ralhan R (2004) Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 42(2): 97–108
4. Autzen P, Robson CN, Bjartell A, Malcolm AJ, Johnson MI, Neal DE, Hamdy FC (1998) Bone morphogenetic protein 6 in skeletal metastases from prostate cancer and other common human malignancies. *Br J Cancer* 78(9): 1219-1223
5. Battifora H (1986) The multitumor (sausage) block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55: 244-248
6. Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA, Bender HG (1997) Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 75: 429-439
7. Beral V, Banks E, Reeves G (2002) Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet* 360: 942–944
8. Beral V, Banks E, Reeves G, Appleby P (1999) Use of HRT and the subsequent risk of cancer. *J Epidemiol Biostat* 4: 191–215
9. Bertz J, Hentschel S, Hundsdörfer G, Kaatsch P, Katalinic A, Lehnert M, Schön D, Stegmaier C, Ziegler H (2004) Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut - Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken: 48-51, 2004

- 10.** Birnbaum D, Eisinger F, Jacquemier J, Longy M, Sobol H, Theillet C (1999) Breast tumors: an overview. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Januar 1999.
Letzte Aktualisierung im Mai 2005: Carcangiu ML, Casalini P, Ménard S Breast tumors: an overview. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. May 2005, erhältlich im Internet unter:
<http://AtlasGeneticsOncology.org/Tumors/breastID5018.html>
- 11.** Black DM (1994) The genetics of breast cancer. Eur J Cancer 30A(13): 1957-1961
- 12.** Böcker W (2004) Kapitel 41: Mamma. In: Böcker, Denk, Heintz (Hrsg) Pathologie, 3. Auflage, Urban&Schwarzenberg Verlag, S 979-999
- 13.** Bodian CA (1995) Benign breast diseases, carcinoma in situ, and breast cancer risk. Epidemiol Rev 15: 177–187
- 14.** Boice JD, Land CE, Preston DL. (1996) Ionizing radiation. In: Shottenfeld D, Fraumeni JF (Hrsg) Cancer epidemiology and prevention. New York: Oxford University Press, 2. Aufl. S 319–354.
- 15.** Boyd NF, Lockwood GA, Byng JW, et al. (1998) Mammographic densities and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7: 1133–1144
- 16.** Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Mousses S, Chen Y, Mahlamaki E, Schraml P, Moch H, Willi N, Elkahouloun AG, Pretlow TG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1999) Hormone therapy failure in humane prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. J Natl Cancer Inst 91: 1758-1764
- 17.** Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. J Pathol 195: 72–79
- 18.** Bürger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, Riethdorf L, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Böcker W (1999)

- Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast - Evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 187: 396-402
- 19.** Bürger H, Otterbach F, Simon R, Schäfer K-L, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Böcker W (1999) Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* 189: 521-526
- 20.** Bürger H, Poremba C, Diallo R, Dockhorn-Dworniczak B, Böcker W (2000) Erarbeitung eines zytogenetischen und morphologischen Progressionsmodells des invasiven Mammakarzinoms. *Pathologe* 21: 375–382
- 21.** Camp RL, Charette LA, Rimm DL (2000) Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 80(12): 1943-1949
- 22.** Carlsson H, Petersson S, Enerback C (2005) Cluster analysis of S100 gene expression and genes correlating to psoriasin (S100A7) expression at different stages of breast cancer development. *Int J Oncol* 27(6):1473-1481
- 23.** Chang-Claude J, Eby N, Becker H (1994) Die Bedeutung genetischer Faktoren für die Entstehung von Brustkrebs. *Zentralbl Gynäkol* 116: 660-669
- 24.** Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al, for the WHI Investigators (2003) Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative randomised trial. *JAMA* 289: 3243–3253
- 25.** Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Hoffken K, Wolf S (2000) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 271-279
- 26.** Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996) Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 347: 1713–1727

