

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Gerhard Domagk Institut für Pathologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Böcker

Evaluation von Prognosefaktoren des invasiven Mammakarzinoms an Gewebemikroarrays

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung des

doctor medicinae dentium

der medizinischen Fakultät der

Westfälischen- Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von

Sepideh Farahani

geboren in Teheran, Iran

2006

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

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Volker Arolt

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

2. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2006

Westfälische- Wilhelms- Universität Münster

Gerhard Domagk Institut für Pathologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Böcker

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Horst Bürger

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz

Zusammenfassung

Evaluation von Prognosefaktoren des invasiven Mammakarzinoms an Gewebemikroarrays

Farahani, Sepideh

Das Mammakarzinom stellt eines der häufigsten Todesursachen bei Frauen dar. Bei der Diagnose Mammakarzinom ist von großer Bedeutung, sichere Aussagen über die Prognose und Prädiktion zu treffen, um die Therapiemethoden adäquater für die betroffene Patientin auszuwählen. Ziel der vorliegenden Studie ist die prognostische und prädiktive Relevanz der Faktoren Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, p53, c-*erbB2*, Cyclin D1, Mib-1 und bcl-2 des invasiven Mammakarzinoms in einem speziellen Kollektiv von 222 Patientinnen mit dem TMA- Verfahren zu evaluieren und die Möglichkeiten und Schwierigkeiten der TMA- Methode zu definieren. Nach der Erstellung von 3 TMA- Blöckchen aus dem Biopsat von 250 Gewebeproben wurde die Expression der Prognosefaktoren durch immunhistochemische Methoden dargestellt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die follow- up Daten der Patientinnen wurden mit den gewonnenen Daten der Prognosefaktoren zusammen analysiert. Die Studie hat gezeigt, dass das TMA- Verfahren für die untersuchten Prognosemarker bei sorgfältiger Auswahl der Biopsieentnahmestelle eine repräsentative, kostengünstige und zeiteffiziente Methode bei der Analyse grosser Fallzahlen darstellt und die Bestimmung der untersuchten Prognosemarker ER, PR, c-*erbB2*, p53, Mib-1, bcl-2 und Cyclin D1 von klinischer Relevanz ist.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	2
2.1	Physiologischer Aufbau der weiblichen Brust	2
2.2	Histologische Klassifikation der Mammakarzinome	2
2.3	Histopathologisches Grading	6
2.4	TNM- Klassifikation/Staging	7
2.5	Risikofaktoren für das Mammakarzinom	8
2.5.1	Alter	8
2.5.2	Genetische Disposition	8
2.5.3	Hormonelle Faktoren	9
2.5.4	Umweltfaktoren	11
2.5.5	Ernährung	11
2.5.6	Genussmittel	12
2.5.7	Geographische Faktoren	13
2.6	Therapie des primären Mammakarzinoms	13
2.7	Prognosefaktoren für das Mammakarzinom	14
2.8	Tissue Mikroarrays (TMA's)	19
2.8.1	Das Prinzip der Tissue Mikroarrays	19
2.8.2	Die Tissue Mikroarray Technik	20
3	MATERIAL UND METHODE	22
3.1	Material	22
3.2	Methode	22
3.3	Immunhistochemische Untersuchungen	23
3.4	Lichtmikroskopische Auswertung	26
4	ERGEBNISSE	27
5	DISKUSSION	42
6	LITERATURVERZEICHNIS	53
7	DANKSAGUNG	68
8	LEBENS LAUF	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO- Klassifikation der Mammakarzinome.....	3
Tabelle 2: Histologisches Grading nach Bloom und Richardson- modifiziert nach Elston und Ellis, 1991.....	6
Tabelle 3: Klassifikation nach den Richtlinien der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC), 1993.....	7
Tabelle 4: Prognosefaktoren der 1. Kategorie, Prognosefaktoren der 2. Kategorie und Marker, deren klinische Relevanz noch zu evaluieren ist.....	15
Tabelle 5: Verdünnungen der Primärantikörper.....	25
Tabelle 6: Beschreibung der Beurteilung der untersuchten Antikörper.....	26
Tabelle 7: Nichtparametrische Korrelationen.....	34

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schnitt von einem TMA- Blöckchen für die Untersuchung unter dem Mikroskop.....	21
Abbildung 2:	Mikroarray Blöckchen.....	23
Abbildung 3:	Mikroarray Blöckchen, ein Quadrant vergrößert	23
Abbildung 4:	Altersverteilung der Patientinnen	27
Abbildung 5:	Auswertbare Ergebnisse der untersuchten Tumormarker in %.....	28
Abbildung 6:	Grading	29
Abbildung 7:	Tumorgröße	29
Abbildung 8:	Lymphknotenstatus.....	30
Abbildung 9:	Metastasen	30
Abbildung 10:	ER.....	31
Abbildung 11:	PR.....	31
Abbildung 12:	p53.....	32
Abbildung 13:	<i>c-erbB2</i>	32
Abbildung 14:	Mib-1	33
Abbildung 15:	Cyclin D1.....	33
Abbildung 16:	bcl-2.....	33
Abbildung 17:	Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus	35
Abbildung 18:	Überleben in Abhängigkeit von ER	35
Abbildung 19:	Überleben in Abhängigkeit von PR	36
Abbildung 20:	Überleben in Abhängigkeit von p53	36
Abbildung 21:	Überleben in Abhängigkeit von <i>c-erbB2</i>	37
Abbildung 22:	Überleben in Abhängigkeit von Mib-1	37
Abbildung 23:	Überleben in Abhängigkeit von Cyclin D1	38

Abbildung 24:	Überleben in Abhängigkeit von bcl-2.....	38
Abbildung 25:	ER stark positiv	39
Abbildung 26:	p53 stark positiv	39
Abbildung 27:	p53 schwach positiv	39
Abbildung 28:	p53 stark positiv	39
Abbildung 29:	p53 negativ	40
Abbildung 30:	c-erbB2 negativ	40
Abbildung 31:	c-erbB2 stark positiv	40
Abbildung 32:	Cyclin D1 positiv	40
Abbildung 33:	Cyclin D1 negativ	41
Abbildung 34:	bcl-2 stark positiv	41
Abbildung 35:	bcl-2 positiv	41
Abbildung 36:	bcl-2 negativ	41
Abbildung 37:	Mib-1 positiv	41

1 Einleitung

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Ländern der häufigste bösartige Tumor der Frau. Ende der 90er Jahre waren 26% aller Krebserkrankungen bei Frauen Malignome der Brustdrüse (Kreienberg et al., 2002). Weltweit werden jedes Jahr 1.000.000 Neudiagnosen gestellt (Ferlay et al., 2001). Die absolute Inzidenz für die Bundesrepublik Deutschland ist steigend und wird für das Jahr 2000 mit 51710 Neuerkrankten angegeben (Tumorzentrum München, 2005). In der Altersgruppe 35 bis 54 Jahre ist Brustkrebs die häufigste Todesursache (Tumorzentrum Erfurt, 2001). Jede zehnte Frau in Deutschland erkrankt an Brustkrebs. Für die Erkrankten liegt die Fünf- Jahres- Überlebensrate bei 75%, die Zehn- Jahres- Überlebensrate bei 50%, falls zum Zeitpunkt der Diagnose noch keine Fernmetastasen nachweisbar sind (Statistisches Bundesamt, 2000). Es sterben jährlich ca. 18.000 Frauen an Brustkrebs. Die altersstandardisierte Mortalitätsrate in Deutschland ist mit anderen europäischen Ländern vergleichbar, wobei Schweden und Dänemark die geringste Mortalitäts- und Inzidenzrate in Europa aufweisen (Tumorzentrum München, 2005).

Das Mammakarzinom gilt als multifaktorielles Geschehen, das sowohl von genetischen als auch von anderen Risikofaktoren beeinflusst wird. Bei 5-10% aller Mammakarzinompatientinnen ist eine genetische Prädisposition nachweisbar (State of the Art Meeting, 2002, Hanf, 2002). Ca. 25- 30% aller Mammakarzinome können hingegen mit den heute bekannten Risikofaktoren erklärt werden (Hanf, 2002).

2 Grundlagen

2.1 Physiologischer Aufbau der weiblichen Brust

Die weibliche Brust gehört zu den sekundären Geschlechtsorganen und entwickelt sich aus apokrinen Hautdrüsen. Gerade in Stadien der Entwicklung können schädigende Mechanismen der Brust großen Schaden zufügen. Erst nach einer ausgetragenen Schwangerschaft mit nachfolgender Stillzeit hat die weibliche Brust ihre endgültige Differenzierung erreicht (Russo et Russo, 1995).

Das Drüsenparenchym besteht aus ca. 15- 20 Lobi mammae, welche unregelmässig hinter der Mamille verteilt sind und aus mehreren Lobuli bestehen. Das gesamte Drüsenparenchym wird entlang der Lobi von Fettgewebe durchsetzt. Die Lobuli wiederum werden durch Azini, Tubuli und intralobulärem Bindegewebe gebildet. Die Myoepithelzellen der Drüsenazini liegen der Basalmembran auf. Diese Zellen ermöglichen die Kontraktion und Entleerung der Azini. Die Ausführungsgänge der Azini bilden die Ductuli lactiferi, die die Ducti lactiferi bilden. Die Ducti lactiferi enden als Sinus lactiferi, die dann letztendlich als Milchgänge - manchmal erst nach Vereinigung mit anderen Sinus lactiferi- in die Mamille münden.

Der lymphatische Abfluss verläuft hauptsächlich nach axillär über die Noduli pectorales zu den Noduli axillae centrales oder nach thorakal zu den Noduli intercostales und mediastinales posteriores. Beachtenswert sind die Verbindungen der Lymphbahnen von der einen zur anderen Seite der Brust (Hoeffken et Lanyi, 1973 ; Putz et Pabst, 1993).

2.2 Histologische Klassifikation der Mammakarzinome

Das Mammakarzinom entsteht durch die maligne Entartung des Epithels der Milchgänge oder der Brustdrüsenläppchen. Somit sind Karzinome, die vom Läppchen (Lobus) ausgehen, zu unterscheiden von Karzinomen, die von den Milchgängen (Ductus) ausgehen.