27. Cserni G (2002) Tumour histological grade may progress between primary and recurrent invasive mammary carcinoma. *J Clin Pathol* 55: 293–297
28. De Waard F, Baanders-van Halewijn EA, Huizinga J (1964) The bimodal age distribution of patients with mammary carcinoma : Evidence for the existence of two types of human breast cancer. *Cancer* 17: 141-151
29. Derynck R, Zhang Y, Feng XH (1998) Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 95: 737–740
30. Devilee P, Cornelisse CJ (1994) Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198: 113-130
31. Diamond DL, Zhang Y, Gaiger A, Smithgall M, Vedvick TS, Carter D (2003) Use of ProteinChip array surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) to identify thymosin beta-4, a differentially secreted protein from lymphoblastoid cell lines. *J Am Soc Mass Spectrom* 14: 760–765
32. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED & Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 6025-6030
33. Dominski Z, Marzluff WF (1999) Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* 239(1): 1-14
34. Dominski Z, Zheng LX, Sanchez R, Marzluff WF (1999) Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA. *Mol Cell Biol* 19(5): 3561-3570
35. Duffy SW, Tabar L, Fagerberg G, Gad A, Grontoft O, South MC, Day NE (1991) Breast screening, prognostic factors and survival - results from the Swedish two county study. *Br J Cancer* 64(6): 1133-1138
36. Dupont WD, Page DL (1981) Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *J Natl Cancer Inst* 312: 146-151

37. El-Ashry D, Lippman ME (1994) Molecular biology of breast carcinoma. *World J Surg* 18: 12-20
38. Ellis IO, Elston CW (1998). Tumors of the breast. In: Fletcher CDM, (Hrsg) *Diagnostic histopathology of tumors*. New York: Churchill Livingstone, S 635–689
39. Fitzgibbons PL et al. (2000) Prognostic Factors in Breast Cancer College of American Pathologists Consensus Statement 1999 *Arch Pathol Lab Med* 124: 966-978
40. Ford D, Easton DF (1995) The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 72: 805-812
41. Freedman GM, Anderson PR, Goldstein LJ, Hanlon AL, Cianfrocca ME, Millenson MM, von Mehren M, Torosian MH, Boraas MC, Nicolaou N, Patchefsky AS, Evers K (2003) Routine mammography is associated with earlier stage disease and greater eligibility for breast conservation in breast carcinoma patients age 40 years and older. *Cancer* 98(5): 918-925
42. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133(4): 1710-1715
43. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138(4): 867-873
44. Gillett CE, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM (2000) Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol* 192: 549-553
45. Gobbi H, Arteaga CL, Jensen RA, et al. (2000) Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. *Histopathology* 36: 168–177

46. Gobbi H, Dupont WD, Simpson JF, et al. (1999) Transforming growth factor- β and breast cancer risk in women with mammary epithelial hyperplasia. *J Natl Cancer Inst* 91: 2096–2101
47. Haen M. et al (2003) Interdisziplinäres Tumorzentrum Klinikum Eberhard-Karls-Universität Tübingen – Mammakarzinom - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 3., überarbeitete Auflage September 2003
48. Hakama M, Holli K, Isola J, Kallioniemi OP, Karkkainen A, Visakorpi T, Pukkala E, Saarenmaa I, Geiger U, Ikkala J, et al. (1995) Aggressiveness of screen-detected breast cancers. *Lancet* 345: 221-224
49. Hamajima N et al (2002) Alcohol, tobacco and breast cancer- collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer* 87(11): 1234-1245
50. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
51. Hanf V, Gonder U (2005) Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 123(2): 139-149
52. Hawkins CJ, Ekert PG, Uren AG, Holmgren SP, Vaux DL (1998) Anti-apoptotic potential of insect cellular and viral IAPs in mammalian cells. *Cell Death Differ* 5(7): 569-576
53. Hawkins CJ, Uren AG, Hacker G, Medcalf RL, Vaux DL (1996) Inhibition of interleukin 1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis of mammalian cells by baculovirus IAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):13786-13790
54. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465–471
55. Henson DE (1986) The histological grading of neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 112: 1091-1096

56. Henson EH, Ries L, Freedman LS, Carriaga M (1991) Relationship among outcome, stage of disease, and histological grade for 22616 cases of breast cancer. *Cancer* 68: 2142-2149
57. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Borset M, Seidel C, Waage A, Sundan A (2001) Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood* 97: 516-522
58. Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580–1594
59. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas M, Kuo D, Leung DHY, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C (2001) Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 158: 1245-1251
60. Horvath L, Henshall S (2001) The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology* 33: 125–129
61. Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, Aoki K, Osada Y, Sugimura T, Terada M (1997) Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res* 57(22): 5022-5027
62. Jang JS, Cho HY, Lee YJ, Ha WS, Kim HW (2004) The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol Res* 14(10): 491-499
63. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001) Tissue microarray technology for highthroughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 10: 657-662
64. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9: 49–61
65. Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T, Ikeda Y (2000) Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood* 96: 2005-2011

- 66.** Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15: 36–47
- 67.** Key G, Kubbutat MH, Gerdes J (1994) Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. *J Immunol Methods* 177(1-2): 113-117
- 68.** Kim IY, Lee DH, Ahn HJ, et al. (2000) Expression of bone morphogenetic protein receptors Type-IA, -IB, and -II correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Cancer Res* 60: 2840–2844
- 69.** Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847
- 70.** Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, van Diest PJ, Brandt B, Böcker W, Bürger H (2002) Cytogenetic Alterations and Cytokeratin Expression Patterns in Breast Cancer: Integrating a New Model of Breast Differentiation into Cytogenetic Pathways of Breast Carcinogenesis. *Lab Invest* 82: 1525-1533
- 71.** Korsching E, Packeisen J, Helms MW, Kersting C, Voss R, van Diest PJ, Brandt B, van der Wall E, Böcker W, Bürger H (2004) Deciphering a subgroup of breast carcinomas with putative progression of grade during carcinogenesis revealed by Comparative Genomic Hybridisation (CGH) and immunohistochemistry. *British Journal of Cancer* 90: 1422–1428
- 72.** Krainer M, Zojer N, Huber H, Mannhalter C (1995) Genetische Prädisposition für das Mammakarzinom: Übersicht über die molekulargenetischen Grundlagen einer lange bekannten epidemiologischen Beobachtung. *Geburtsh Frauenheilk* 55(7): M73-76
- 73.** Kretschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389: 618–622

- 74.** Kuefer R, Hofer MD, Gschwend JE, Rubin MA (2004) Tissue Microarrays Ein Hochdurchsatzverfahren zur Verifizierung potenzieller Biomarker. *Urologe* 43: 659-667
- 75.** Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- 76.** Layde PM, Webster LA, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL, Ory HW (1989) The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breast feeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *J Clin Epidemiol* 42(10): 963–973
- 77.** Lipworth L, Bailey LR, Trichopoulos D (2000) History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 92: 302–312
- 78.** Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG (2001) Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* 3(2): 128-133
- 79.** Liston P, Young SS, Mackenzie AE, Korneluk RG (1997) Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis* 2(5): 423-441
- 80.** Little MP, Boice JD (1999) Comparison of breast cancer incidence in the Massachusetts fluoroscopy cohort and in the Japanese atomic bomb survivors. *Radiat Res* 151: 218–224
- 81.** Lowrie AG, Wigmore SJ, Wright DJ, Waddell ID, Ross JA (2006) Dermcidin expression in hepatic cells improves survival without N-glycosylation, but requires asparagine residues. *Br J Cancer* 94(11):1663-1671
- 82.** Maas H (1994) Mammakarzinom: Epidemiologie. *Gynakologe* 27:3-6

- 83.** Massague J (1998) TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753–791
- 84.** Meek SE, Lane WS, Piwnica-Worms H (2004) Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem* 279(31): 32046-32054
- 85.** Meng Q, Gao B, Goldberg ID, Rosen EM, Fan S (2000) Stimulation of cell invasion and migration by alcohol in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273(2): 448-453
- 86.** Merseburger AS, Horstmann M, Hennenlotter J, Stenzl A, Kuczyk M (2003) Die Tissue Microarray-Technik als neues "high throughput-tool" für den Nachweis differentieller Proteinexpression. *J Urol Urogynäkol* 10(3) (Ausgabe für Deutschland): 5-8
- 87.** Million Women Study Collaborators (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. In: *The Lancet* 362: 419-427
- 88.** Millis RR, Barnes DM, Lampejo OT, Egan MK, Smith P (1998) Tumour grade does not change between primary and recurrent mammary carcinoma. *Eur J Cancer* 34(4): 548-553
- 89.** Moch H, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue Microarrays: What will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 8: 14-20
- 90.** Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154: 981-986
- 91.** Mommers EC, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijer CJ, Baak JP (1999) Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 58(2):163-169