Nach der WHO- Klassifikation der Mammakarzinome aus dem Jahre 1982 werden

A. gutartige von

B. bösartigen Tumoren unterschieden.

A. Die gutartigen Karzinome werden unterschieden in:

1. intraduktales Papillom
2. Adenom der Mamille
3. Adenom:
 - 3.1 tubuläres Adenom
 - 3.2 laktierendes Adenom

B. Bei den bösartigen Tumoren werden

1. nicht invasive von
2. invasiven Karzinomen und vom
3. Morbus Paget der Mamille unterschieden.
 1. Die nicht invasiven Mammakarzinome werden unterteilt in:
 - 1.1 Carcinoma lobulare in situ (LCIS)
 - 1.2 Carcinoma ductale in situ (DCIS)
 2. Die invasiven Mammakarzinome werden unterteilt in
 - 2.1 invasives duktales Karzinom
 - 2.2 invasives duktales Karzinom mit vorherrschender intraduktales Komponente
 - 2.3 invasives lobuläres Karzinom
 - 2.4 tubuläres Karzinom
 - 2.5 muzinöses Karzinom
 - 2.6 medulläres Karzinom
 - 2.7 papilläres Karzinom
 - 2.8 adenoid zystisches Karzinom
 - 2.9 sekretorisches (juveniles) Karzinom
 - 2.10 apokrines Karzinom
 - 2.11 Karzinom mit Metaplasie
 - Das Karzinom mit Metaplasie wird unterschieden in
 - 2.11.1 squamöser Typ
 - 2.11.2 spindelzell Typ
 - 2.11.3 knorpeliger und knöcherner Typ
 - 2.11.4 Mischtyp
 3. Morbus Paget der Mamille

Tabelle 1: WHO- Klassifikation der Mammakarzinome

Diese histologische Typisierung der WHO ist die zweite revidierte Klassifikation und dient heute zur Einordnung der individuellen Tumore bei der Diagnostik. Sie basiert auf dem histologischen Phänotyp des Tumors, wobei pathogenetische Gesichtspunkte nicht berücksichtigt werden. Wenn ein Mammakarzinom verschiedene Wachstumstypen beinhaltet, wird es nach dem vorherrschenden Typ klassifiziert (The World Health Organization, 2003, Tumorzentrum München, 2005, Mitze, 2002).

A

Die unter A aufgeführten gutartigen Tumore sind Neoplasmen, die vom Epithel ausgehen, meist mit bindegewebigem Wachstum einhergehen und sehr selten mit einem bösartigen Wachstum assoziiert sein können.

B 1

1.1 Die Definition des LCIS geht auf Foote und Stewart zurück, die 1942 eine exakte Definition und Abgrenzung des LCIS gegenüber Mastopathien oder invasiven Veränderungen abgegeben haben. Kennzeichen des Carcinoma in situ ist die nicht durchbrochene Basalmembran. Gewöhnlich ist die Diagnose des LCIS ein Zufallsbefund des aus einem anderen Grunde entnommenen Mammagewebes (Foote et Stewart, 1941).

B 1.2

Das Carcinoma ductale in situ ist weit häufiger verbreitet als das LCIS und wird auch als intraduktales Karzinom bezeichnet. Es wird von der WHO definiert als: ein Karzinom der Brustdrüsengänge, welches keine Stromainvasion des umgebenden Gewebes aufweist (WHO, 2003). Das DCIS ist im Gegensatz zu dem LCIS eine präkanzeröse Läsion. Das DCIS wird als direkter genetischer Vorläufer der invasiven Karzinome gesehen (Buerger et al., 1999b).

B 2.1

Das invasive duktale Karzinom ist der häufigste Mammakarzinomtyp. Die Tumorzellen hier können nestförmig, drüsenartig oder perlschnurartig angeordnet sein. Die makroskopische und mikroskopische Erscheinungsweise dieses Tumors ist hoch variabel.

B 2.2

Das invasive duktale Karzinom mit vorherrschender intraduktaler Komponente ist von der WHO als Karzinom definiert, das zu grossem Anteil intraduktal wächst und Stromainvasionen beinhaltet. Nach Auffassung der WHO sollen nur Tumoren, deren intraduktaler Anteil zum nicht invasiven Anteil im Verhältnis 4:1 steht, zu dieser Entität gezählt werden (WHO, 2003). Bässler unterteilt diese Tumorvariante nach dem Verhältnis der invasiven Anteile zu den nicht invasiven Anteilen und benennt hierbei noch das invasive duktale Karzinom mit extensiver intraduktaler Komponente (EIC) und das invasive duktale Karzinom mit kleiner intraduktaler Komponente. Die Therapie und Prognose des Tumors ist abhängig von den quantitativen Anteilen der genannten Komponenten in der Läsion (Bässler, 1995).

B 2.3

Das invasive lobuläre Karzinom ist von der WHO definiert als: ein Karzinom, welches aus einheitlichen Zellen besteht, die denen des LCIS ähneln und eine geringe Mitoseaktivität aufzeigen (WHO, 2003). Bezeichnend für das LCIS ist seine Kleinzelligkeit, sein infiltrierendes Wachstum und seine Desmoplasie. Jedoch kann sich das LCIS auch als solider, alveolärer, pleomorpher oder siegelringzelliger Typ darstellen (Tumorzentrum München, 2005).

B 2.4

Das tubuläre Karzinom wird definiert als: ein hoch differenziertes invasives Karzinom, dessen Zellen in gut differenzierten tubulären Anteilen des Tumors

angeordnet sind (mindestens 95% tubuläre Strukturen) und von reichlich faserreichem Stroma umgeben sind. Das tubuläre Karzinom weist wie das invasive lobuläre Karzinom sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptoren auf. Es gilt als prognostisch sehr günstig (WHO, 2003).

B 2.5

Das Muzin- produzierende Karzinom wird auch Gallertkarzinom genannt und ist definiert als: Karzinom, das große Mengen an extrazellulärem, gallertartigem Stroma enthält und dadurch sein glasiges Aussehen erhält (WHO, 2003). Diese Tumorvariante ist hoch differenziert, rezeptorpositiv und hat ebenfalls eine günstige Prognose (Mitze, 2002).

2.3 Histopathologisches Grading

Alle histologischen Typen können anhand der Merkmale Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate dem histopathologischen Grading zur Beurteilung des Malignitätsgrads invasiver Mammakarzinome unterzogen werden. Das Grading geht zurück auf Bloom und Richardson im Jahre 1957 und wurde von Elston und Ellis in seiner derzeit gültigen Form modifiziert:

Merkmale	Kriterien	Scorewerte
Tubulusausbildung	>75% 10-75% <10%	1 2 3
Kernpolymorphie	Gering Mittelgradig Stark	1 2 3
Mitoserate	0-1/High Power Field 1-2/High Power Field >2/ High Power Field	1 2 3
Scoresummen	3-5 6-7 8-9	G 1 = gut differenziert G 2 = mässig differenziert G 3 = schlecht differenziert

Tabelle 2: Histologisches Grading nach Bloom und Richardson- modifiziert nach Elston und Ellis, 1991

Das High Power Field ist die 40fache Objektivvergrößerung (Okular)

2.4 TNM- Klassifikation/ Staging

Die Klassifikation des Primärtumors erfolgt nach der pTNM- Klassifikation. Sie erfolgt postoperativ nach vorliegendem makroskopischen oder mikroskopischem Befund. Die TNM- Klassifikation gibt Auskunft über das klinische Ausmass des Tumors (Tumorgrösse (T), Lymphknotenstatus (N) und Metastasen (M)) und somit der Stadieneinteilung (Staging).

pT-Primärtumor	
PTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
PT0	kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carzinoma in situ
PT1	Tumor 2 cm oder weniger in grösster Ausdehnung
PT2	Tumor > 2 cm, <5 cm in grösster Ausdehnung
PT3	Tumor mehr als 5 cm in grösster Ausdehnung
PT4	Tumor jeder Grösse mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
PT4a	mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut derselben Brust
PT4c	Kriterien von 4a und ab gemeinsam
PT4d	inflammatorisches Karzinom
pN- regionäre Lymphknoten	
PNx	Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
PN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
PN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
PN1a	Nur Mikrometastasen
PN1b	Metastasen, zumindest eine > 0,2 cm
PN1bi	Metastasen in 1-3 Lymphknoten
PN1bii	Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten
PN1biii	Ausdehnung der Metastasen in das perinodale Lymphgewebe
PN1biv	Metastasen ab 2 cm
pN2	Matastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder in andere Strukturen fixiert
PN3	Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pM-Fernmetastasen	
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
PM0	Keine Fernmetastasen
PM1	Fernmetastasen

Tabelle 3: Klassifikation nach den Richtlinien der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC), 1993

2.5 Risikofaktoren für das Mammakarzinom

2.5.1 Alter

Das steigende Durchschnittsalter der Bevölkerung wird mit der zunehmenden Häufigkeitsrate des Brustkrebses in Korrelation gesetzt, denn die Inzidenz nimmt mit steigendem Alter zu (Jonsson et al., 2003). Die Wahrscheinlichkeit im nächsten Jahr an Brustkrebs zu erkranken liegt für eine 65-jährige Frau fünfmal so hoch wie für eine 45-jährige Frau (Bonk, 2000, Kreienberg et al., 2002).

2.5.2 Genetische Disposition

In ca. 5%-10% aller Fälle konnte eine genetische Disposition zum Mammakarzinom nachgewiesen werden (Perera et al., 2003). Bei diesen Patientinnen tritt das Mammakarzinom in der Regel vor dem 45. Lebensjahr und häufig bilateral auf (Ganten et al., 1997). Dabei erhöht sich das Risiko mit dem engeren Grad der Verwandtschaft. Bei einer Verwandten 1. Grades erhöht sich das Risiko der Patientin selbst an einem Mammakarzinom zu erkranken um den Faktor 3- 4 gegenüber einer familiär nicht belasteten Person (Runnebaum et al., 2002).

Die bekanntesten Genloci, die mittels Genanalysen geortet wurden, und mit der genetischen Disposition in Zusammenhang stehen, sind das BRCA 1 Gen und das BRCA 2 Gen.