92. Mommers ECM, Poulin N, Sangulin J, Meijer CLM, Baak JP, van Diest PJ (2001) Nuclear cytometric changes in breast carcinogenesis. *J Pathol* 193(1): 33-39
93. Mommers ECM, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijer CJ, Baak JP (1998) Expression of proliferation and apoptosis-related proteins in usual ductal hyperplasia of the breast. *Hum Pathol* 29: 1539-1545
94. Muller B, Schumperli D (1997) The U7 snRNP and the hairpin binding protein: Key players in histone mRNA metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 8(6): 567-576
95. Mulvihill JJ, Miller RW, Fraumeni JF (1977) *Genetics of human cancer*. Raven Press, New York
96. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua SA, Osborne CK, Clark GM, Allred DC (1998) Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* 90: 697-703
97. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua S, Osborne CK, Allred DC (1994) Molecular genetic studies of early breast cancer evolution. *Breast Cancer Res Treat* 32(1): 5-12
98. Olson JE, Vachon CM, Vierkant RA, Sweeney C, Limburg PJ, Cerhan JR, Sellers TA (2005) Prepregnancy exposure to cigarette smoking and subsequent risk of postmenopausal breast cancer. *Mayo Clin Proc* 80(11): 1423-1428
99. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Böcker W, Bürger H (2003) Demystified... Tissue microarray technology. *Mol Pathol* 56(4): 198-204
100. Paez-Pereda M, Giacomini D, Refojo D, et al. (2003) Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1034–1039
101. Page DL, Dupont WD (1988) Histopathologic risk factors for breast cancer in women with benign breast disease. *Semin Surg Oncol* 4(4): 213-217

- 102.** Petrakis NL (1977) Genetic factors in the etiology of breast cancer. *Cancer* 39: 2709-2715
- 103.** Pharoah PD, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BA (2002) Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 31: 33-36
- 104.** Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA (1997) Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 71(5): 800–809
- 105.** Porter D, Weremowicz S, Chin K, Seth P, Keshaviah A, Lahti-Domenici J, Bae YK, Monitto CL, Merlos-Suarez A, Chan J, Hulette CM, Richardson A, Morton CC, Marks J, Duyao M, Hruban R, Gabrielson E, Gelman R, Polyak K (2003) A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10931-10936. Epub 2003 Sep 2
- 106.** Raida M, Clement JH, Ameri K, Han C, Leek RD, Harris AL (2005) Expression of bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cells inhibits hypoxic cell death. *Int J Oncol.* 26(6): 1465-1470
- 107.** Rajakariar R, Walker RA (1995) Pathological and biological features of mammographically detected invasive breast carcinomas. *Br J Cancer* 71(1): 150-154
- 108.** Reddi AH (1997) Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 11–20
- 109.** Reuter P, Springer Lexikon Medizin, 2004
- 110.** Roylance R, Droufakou S, Gorman P, Gillett C, Hart IR, Hanby A, Tomlinson I (2003) The role of E-cadherin in low-grade ductal breast tumourigenesis. *J Pathol* 200(1): 53-58
- 111.** Roylance R, Gorman P, Harris W, Liebmann R, Barnes D, Hanby A, Sheer D (1999) Comparative Genomic Hybridization of Breast Tumors Stratified by Histological Grade Reveals New Insights into the Biological Progression of Breast Cancer. *Cancer Research* 59, 1433-1436