BRCA steht für **B**reast **C**ancer. Das BRCA 1 Gen befindet sich auf Chromosom 17q, Gen 2 befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 13q 12- 13. Die beiden genannten Gene schützen im nicht mutierten Zustand die Zelle vor maligner Entartung, sind also Tumorsuppressorgene. Mutationen des BRCA 1 bzw. 2 Gens erhöhen nicht nur das Risiko an einem Mammakarzinom sondern auch an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Tumorzentrum München, 2005). BRCA 1 Mutationen sind in 50% der familiären Mammakarzinom Fälle und BRCA 2 Mutationen in 35% der Fälle auslösend für die Erkrankung. (Runnebaum et al., 2002). Es wird angenommen, dass von ca. 200 Familien, in denen 4 oder mehr Fälle an Brustkrebs auftreten, ca. 50% der Familien BRCA 1

Mutationen aufweisen (Scherneck et al.,1997). Bei der Betrachtung von Familien mit mindestens 2 Fällen von Brustkrebs lassen sich bei erstgradig Verwandten in 10% der Fälle Mutationen des BRCA 1 oder BRCA 2 Mutationen nachweisen (Tumorzentrum München, 2005).

Neben den BRCA Genen spielen Keimbahnmutationen des p53 Gens eine weitere Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs. In ca. 40- 45% aller menschlichen Tumoren wurden zudem somatische Mutationen im p53- Gen gefunden, welche meist einen Austausch einer Aminosäure im Sinne einer Punktmutation bewirken. Sowohl das mutierte als auch das nicht mutierte Genprodukt befinden sich gehäuft im Tumor (Soussi et al., 1994). Beim Mammakarzinom werden schon relativ früh p53- Mutationen beobachtet, während sie bei anderen Karzinomen- darunter auch das Ovarialkarzinom- erst im späteren Krankheitsverlauf auftreten. Deshalb konnten die genauen Abläufe der Beteiligung des p53 Genes an der Karzinogenese des Mammakarzinoms noch nicht ganz klar herausgearbeitet werden. Fest steht jedenfalls, dass die p53 Keimbahnmutationen unterschiedlich in der Veränderung der Aminosäuren ausfallen und auch unterschiedlich für jede Tumorart sind. Dieses Phänomen wird in Zusammenhang mit den verschiedenen Kanzerogenen und einwirkenden Noxen gestellt (Birkmayer, 1984).

2.5.3 Hormonelle Faktoren

Östrogen

Östrogene gelten als Tumorpromotoren bei der Karzinogenese des Mammakarzinoms. In einen Review aus dem Jahre 2000, stellt Liehr heraus, dass Tiere, denen 17-beta-Estradiol (E2) zugeführt wurde, eine erhöhte Inzidenz an Tumorerkrankungen (Mammakarzinom, Endometrialkarzinom, Zervixkarzinom, Vaginalkarzinom usw.) haben. Im menschlichen Organismus sind schon geringe Erhöhungen des Östrogenspiegels verbunden mit einem erhöhten Risiko, an Brustkrebs zu erkranken (Liehr, 2000). Umstritten ist jedoch der Mechanismus, der dazu führt, dass es durch Östrogene zu einer stimulierten Zellproliferation und zum Zellwachstum kommt (Krauß, 2002). Als bewiesen gilt,

dass Prozesse, wie frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität und Zugehörigkeit zu höheren sozioökonomischen Klassen und damit verbundenen längeren Ausbildungszeiten und konsekutiv späterer erster Schwangerschaft aufgrund der höheren bzw. längeren Östrogeneinwirkung auf den Organismus zu einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken führen (Vernon 1985, Gordon, 1992, Statistisches Bundesamt, 1998, Hanf, 2002). Synthetische Östrogene sollen ein geringeres karzinogenes Potential als die nativen Östrogene darstellen. Jedoch steigt auch bei der Einnahme dieser Östrogene (hormonelle Kontrazeption) das relative Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken und liegt bei 1,3. Doch auch im Bezug auf die hormonelle Kontrazeption sind mittlerweile die Auffassungen unterschiedlich: In einer im Jahre 2005 erschienenen Empfehlung des Tumorzentrums München geben die Autoren ein nicht erhöhtes Mammakarzinomrisiko bei Einnahme von oralen Kontrazeptionspräparaten an (Tumorzentrum München, 2005).

Das Risiko von Frauen, die nie eine ovarielle Östrogenproduktion hatten, liegt bei nur 1% von dem von Frauen mit physiologischer Östrogenproduktion (Krauß, 2002).

Progesteron

Die frühere Annahme, die Einnahme von Östrogenpräparaten würde bei gleichzeitiger Progesterongabe das Mammakarzinomrisiko reduzieren, gilt als überholt. Vielmehr ist Progesteron ein weiterer Risikofaktor, weil das Hormon als primäres Mitogen bei der Entartung der duktaalen Brustdrüsenzellen gilt (Liehr, 2000). Jedoch ist die Beweislage bei den Gestagenen im Vergleich zu den Östrogenen spärlicher. Da mehr als 50% der Mammakarzinome hormonrezeptorpositiv sind und auf eine Antihormontherapie ansprechen, lässt sich hieraus der Rückschluss ziehen, dass sowohl Östrogen aber auch Progesteron einen Einfluss auf die Erkrankung nehmen (Krauß, 2002).

2.5.4 Umweltfaktoren

Ionisierende Strahlung

Es ist bekannt, dass die Einwirkung ionisierender Strahlung in Korrelation zur Dosis und Häufigkeit der Strahlenbelastung die Krebsentstehung fördert. Je jünger die bestrahlte Person ist, desto grösser ist das Risiko nach einer gewissen Zeit an einem Mammakarzinom zu erkranken. Erste Untersuchungen zur Kausalität der Strahlenbelastung beim Mammakarzinom wurden schon im Jahre 1965 unternommen (Mackenzie, 1965). Jedoch wird die Karzinogene Wirkung ionisierender Strahlen oftmals erst nach 15 Jahren oder mehr manifest (Shore et al., 1977).

2.5.5 Ernährung

Konsum tierischer Fette

Der Konsum von tierischen Fetten in Zusammenhang mit einem gesteigertem Risiko an Brustkrebs zu erkranken, wird kontrovers diskutiert (Welsch, 1992). Der Verzehr von tierischen Fetten soll zu einer vermehrten Ansammlung von persistenten Xenoöstrogenen im Brustgewebe führen (Hanf, 2002). Andererseits belegen prospektive Kohortenstudien, dass der Verzehr tierischer Fette keinen Einfluss auf das Brustkrebsrisiko hat (Howe et al., 1991; Willett et al., 1992).

Geringer Obst- und Gemüsekonsum

Grundsätzlich ist allgemein bekannt, dass der Verzehr von Obst und Gemüse den Organismus mit Vitaminen, Mineralien und Spurenelementen versorgt. Die Deutsche Krebsgesellschaft rät nicht zuletzt daher zu einer vegetarisch ausgerichteten Ernährung mit 5 Portionen Obst und Gemüse am Tag (Deutsche Krebshilfe, 1991). Ob jedoch der Verzehr von Obst und Gemüse sich speziell beim Mammakarzinom senkend auf das Erkrankungsrisiko auswirkt, wird in der

Literatur kontrovers diskutiert (Sandhu et al., 2000, Slattery, 2001, Smith-Warner et al. 2001).

2.5.6 Genussmittel

Alkoholkonsum

Alkohol führt in Abhängigkeit von der konsumierten Menge und der Sorte des Getränkes zu einer Erhöhung des Östrogenspiegels bei Frauen prämenopausal und einer Erhöhung des Prolaktinspiegels postmenopausal. Prolaktin ist ein im Hypophysenvorderlappen gebildetes Hormon, das das Brustdrüsenwachstum stimuliert und im Verdacht steht, bei der Mammakarzinogenese mitzuwirken. Vor allem bei dem Konsum von Bier ist die zusätzliche Risikoerhöhung durch die im Hopfen enthaltenen Phytoöstrogene bekannt (La Vecchia et al., 1989, Smith-Warner et al., 1998, Hanf, 2002).

Zigarettenrauchen

Tabakrauchbestandteile gelten als potente Tumorpromotoren, und stellen z.T. auch Kanzerogene dar. Es besteht die Hypothese, dass die im Tabakrauch befindlichen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe durch den Metabolismus des Körpers zu Schädigungen der DNA führen. Eine Studie aus der Schweiz macht den Einfluss des aktiven als auch passiven Rauchens auf die Mammakarzinomentstehung deutlich (Morabia et al., 1996).

Jedoch ist nach einer Studie von Ambrosone auch auf die unterschiedliche Entgiftungsfähigkeit des menschlichen Organismen zu beachten, die sich aus der individuell variablen Tätigkeit des Enzymsystems N- Acetyltransferase 2 ergibt, welches für die Entgiftung von kanzerogenen aromatischen Aminen im Körper verantwortlich ist (Ambrosone et al., 1996).

2.5.7 Geographische Faktoren

Auffällig ist, dass die Inzidenz des Mammakarzinomes in Asien deutlich geringer als in Europa oder den USA ist. Dieses Phänomen wird auf die Lebensweise und Ernährung der Asiatinnen zurückgeführt, da in Asien weniger tierische Fette und mehr Obst und Gemüse verzehrt werden (Hanf, 2002). Des vor allem Afroamerikaner bei der Diagnose eines Mammakarzinomes eine im Vergleich mit Angehörigen der weissen Rasse schlechtere Prognose haben (Elledge et al., 1994, Natarjan et al., 1985, Yood et al., 1999, Perera et al., 2003).

2.6 Therapie des primären Mammakarzinoms

Die Voraussetzung für eine adäquate und erfolgreiche Therapie ist die sichere und genaue Diagnostik des Mammakarzinomes. Dazu gehören:

- Die Lokalisation des Tumors durch:
 - a) bildgebende Verfahren, wobei die Mammographie das wichtigste Verfahren im Rahmen der Tumorfrüherkennung und Nachsorge darstellt (Andersson et al. 1988, Jonsson et al., 2003)
 - b) den Tastbefund
 - c) das Einbringen von Markierungsdraht oder durch Injektion von Kontrastmittel in die verdächtige Region oder die Kohlestaubmarkierung vor der Biopsieentnahme (Tumorzentrum München, 2005).
- Die Biopsie, welche in Form einer Exzisionsbiopsie, Stanzbiopsie oder bei grossen Tumoren auch einer Inzisionsbiopsie erfolgen kann.
- Der histologische Nachweis des Tumors.

Die Therapie des primären Mammakarzinomes richtet sich nach dem diagnostischen und histopathologischen Befund (TNM- Klassifikation, Staging, Grading, pTMN- Klassifikation).

Bei der operativen Therapie unterscheidet man die brusterhaltende Operation von der modifiziert radikalen Mastektomie mit simultanem oder sekundärem Wiederaufbau der Brust (Tumorzentrum München, 2005).

Bei der brusterhaltenden Therapie erfolgt die Operation mit gleichzeitiger Axilladisektion. Sie ist das derzeitige Standardverfahren bei kleinen Mammakarzinomen und beinhaltet immer eine nachfolgende Strahlentherapie um das Rezidivrisiko zu senken. Die Strahlentherapie wird postoperativ mit einer Referenzdosis von 45-50 Gy, in täglichen Einzeldosen von 1,8-2 Gy homogen auf die gesamte Brust verteilt, bestrahlt (Müller, 2002).

Die nicht organerhaltende Therapie (Mastektomie) wird immer dann durchgeführt, wenn der Tumor nicht ausreichend im Gesunden exstirpiert werden kann, wenn es sich um eine Multizentrität des Tumors handelt, wenn bei der Patientin ein Tumor mit extensiver intraduktaler Komponente diagnostiziert wurde, wenn die Patientin bereits nachgewiesene Fernmetastasen hat oder wenn die Patientin diese Therapieform wünscht.

Bei der Mastektomie ist darauf zu achten, dass der Patientin durch die Schnittführung bei der Operation die Option einer Brustrekonstruktion erhalten bleibt, um psychische Belastungen durch den Verlust der Brust zu vermeiden (Kreienberg et al., 2002).

2.7 Prognosefaktoren für das Mammakarzinom

Da die Pathogenese des Mammakarzinomes variabel und nur eingeschränkt prognostizierbar ist, wird versucht, Gewebemarker ausfindig zu machen, die in Zusammenhang mit Zellproliferation, Invasion oder Metastasenbildung stehen, um eine Prognose und Prädiktion für das Mammakarzinom anhand dieser sog. Prognosefaktoren zu ermöglichen (Fitzgibbons et al., 1999, Coradini et al., 2004).

Unterschieden wird zwischen prädiktiven und prognostischen Markern:

Die prädiktiven Marker sagen den Erfolg von therapeutischen Maßnahmen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit voraus, während

prognostische Marker Auskunft über den weiteren Krankheitsverlauf geben können (Tumorzentrum München, 2005).

Als Prognosefaktoren mit klinischer Relevanz werden vom amerikanischen Pathologenkolleg folgende Faktoren diskutiert (Fitzgibbons et al., 1999):

Marker der 1. Kategorie	Marker der 2. Kategorie	Marker der 3. Kategorie
Tumorgrösse	c-erbB-2-Status	Ki-67/ Mib-1
Lymphknotenstatus	p53-Status	bcl-2
histologisches Grading	Gefässinvasion	Cyclin D1
Histologischer Typ		DNA- Ploiditäts- Analyse
Mitoserate		EGFR
Hormonrezeptorstatus		TGF alpha-
		Cathepsin D
		PS2
		Mikrogefässdichte

Tabelle 4: Prognosefaktoren der 1. Kategorie, Prognosefaktoren der 2. Kategorie und Marker, deren klinische Relevanz noch zu evaluieren ist

1.

Die Tumorgrösse gilt als einer der wichtigsten Prognosefaktoren. Daher gilt es, diesen Faktor mit grosser Genauigkeit zu bestimmen.

2.

Der Lymphknotenstatus gilt als wichtigster prädiktiver Faktor für das Überleben der Patientin. Dabei erscheint die prognostische Relevanz von histologisch nicht sichtbaren Mikrometastasen in Lymphknoten nach Auffassung des amerikanischen Pathologenkolleges als nicht gesichert.

3.

Das histologische Grading ermöglicht die Einteilung der betroffenen Patientin in eine Risikogruppe. Daher dient das histologische Grading als ein wichtiger prognostischer Marker.

4.

Die histologische Typisierung des Tumors ist wichtig, um den Tumor korrekt klassifizieren zu können und ist somit von prognostischer Relevanz.

5.

Die Mitoserate wird im High Power Field (40x Vergrößerung) bestimmt, um die Proliferationsrate eines Tumors abzuschätzen. Je höher die Mitoserate, desto schlechter ist die Prognose für die Patientin

6.

Der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, ER- und PR- Status) gilt als wichtiger prädiktiver Parameter für die unterstützende Hormontherapie. Das amerikanische Pathologenkolleg empfiehlt die routinemäßige Bestimmung des Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom.

ER und PR befinden sich im Zellkern und sind zuständig für die Regulation von Genen, die einen Einfluss auf das Zellwachstum haben (Elston, Ellis, 1998).

Der Östrogenrezeptor wird unterteilt in ER- alpha und ER- beta. Beide Formen binden Östrogen und werden dadurch aktiviert. Ein großer Teil der Mammakarzinome ist östrogenrezeptorpositiv, das heißt, ER wird exprimiert. ER-Positivität wird mit einer guten Prognose und Ansprechen auf Hormontherapie assoziiert (Keen et al., 2003).

Der Progesteronrezeptor wird unterteilt in PRA und PRB. Im tumorös veränderten Gewebe wird PRB überexprimiert und ist wie ER- a ein Marker für gutes Ansprechen auf Hormontherapie (Keen et al., 2003).

7.

c-erbB2 (HER-2/neu) gilt als Onkoprotein, welches einen transmembranen Wachstumsfaktorrezeptor darstellt. 25-30% der Mammakarzinome weisen eine Überexpression dieses Onkoproteins auf. Die Bestimmung von *c-erbB2* ist insofern von prädiktiver und prognostischer Relevanz, als dass eine Überexpression dieses Moleküls mit einer schlechteren Differenzierung des Tumors, einer schlechten Prognose, einem aggressiveren Krankheitsverlauf sowie Resistenz gegen das Antiöstrogen Tamoxifen einhergeht (Ross et al., 1998, Fitzgibbons et al., 1999, Menard et al., 2001, Konecny et al., 2003, Schindlbeck et al., 2005). *c-erbB2* gibt Signale an die Tumorzellen, die diese Zellen zur weiteren Proliferation stimulieren (Yarden , 2001).

Zu den mit dem Mammakarzinom assoziierten transmembranen Wachstumsfaktoren gehören weiterhin *c-erbB1*, *c-erbB3* und *c-erbB4* (Elston, Ellis, 1998).

Die amerikanische Gesellschaft für klinische Onkologie gibt in ihrer Empfehlung für die routinemässige klinische Untersuchung nur die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und des *c-erbB-2* Status an (Bast et al., 2001).

8.

p53 gilt als Tumorsuppressorgen, welches auf Chromosom 17p lokalisiert ist und verantwortlich für den Zellzyklus nach DNA-Schädigungen ist. Mutationen des p53-Gen sind bei 20-40% aller Mammakarzinome zu finden und gehen meist mit einem Verlust des Wildtypallels einher. Sie führen zu Wachstumsfehlregulationen durch Fehlregulationen des Zellzyklus (Borrensens- Dale, 2003). P53-Mutationen scheinen schon früh im Prozess der Karzinogenese stattzufinden (Done et al., 2001) Sie korrelieren mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und fortgeschrittenerem histologischem Grad (Overgaard et al., 2000, Powell et al., 2000, Lai et al., 2004). Patientinnen mit p53-Mutationen sprechen eher auf eine Chemo-, Radio- oder Hormontherapie an (Fitzgibbons et al., 1999).

9.

Ki-67 ist ein im Zellkern befindliches nukleares Protein, dessen prozentuale Anwesenheit Auskunft über die Zellproliferationsrate gibt. Ki-67 gilt bei Patientinnen mit Mammakarzinom als ein Marker, der mit verminderter Überlebenszeit korreliert (Harbeck et al., 1998, Rudolph et al., 1999, Mirza et al., 2002). Mib-1 ist ein monoklonaler Antikörper, der an Ki-67 bindet und durch Formalinfixierung nicht zerstört wird. Somit kann die Proliferationsrate im fixiertem Gewebe durch Mib-1 ermittelt werden (Fitzgibbons et al., 1999).

10.

bcl-2 ist an der Apoptose beteiligt und verhindert den Zelltod (Schiller et al., 2002). bcl-2 stellt sowohl einen prognostischen als auch prädiktiven Marker dar, da Patientinnen mit einer bcl-2- Expression eine gute Prognose haben und gut auf Chemotherapie und Tamoxifentherapie reagieren (Coradini et al., 2004; Fitzgibbons, 1999).

11.

Die Cycline der Gruppe D sind an der Regulation der Zellteilung beteiligt. Cyclin D1 wird häufig bei primären Karzinomen überexprimiert (Coradini et al., 2004) und führt zur erhöhten Proliferation epithelialer Zellen (Kenny et al., 1999). In der Literatur gibt es unterschiedliche Auffassungen darüber, ob die Überexpression von Cyclin D1 bei östrogenrezeptorpositiven oder östrogenrezeptornegativen Patientinnen eine schlechte Prognose haben soll (Kenny et al., 1999; Umekita et al., 2002).

Um die klinische Relevanz von Ki-67 und Cyclin D1 besser evaluieren zu können, sind vielfache, aufwendige immunhistochemische Untersuchungen notwendig, die sehr kostspielig und zeitaufwendig sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit der Methode der Tissue- Microarrays (TMA) die Untersuchung von Markern und die prognostische Evaluation dieser Marker möglich ist.

2.8 Tissue Mikroarrays (TMA's)

2.8.1 Das Prinzip der Tissue Mikroarrays

Die TMA- Methode wurde 1998 von Kononen et al. eingeführt und wird seitdem vielfach für die Analyse von molekularen Veränderungen genutzt (Kononen et al., 1998). Das Prinzip der TMA's basiert auf die 1986 von Battifora beschriebene multitissue- oder sausage- Methode, wobei grössere Gewebeproben eines sog. Donorblöckchens ungeordneter als bei der TMA-Methode auf ein Empfängerblöckchen aufgebracht werden (Battifora, 1986). Die TMA- Methode ist somit eine präzisierte Weiterentwicklung der sog. „sausage- Methode“, bei der weniger Gewebe aus dem Donorblöckchen in geordneter Reihenfolge auf ein Empfängerblöckchen aufgebracht wird. Mit Hilfe der TMA- Methode kann man bis zu 1000 verschiedene in Paraffin gebettete Gewebematerialien auf einem einzigen Empfänger- Paraffinblöckchen aufbringen. (Kallioniemi et al., 2001, Moch et al., 2001, Mousses et al., 2001) Da in situ- Tests, wie die immunhistochemische Analyse, die Fluoreszenz in situ- Hybridisierung, DNA- und RNA- Analyse parallel an dem neu erstellten Empfänger- Paraffinblöckchen durchgeführt werden können, führt dies zu einer enormen Zeitersparnis (Schraml et al., 1999). Somit sind die TMA's auch kosteneffizient (Moch et al., 2001, Mucci et al. 2000, Horvath et Henshall, 2001). Neben der Zeitersparnis und Kosteneffizienz ist ein weiterer Vorteil, dass das Originalgewebematerial durch das Ausstanzen kaum einen Schaden nimmt (Moch et al., 2001).