- 112.** Russo J, Raquel M, Balogh GA, Mailo D, Russo IH (2005) The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Research* 7: 131-142
- 113.** Schittek B, Hipfel R, Sauer B, et al. (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2(12): 1133–1137
- 114.** Schnürch HG, Lopens A, Diedrich K (1998) Mehrschrittcarzinogenese als Modell der Tumorentwicklung. *Gynäkologe* 31: 1033-1038
- 115.** Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known to the unknown [review]. *J Cell Physiol* 182(3): 311-322
- 116.** Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5: 1966-1975
- 117.** Shepherd TG, Nachtigal MW (2003) Identification of a putative autocrine bone morphogenetic protein-signaling pathway in human ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. *Endocrinology* 144(8): 3306-3314
- 118.** Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh A, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272: 1179-1182
- 119.** Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR (2002) Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 10(1): 1-6
- 120.** Statistisches Bundesamt (Hrsg.) (1998) Gesundheitsbericht für Deutschland - Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Wiesbaden
- 121.** Statistisches Bundesamt Deutschland (2007) Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2005 [Online]. Copyright: Statistisches Bundesamt Deutschland 2007, letzte Aktualisierung: 18.10.2006, erhältlich im Internet unter <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.htm>.

- 122.** Stemmermann GN (1991) The pathology of breast cancer in Japanese women compared to other ethnic groups: a review. *Breast Cancer Res Treat Suppl* 1: S 67-72
- 123.** Tabar L, Fagerberg G, Chen HH, Duffy SW, Gad A (1996) Tumour development, histology and grade of breast cancers: prognosis and progression. *Int J Cancer* 66(4): 413-419
- 124.** Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, Kajimoto T, Saitoh M, Miyazono K, Node M, Imamura T (2005) The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci* 96(11): 791-800
- 125.** Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159: 2249-2256
- 126.** Townley-Tilson WH, Pendergrass SA, Marzluff WF, Whitfield ML (2006) Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. *RNA* 12(10): 1853-1867
- 127.** Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL (1996) Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 4974-4978
- 128.** van Gils CH et al. (2005) Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. *JAMA* 293: 183-193
- 129.** Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- 130.** Viacava P, Naccarato A, Bevilacqua G (1999) Different proliferative patterns characterize different preinvasive breast lesions. *J Pathol* 188: 245-251

- 131.** Wang ZF, Whitfield ML, Ingledue TC 3rd, Dominski Z, Marzluff WF (1996) The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes Dev* 10(23): 3028-3040
- 132.** Wang WS, Chen PM, Hsiao HL, Ju SY, Su Y (2003) Overexpression of the thymosin beta-4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cells. *Oncogene* 22(21): 3297–3306
- 133.** Willard W, Borgen P, Bol R, Tiwari R, Osbourne M (1992) Cowden's disease. A case report with analyses at the molecular level. *Cancer* 69: 2969-2974
- 134.** Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principle results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288: 321-333
- 135.** Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Hoover RN, Pike MC (1996) Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5(11): 901-906
- 136.** Wu AH, Ziegler RG, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Hoover RN, Pike MC (1998) Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am J Clin Nutr.* 68 (6 Suppl): 1437-1443
- 137.** Wulfkuhle JD, Sgroi DC, Krutzsch H, McLean K, McGarvey K, Knowlton M, Chen S, Shu H, Sahin A, Kurek R, Wallwiener D, Merino MJ, Petricoin EF 3rd, Zhao Y, Steeg PS (2002) Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* 62(22): 6740–6749
- 138.** Yamada N, Kato M, ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Heldin CH, Miyazono K, Funahashi K (1996) Bone morphogenetic protein type IB receptor is progressively expressed in malignant glioma tumours. *Br J Cancer* 73: 624-629.
- 139.** Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K (1999) XIAP, a cellular

- member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J* 18(1): 179–187
- 140.** Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science* 270: 2008-2011
- 141.** Yamamoto T, Saatcioglu F, Matsuda T, Yamamoto H (2002) Crosstalk between bone morphogenic proteins and estrogen receptor signaling. *Endocrinology* 143: 2635–2642
- 142.** Zanier K, Luyten I, Crombie C, Muller B, Schumperli D, Linge JP, Nilges M, Sattler M (2002) Structure of the histone mRNA hairpin required for cell cycle regulation of histone gene expression. *RNA* 8(1): 29-46
- 143.** Zhang F, Lundin M, Ristimaki A, et al. (2003) Ski-related novel protein N (SnoN), a negative controller of transforming growth factor beta signaling, is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Cancer Res* 63: 5005–5010
- 144.** Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu W, Kolonel LN, Horn RP, Rosenthal JF et al. (1993) Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl. Cancer Inst.* 85: 1819-1827

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Horst Bürger für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine Unterstützung im Laufe der Arbeit und seine Hilfsbereitschaft bei den Korrekturen.