Die TMA- Methode hat derzeit ihren grössten Anwendungsbereich auf dem Gebiet der Krebsforschung gefunden (Nocito et al., 2001). Mit dieser Methode können Alterationen und Amplifikationen auf molekularer Ebene in verschiedenen Stadien der Tumorerkrankung analysiert werden (Bubendorf et al., 2001) oder die Relevanz verschiedener prädiktiver und prognostischer molekularer Marker bestimmt werden (Kallioniemi et al., 2001). Zudem bietet diese Methode die Möglichkeit der Verknüpfung von molekularen Veränderungen mit klinischen Patientendaten (Mousses et al., 2001, Nocito et al., 2001), wobei die daraus

resultierenden Ergebnisse auf einzelne Patientenfälle angewendet werden können (Horvath et Henshall, 2001). Es besteht aber auch die Möglichkeit, die Gewebeproben der Patienten mit Nummern zu versehen und dadurch zu anonymisieren. Auch die Analyse von raren Tumoren ist gut möglich, da durch die TMA- Herstellung das rare Ursprungsgewebe kaum beschädigt wird (Moch et al., 2001).

Auch zu Zwecken der immunhistochemischen Qualitätssicherung/ –Kontrolle (das Problem der unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Laboratorien) dienen TMA's als ein wertvolles Werkzeug (Bubendorf et al., 2001; Packeisen et al., 2003).

Auf anderen Gebieten der Forschung können TMA's zur Testung und Entdeckung neuer Antikörper genutzt werden oder es können z.B. neue Testverfahren an ihnen erforscht werden (z.B. Färbungen). Nicht zuletzt können die Archive der pathologischen Institute durch die Erstellung von Mikroarrays effizienter werden.

Für die Zukunft wäre die Erstellung von TMA's auch für die Lehre als standardisierte Interpretation von Gewebeanalysen denkbar. Zudem erscheint die Interpretation einer kleinen Stanze leichter und effektiver möglich zu sein als die Auswertung großer Tumoreale (Bubendorf et al., 2001, Packeisen et al., 2003).

2.8.2 Die Tissue Mikroarray Technik

Die Donorblöckchen, welche in Paraffin eingebettetes Gewebe aus einer Tumorexstirpation enthalten, werden auf die Region untersucht, aus der das Gewebe für den TMA- Block entnommen werden soll. Mit Hilfe eines Stanzgerätes (Beecher Instruments, Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin) wird eine zylinderförmige Gewebeausstanzung aus dieser Region des Donorblöckchens entnommen. Vorher wird aus dem leeren Paraffinblöckchen, dem TMA- oder Empfängerblöckchen, Paraffin ausgestanzt. Es entsteht ein zylinderförmiger Hohlraum, so dass das Gewebe aus dem Donorblöckchen

darin platziert werden kann. Dank des digitalisierten Stanzgerätes können die Abstände zwischen den einzelnen Gewebezylindern gleichmäßig gewählt werden, wobei die einzelnen Gewebezylinder alle den gleichen Durchmesser haben. Der Durchmesser konnte mittlerweile von 3,0 mm auf 0,6 mm reduziert werden. Bei einem Abstand der einzelnen Stanzen von 0,8 mm kann das entstandene TMA- Blöckchen Gewebe von nahezu eintausend Tumoren enthalten. Es entsteht ein Raster auf dem Empfängerblöckchen, das bezüglich der Zugehörigkeit jedes einzelnen Tumors zu den dazu vorhandenen Daten (Patient, TNM- Klassifikation usw.) genau analysiert werden kann. Es können nun in Abhängigkeit von der Dicke des TMA- Blöckchens zwei- bis dreihundert Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte können mit histologischen Farbstoffen (z.B. Hämatoxylin- Eosin) versetzt werden oder für die Analyse von DNA, RNA oder Proteinen mit Methoden wie der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH), RNA in situ Hybridisation oder der Immunhistochemie (IHC) behandelt werden. Da jeder Gewebezylinder aus dem TMA- Schnitt unter identischen Bedingungen behandelt wird, besteht eine hohe Standardisierung (Kononen et al., 1998, Bubendorf et al., 2001, Skacel et al., 2002).

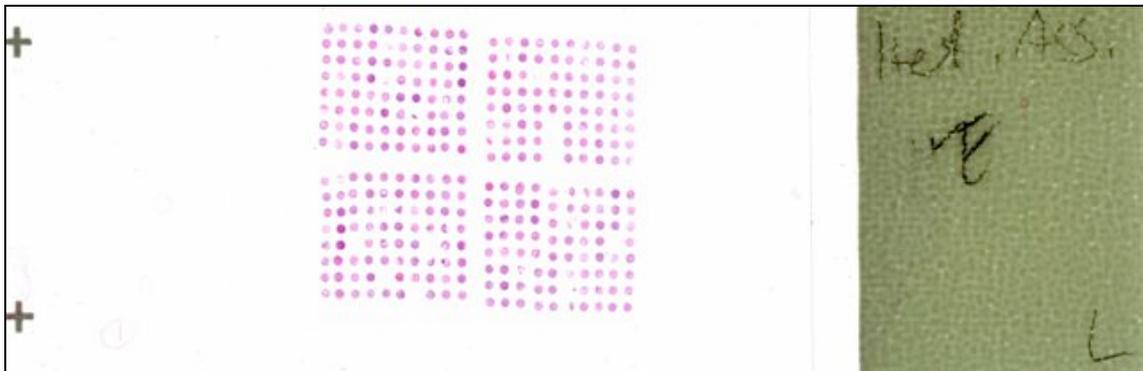


Abbildung 1: Schnitt von einem Tissue Mikroarray Blöckchen für die Untersuchung unter dem Mikroskop

3 Material und Methode

3.1 Material

Es wurden 250 Gewebeproben der Mamma von 222 Patientinnen im Alter von 13 bis 84 Jahren aus der Zeit 1988 bis 1993 untersucht. Zu jeder Patientin besteht ein bis zu zehnjähriges Nachbeobachtungsintervall.

Die Patientinnen wurden in der Frauenklinik der Westfälischen Wilhelms Universität behandelt, die aus den Biopsien erstellten Paraffinblöckchen und Schnittpräparate befinden sich im Gerhard- Domagk- Institut für Pathologie der Westfälischen- Wilhelms- Universität- Münster.

Die Schnittpräparate dienten mit Hilfe der lichtmikroskopischen Durchsicht zur Auffindung der pathologisch veränderten Areale. Aus diesen Arealen wurden die Stenzen aus den Paraffinblöckchen entnommen um das TMA- Blöckchen zu erstellen.

3.2 Methode

Zur Erstellung des TMA- Blöckchens wurden die histologischen Befunde der Patientinnen durchgeschaut und daraus die jeweilige Journalnummer und das Journaljahr entnommen. Mit Hilfe dieser Daten konnten im Gerhard-Domagk- Institut für Pathologie die Schnittpräparate und die Paraffinblöckchen der jeweiligen Biopsie aus dem Archiv herausgesucht werden. Es wurde eine Tabelle mit Patientennamen, Journaljahr, Journalnummer und den Koordinaten der Stanzbiopsie im TMA- Blöckchen erstellt (Microsoft Office 2000, Excell). Nach Kennzeichnung der Karzinomareale auf den Schnittpräparaten und des Auffindens dieses Areals auf dem Gewebelöckchens wurden aus jedem Blöckchen jeweils zwei 0,6 mm dicke Stanzbiopsien entnommen und in das Empfängerblöckchen im Abstand von 0,8 mm mit Hilfe des speziellen Stanzgerätes (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, Maryland) eingebracht. Es entsteht ein TMA- Blöckchen mit 500 Stanzbiopsien, welches dreimal aus dem gleichen Gewebematerial erstellt wird. Durch die

Entnahme von zwei Stanzbiopsien pro Patientin und Tumor und durch das Erstellen von drei Blöckchen wird eine bessere statistische Auswertbarkeit gewährleistet.

Jedes Blöckchen hat ein Raster mit fünf Quadranten bestehend aus 100 Stanzen, die Gewebematerial von 50 Tumoren enthalten. Die einzelnen Quadrate werden mit römisch I- V nummeriert und die einzelnen Stanzen des Quadrates werden als Koordinaten abgelesen; in der Horizontalen von A bis J und in der Vertikalen von 1 bis 10. Jede Stanzbiopsie kann so einem Patientennamen mit den zugehörigen Daten zugeordnet werden.

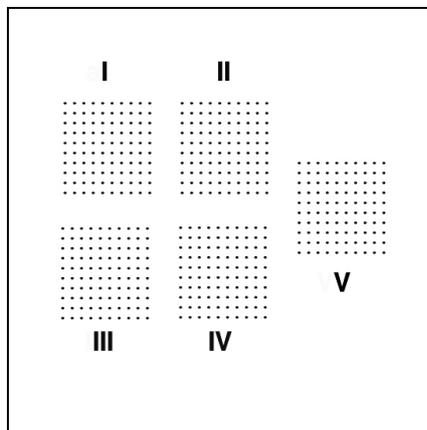


Abbildung 2: Mikroarray Blöckchen

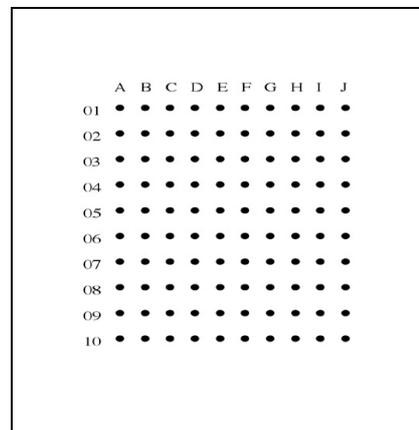


Abbildung 3: Quadrat vergrößert

Die obere Abbildung (Abb. 2) zeigt ein schematisches Mikroarray Blöckchen mit der römischen Nummerierung von I- V der einzelnen Quadranten. Daneben (Abb. 3) ist schematisch ein Quadrat vergrößert dargestellt, wo die Beschriftung jeder einzelnen Stanze nach dem Koordinatensystem zu sehen ist.