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

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Gerhard-Domagk-Instituts für Pathologie, die mir beim Erstellen dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Inka Buchroth und Frau Maria Wolters für die kompetente und unkomplizierte Einführung in die Theorie der Versuche und die Hilfestellung bei den immunhistochemischen Färbungen und Herrn Dr. Eberhard Korsching für die Hinweise bei der biomathematischen Analyse.

Dr. Joachim Gerß vom Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der Universität Münster danke ich für die statistische Beratung und die Hilfestellungen im Umgang mit dem statistischen Auswertungsprogramm SPSS.

8. Lebenslauf

9. Anhang

9.1 Reagenzien

9.1.1 Citratpuffer

Stammlösung A = 0,1 M Zitronensäure

10,5 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (Zitronensäuremonohydrat)

auf 500 ml Aqua dest. auffüllen

Stammlösung B = 0,1 M Natriumcitrat

29,41 g $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ (Natriumcitrat-Dihydrat)

auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen

Gebrauchslösung = 18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B mischen,

pH 6,0 einstellen

Diese Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen = 10mM

Citratpuffer

9.1.2 TRIS-Puffer (Spülpuffer bei APAAP-Methode)

Stammlösung = 36 g TRIS

274 g TRIS-HCl

351 g NaCl

auf 4000 ml mit Aqua dest. auffüllen

pH 7,4 – 7,6

Gebrauchslösung = 1:10 mit Aqua dest. Verdünnen

9.1.3 RPMI-Lösung

50 ml RPMI-1640

450 ml Aqua bidest.

50 ml Bovineserum (inaktiviert)
0,5 g Natriumazid
lösen, pH 7,4 – 7,6 täglich einstellen

9.1.4 RPMI+HuSe

1 Teil Humanserum inaktiviert
7 Teile RPMI-Lösung

9.1.5 Neofuchsin-Lösung

Stammlösung = 5 % Neofuchsinlösung in 2 N HCl
Puffer = 17,4 g NaCl
3,0 g Tris-HCl
9,8 g Tris
in 2000 ml Aqua bidest. gelöst
Propandiol = 21 g Propandiol in 1000 ml Aqua bidest. gelöst
Gebrauchslösung = a) 0,125 ml Stammlösung
0,3 ml 4 % Na-Nitrit
unter Abzug 60 sec reagieren lassen
b) 0,025 g Levamisol
44 ml Entwicklungspuffer
16 ml Propandiol
c) 0,0316 g Naphtol-AS-Bi-Phosphat
0,4 ml N,N-Dimethylformamid
Lösung a), Lösung b) und Lösung c) mischen pH mit 2 N
HCl auf 8,8 einstellen und filtrieren
Schnitte 25 min auf dem Rüttler inkubieren

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytogenetisch-morphologisches Progressionsmodell des invasiven Mammakarzinoms mit parallelen Progressionswegen nach *Bürger et al.* [20]

Abbildung 2: Anordnung der 144 Proben auf dem TMA I.1 (CGH-Array)

Abbildung 3: Anordnung der 444 Proben auf dem TMA I.2 (Prognosearray)

Abbildung 4: Assoziation der Expression von BMPR-IB mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität (gemessen als durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen)

Abbildung 5: Assoziation der Expression von Dermcidin mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität (gemessen als durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen)

Abbildung 6: Assoziation der Co-Expression von BMPR-IB und Dermcidin mit dem Grad an zytogenetischer Instabilität (gemessen als durchschnittliche Anzahl genetischer Alterationen)

Abbildung 7: Repräsentative immunhistochemische Färbemuster für BMPR-IB, Ki-67 und XIAP bei invasiven Karzinomen