3.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Durch immunhistochemische Untersuchungen können Antigene auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Der Nachweis basiert auf Antigen- Antikörperreaktion.

1. Zunächst werden 2-3 μm dicke **Schnitte** der TMA- Blöckchen angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht.
2. Dann erfolgt die **Trocknung** der Schnittpräparate bei 56° über Nacht.
3. Die **Entparaffinisierung** der auf Raumtemperatur abgekühlten Schnittpräparate wird durch
 - Inkubation derselben für 2 X 10 min in Xylol
 - Inkubation in Alkohol (99%) für 2 X 5 min.
 - Inkubation in Alkohol (96%) für 5 min.
 - Inkubation in Alkohol (80%) für 5 min.
 - Inkubation in Alkohol (70%) für 5 min.
 - und schließlich durch die zweifache Rehydratisierung mit Aqua dest. erreicht.
4. Die Schnitte werden mit 10mM Citratlösung versetzt und im Steamer 35 min. auf 100° **erhitzt**. Die Abkühlung erfolgt mit kaltem Leitungswasser.
5. Die **Färbung** der Schnitte erfolgt mit Hilfe der Labelled- Strept- Avidin- Biotin- Methode (LSAB). Diese Methode beruht auf der Bindung von Biotin an Avidin. Dabei bindet Biotin an den einen Antikörper (ER, PR, *c-erbB2*, p53, Mib-1, bcl-2 und Cyclin D1), dieser Komplex bindet wiederum an durch alkalische Phosphatase markiertes Streptavidin. Wenn Chromogen hinzugefügt wird, führt dies durch die alkalische Phosphatase zu einer Rotfärbung des Komplexes.
 - Befeuchtung der Schnitte mit Waschpuffer
 - Benetzung mit dem monoklonalen Primärantikörper ER, PR, *c-erbB2*, p53, Mib-1, bcl-2 und Cyclin D1. Die Verdünnungen sind der unten abgebildeten Tabelle zu entnehmen:

Primärantikörper	Vorbehandlung	Verdünnung	Firma
ER	LSAB- Methode	1:200	DAKO
PR	LSAB- Methode	1:1000	DAKO
c-erbB-2	LSAB- Methode	1:4000	DAKO
P53	LSAB- Methode	1:2000	DAKO
Mib-1	LSAB- Methode	1:100	DAKO
bcl-2	LSAB- Methode	1:1000	DAKO
Cyclin D1	LSAB- Methode	1:800	DAKO

Tabelle 5: Verdünnung der Primärantikörper

- Inkubation im Stainer für 25 min.
 - Spülung mit Waschpuffer
 - Benetzung mit Biotin- Antikörper
 - Inkubation im Stainer für 25 min.
 - Spülung mit Waschpuffer
 - Inkubation mit enzymmarkiertem Streptavidin für 25 min.
 - Spülung mit Waschpuffer
 - Färbung durch Hinzugabe von Chromogen für 2 x 25 min.
 - Benetzung mit Aqua dest.
 - Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin
 - Bläuvorgang unter fließendem Leitungswasser
6. **Konservierung** der Schnitte mit Vitro Clud nach Behandlung derselben mit Alkohol (70%,80%,96%,99%) und zweimaliger achtminütiger Zugabe von Xylol.

3.4 Lichtmikroskopische Auswertung

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden nur membranständige Reaktionen mit in die Wertung genommen. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ nach den Bewertungskriterien von Korsching (Korsching et al., 2002).

Positiv für die Expression von ER und PR waren Tumoren, deren Zellkerne zu mindestens 2% eine Färbung aufwiesen.

Positiv für bcl-2 waren die Tumoren, in denen zumindest 1% der Zellen eine zytoplasmatische Färbung aufwies.

Positiv für Cyclin D1 waren Tumoren, deren Zellkerne zu 5% eine Färbung aufwiesen.

Für p53 wurden die Tumoren mit 0 gewertet, die keine Färbung aufwiesen.

Die Wertung 1 bedeutete 1- 25%, 2 = 26- 50% und 3= mehr als 50% der Zellkerne zeigten eine Färbung.

Für Ki-67/ Mib-1 bedeutet die Wertung 0 eine Färbung von weniger als 2% der Zellkerne, 1= 2- 10%, 2= 11- 25% und 3= mehr als 25% der Zellkerne sind gefärbt.

Bei *c-erbB2* war die Intensität der Färbung der Zellmembran ausschlaggebend für die Wertung (0= keine Färbung, 1= schwach, 2= mittel, 3= stark).

Da die Zahl 0 für die statistische Auswertung Probleme bereitet, wird für die Berechnungen 0= 1, 1= 2, 2= 3 und 3= 4 gesetzt.

	1	2	3	4
ER	Negativ	Schwach positiv	Mittel	Stark positiv
PR	Negativ	Schwach positiv	Mittel	Stark positiv
bcl-2	Negativ	Positiv	Stark positiv	-----
Cyclin D1	Negativ	>2%	-----	-----
p53	Negativ	1-25%	26-50%	>50%
Ki-67	Negativ	2-10%	11-25%	>25%
<i>c-erbB2</i>	Negativ	Schwach positiv	Mittel	Stark

Tabelle 6: Beschreibung der Beurteilung der untersuchten Antikörper

4 Ergebnisse

Es wurden 222 Patientinnenfälle untersucht. Bei diesen Patientinnen waren das Geburtsdatum und das Alter bei der Biopsieentnahme bekannt. Die Patientinnen wurden postoperativ graduiert und mittels der TNM- Kategorie eingeteilt. Das Beobachtungsintervall der Patientinnen lag zwischen 0 und 76 Monaten. In dieser Zeit wurden die Patientinnen auf Rezidive und Metastasen untersucht.

Altersverteilung

Der Alterdurchschnitt der Patientinnen lag bei 55,16.

Die jüngste Patientin war zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 13 Jahre alt, die älteste 84 Jahre.

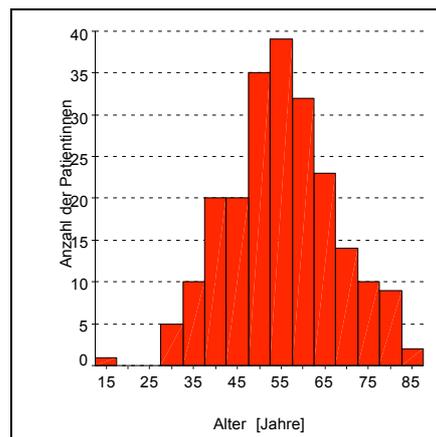


Abbildung 4: Altersverteilung der Patientinnen

Auswertbare Ergebnisse der untersuchten Tumormarker in %

Durchschnittlich waren von den 222 untersuchten Tumoren 192 Tumore für die Tumormarker auswertbar.

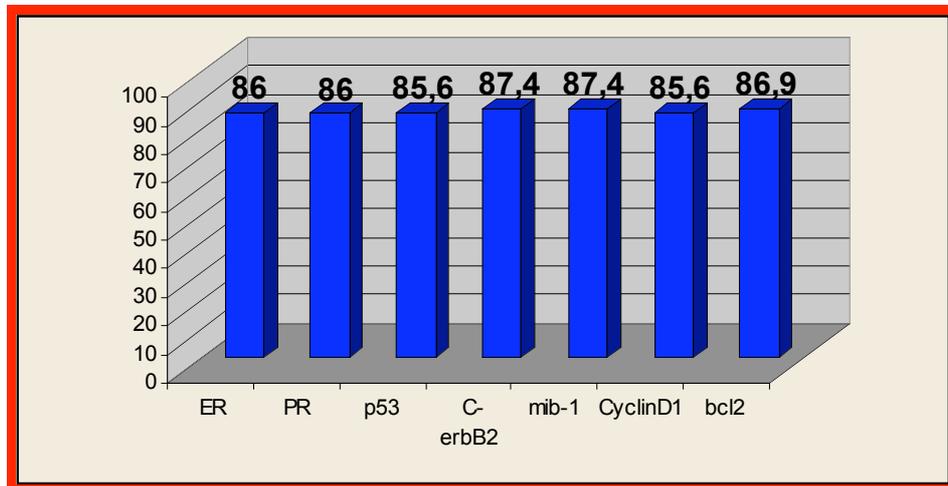


Abbildung 5: Auswertbare Ergebnisse der untersuchten Tumormarker in %

Grading

Die folgende Graphik zeigt das Grading der Patientinnen.

Bei 13,6% der Patientinnen wurden als G= 1, 56,4% der Patientinnen als G= 2 und 30% der Patientinnen als G= 3 graduiert.

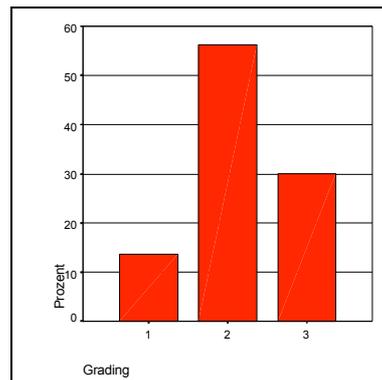


Abbildung 6: Grading

Tumorgröße

Die folgende Graphik zeigt das T-Stadium (Tumorgröße) der Patientinnen.

36,8% der Patientinnen wurden als T1, 39,6% der Patientinnen als T2, 7,6% der Patientinnen als T3 und 16,0% der Patientinnen als T4 klassifiziert.

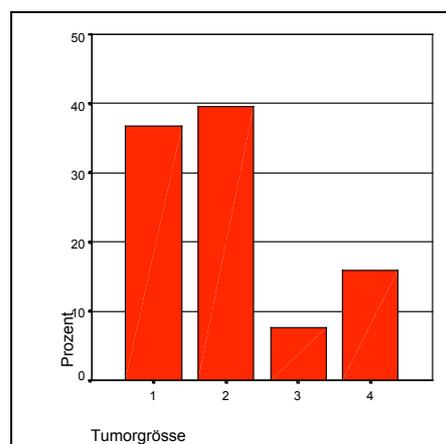


Abbildung 7: Tumorgröße

Lymphknotenstatus

Die folgende Graphik zeigt den Lymphknotenstatus der Patientinnen.

49,6% der Patientinnen waren N0, 29,1% N1 sowie 21,3% der Patientinnen N2.

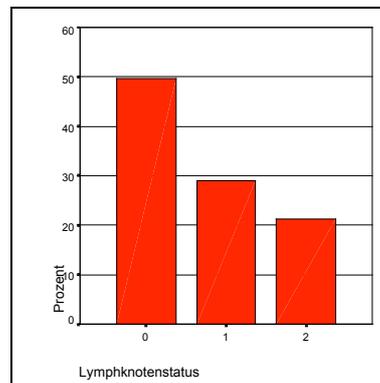


Abbildung 8: Lymphknotenstatus

Metastasen

89,4% der Patientinnen weisen keine Metastasen auf (M= 0) und 10,6% der Patientinnen weisen Metastasen auf.

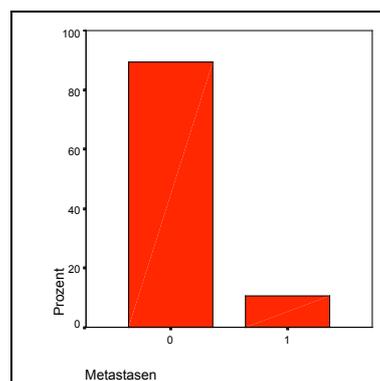


Abbildung 9: Metastasen

Die Graphiken Altersverteilung, Grading, Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Metastasen wurden mit dem Statistikprogramm spss Version 7,5 erstellt.

Ergebnisse der untersuchten Tumormarker

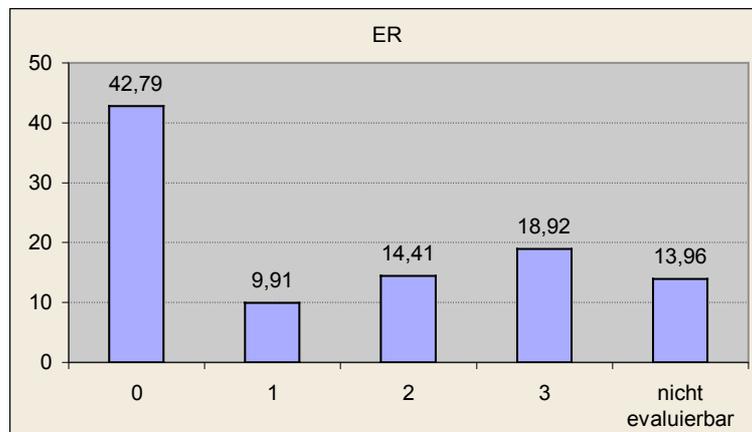


Abbildung 10: ER

(0=negativ 1=schwach positiv 2=positiv 3=stark positiv)

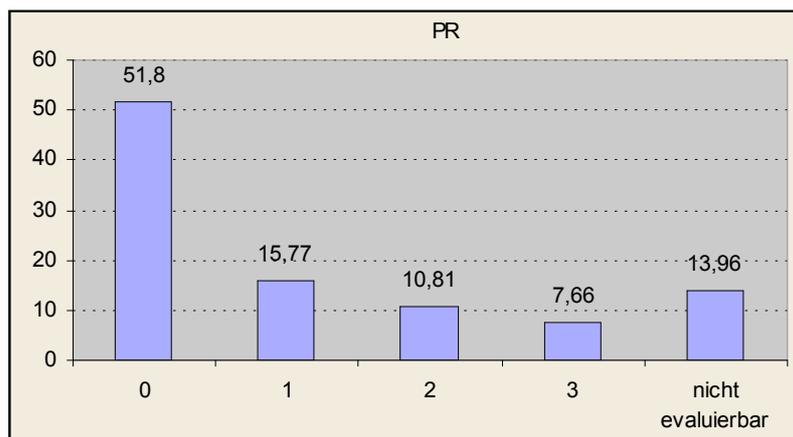
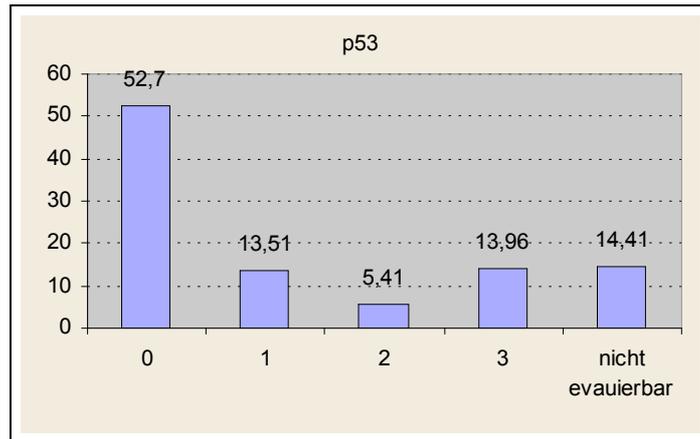
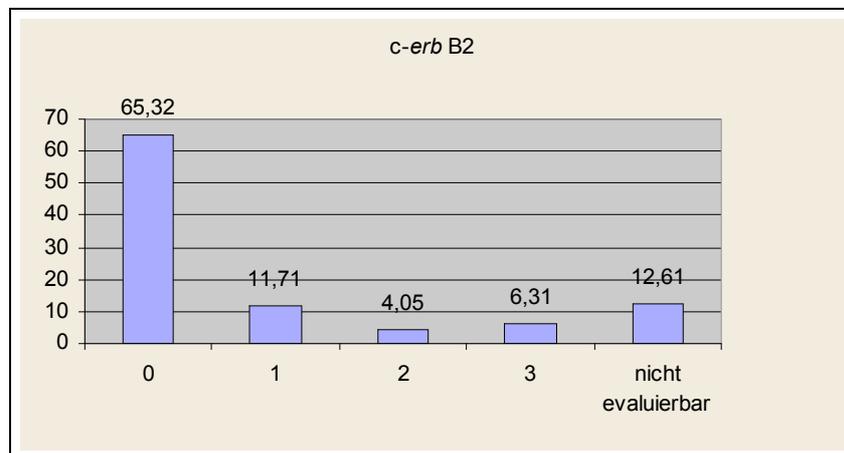


Abbildung 11: PR

(0=negativ 1=schwach positiv 2=positiv 3=stark positiv)

**Abbildung 12: p53**

(0=negativ 1=schwach positiv 2=positiv 3=stark positiv)

**Abbildung 13: c-erbB2**

(0=negativ 1=schwach positiv 2=positiv 3=stark positiv)

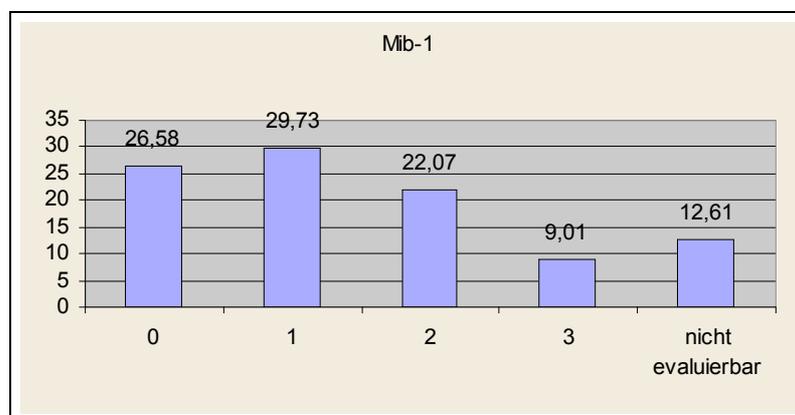
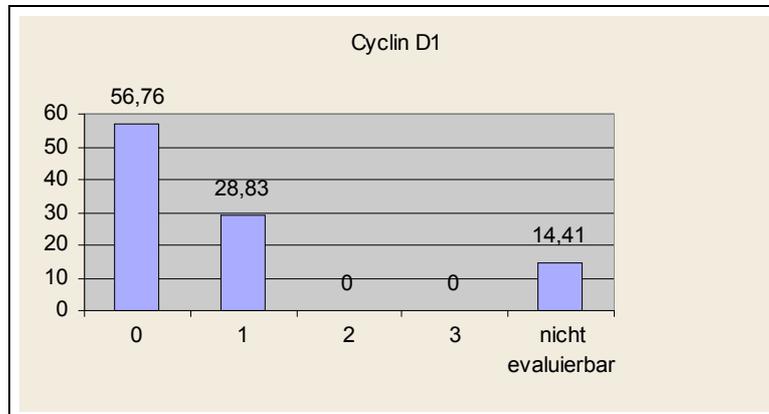
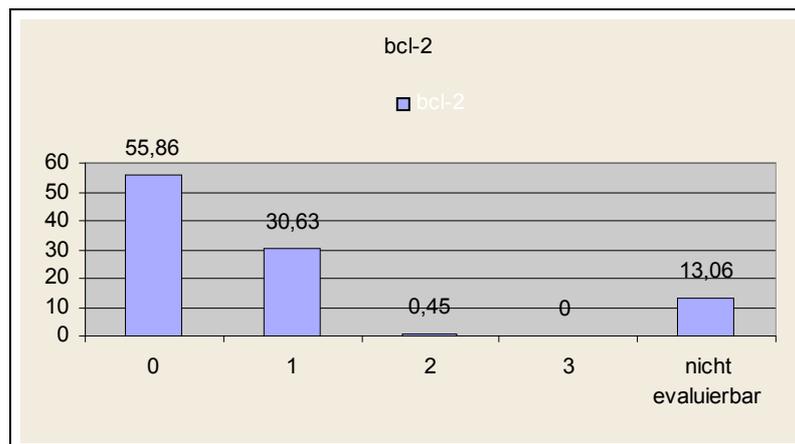


Abbildung 14: Mib-1

(0=negativ 1=schwach positiv 2=positiv 3=stark positiv)

**Abbildung 15: Cyclin D1**

(0=negativ 1=schwach positiv 2=positiv 3=stark positiv)

**Abbildung 16: bcl-2**

(0=negativ 1=schwach positiv 2=positiv 3=stark positiv)

Die Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2000 erstellt.