Abbildung 8: Überlebenszeit in Abhängigkeit von BMPR-IB

Abbildung 9: Rezidivfreie Zeit in Abhängigkeit von der BMPR-IB-Expression

Abbildung 10: Zeit bis zum Auftreten von Fernmetastasen in Abhängigkeit von der BMPR-IB-Expression

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Mammakarzinome

Tabelle 2: Prognosefaktoren des Mammakarzinoms nach College of American Pathologists Consensus Statement 1999 [39]

Tabelle 3: Schema der Feldbezeichnung für einen Datensatz

Tabelle 4: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von BMPR-IB

Tabelle 5: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von Dermcidin

Tabelle 6: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von 14-3-3 zeta

Tabelle 7: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von Tab-2

Tabelle 8: Absolute und relative Häufigkeit der Expression von SLBP

Tabelle 9: Übersicht über die Korrelation der Expression der Kandidatengene mit dem Tumorgrade

Tabelle 10: Korrelation der Expression der Kandidatengene mit dem Grad an zyto-genetischer Instabilität

Tabelle 11: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von Ki-67 (Mib-1)

Tabelle 12: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von XIAP

Tabelle 13: Absolute und relative Häufigkeiten der Expression von IAP-2

Tabelle 14: Korrelation der Markerexpression mit Ki-67 (Mib-1)

Tabelle 15: Korrelation der Markerexpression mit XIAP

Tabelle 16: Korrelation der Markerexpression mit IAP-2

Tabelle 17: Überlebenszeiten und -quoten in Abhängigkeit von BMPR-IB

Tabelle 18: Rezidivquote und rezidivfreie Zeit in Abhängigkeit von der BMPR-IB-Expression

Tabelle 19: Fernmetastasenquote und fernmetastasenfreie Zeit in Abhängigkeit von der BMPR-IB- Expression

9.4 Abkürzungen

ADH	atypische duktale Hyperplasie
ALH	atypische lobuläre Hyperplasie
AP-1	activator protein-1
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase
BI	Beobachtungsintervall
bidest.	bidestillata
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR	bone morphogenetic protein receptor
BPBD	Benign Proliferative Breast Disease
BRCA	Breast Cancer Susceptibility Gene
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
c-erbB2	erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
CGH	Comparative Genomische Hybridisierung
Ck	Cytokeratin
DCIS	duktales Carcinoma in situ
dest.	destillata
DH	gewöhnliche duktale Hyperplasie
DNA	deoxyribonucleic acid
dt.	deutsch
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Estrogene Receptor
Erk	Extracellular-signal regulated kinase
ERK/MAP	extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated kinase
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GTPase	Guanosintriphosphatase
HE	Hämatoxilin-Eosin
Her-2/neu	Human epidermal growth factor receptor, type 2
HPF	high power field (in der Mikroskopie: ein Gesichtsfeld bei größter Auflösung)

HRT	hormone replacement therapy
IBC	invasive breast cancer
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL1-beta	Interleukin1-beta
kDa	Kilo-Dalton
Ksr-1	kinase suppressor of Ras
LCIS	Carcinoma lobulare in situ
LOH	loss of heterozygosity
MAPKKK	mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MF	Fernmetastasenfreies Intervall
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MTTB	Multi Tissue Tumor Block
PR	Progesteron Receptor
resp.	respektive
RF	Rezidivfreiheit
RNA	ribonucleic acid
RNA-ISH	RNA-in-situ-Hybridisierung
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMI+HuSe	Roswell Park Memorial Institute + Human Serum
RR	relatives Risiko (Odd's Ratio)
Rsk	ribosomale S6 Kinase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SAGE	serielle Analyse der Genexpression
SLBP	stem loop binding protein
SSH	Supression Subtractive Hybridisation
TAB1/2	Tak1 binding protein 1/2
Tak1	TGF β -aktivierte Kinase 1
TD	Versterben
TDLE	terminale duktulo-lobuläre Einheit
TGF	Transforming Growth Factor
TMA	Tissue Microarray

TNM	Tumorsize Nodus Metastasis
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UTR	untranslated region
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
z.B.	zum Beispiel