Nichtparametrische Korrelationen

	PR	ER	p53	c-erbB2	Mib-1	Cyclin D1	bcl-2
PR	.	0,000	0,551	0,134	0,002	0,000	0,000
ER	**	.	0,193	0,735	0,010	0,000	0,000
p53	n.s.	n.s.	.	0,005	0,000	0,893	0,668
c-erbB2	n.s.	n.s.	*	.	0,614	0,062	0,377
Mib-11	*	*	**	n.s.	.	0,420	0,331
Cyclin D1	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	.	0,009
bcl-2	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	.

Tabelle 7: Nichtparametrische Korrelationen

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig), somit hoch signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

n.s. Die Korrelation ist nicht signifikant.

Die Signifikanzen wurden nach Kendall-Tau-B mit dem Statistikprogramm spss Version 11.5 bestimmt.

Überlebensfunktionen

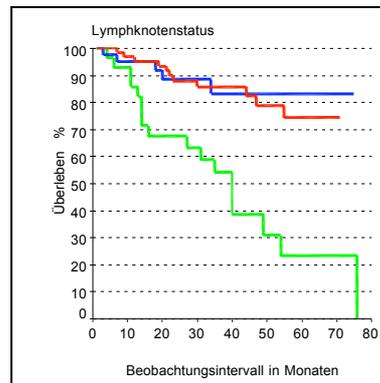


Abbildung 17: Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus

— 0 (N=0) — 1 (N=1) — 2 (N=2)

$p \leq 0,001$ die Funktion ist signifikant

Für die folgenden Überlebensfunktionen sind die Gruppen der einzelnen Prognosefaktoren dichotomisiert worden. Das bedeutet hier, dass die markerpositiven Fälle (schwach positiv bis stark positiv) nicht differenziert sind sondern zu einer Gruppe zusammengelegt worden sind und den markernegativen Fällen gegenübergestellt werden. Die Dichotomisierung führt zu grösseren Fallzahlen in einer Gruppe und somit zu aussagekräftigeren Ergebnissen.

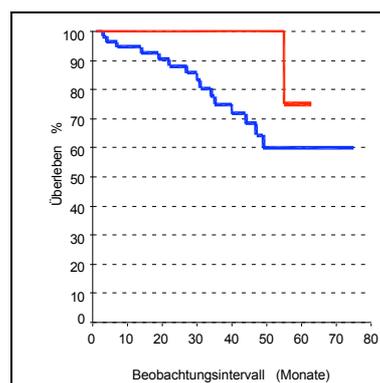


Abbildung 18: Überleben in Abhängigkeit von ER

— 0 (negativ) — 1 (positiv)

$p = 0,1455$ die Überlebensfunktion ist nicht signifikant

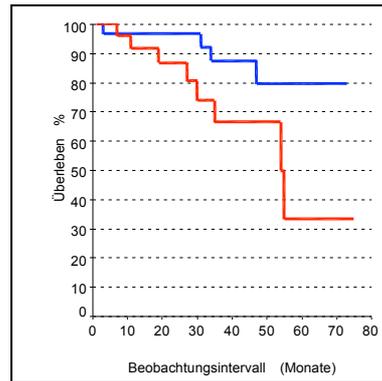


Abbildung 19 Überleben in Abhängigkeit von PR

— 0 (negativ) — 1 (positiv)

$p=0,3128$ die Überlebensfunktion ist nicht signifikant

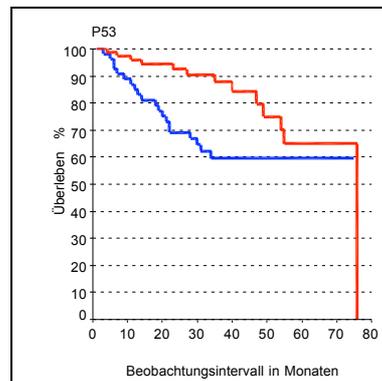


Abbildung 20: Überleben in Abhängigkeit von p53

— 0 (negativ) — 1 (positiv)

$p= 0,0152$ die Überlebensfunktion ist signifikant

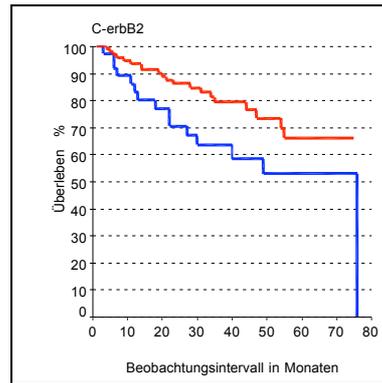


Abbildung 21: Überleben in Abhängigkeit von c-erbB2

— 0 (negativ) — 1 (positiv)

$p = 0,0485$ die Überlebensfunktion ist signifikant

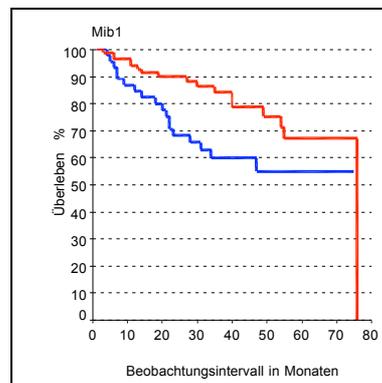


Abbildung 22: Überleben in Abhängigkeit von Mib-1

— 0 (negativ) — 1 (positiv)

$p = 0,0200$ die Überlebensfunktion ist signifikant

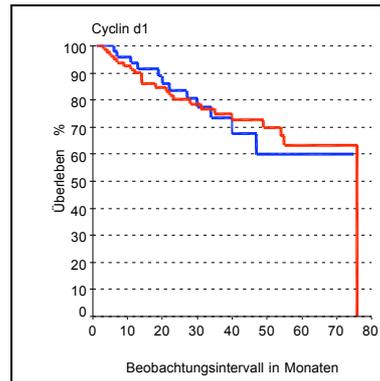


Abbildung 23: Überleben in Abhängigkeit von Cyclin D1

— 0 (negativ) — 1 (positiv)

$p = 0,9118$ die Überlebensfunktion ist nicht signifikant

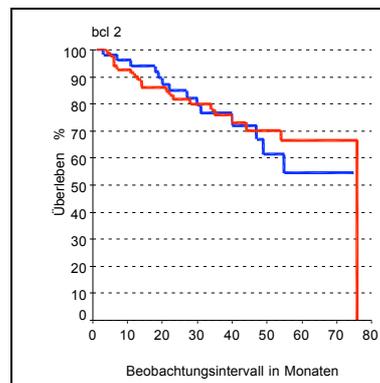


Abbildung 24: Überleben in Abhängigkeit von bcl-2

— 0 (negativ) — 1 (positiv)

$p = 0,7312$ die Überlebensfunktion ist nicht signifikant

Die Überlebensfunktionen wurden mit dem Statistikprogramm spss Version 11.5, Log-Rank Test erstellt

Lichtmikroskopische Auswertung der Prognosefaktoren

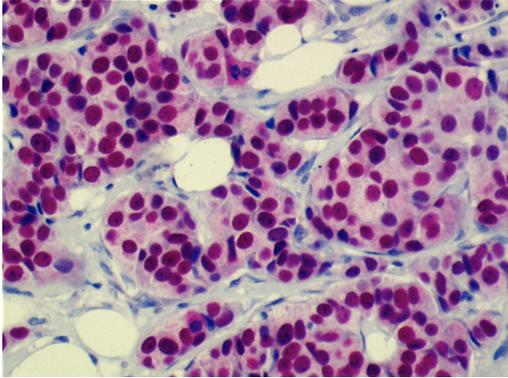


Abbildung 25: ER

Immunhistochemischer Nachweis des Östrogenrezeptors (ER).

Es findet sich eine stark positive Reaktion für ER in mehr als 95% der Zellkerne.

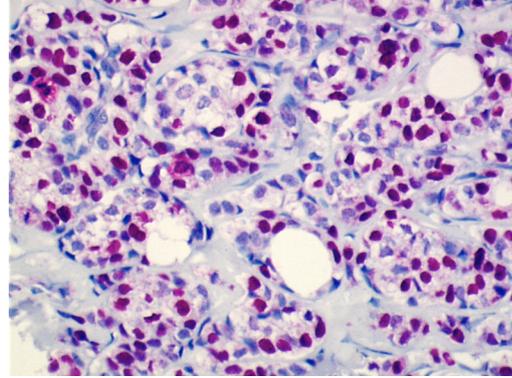


Abbildung 26: p53

Immunhistochemischer Nachweis von p53.

Es findet sich eine stark positive Reaktion für p53 in über 80% der Zellkerne.

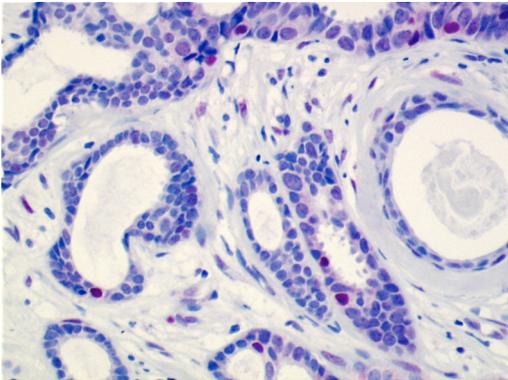


Abbildung 27:p53

Immunhistochemischer Nachweis von p53.

Es findet sich eine schwach positive Reaktion für p53 in ca. 10% der Zellkerne.

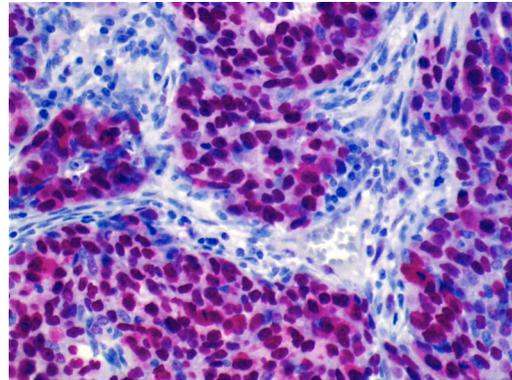


Abbildung 28: p53

Immunhistochemischer Nachweis von p53.

Es findet sich eine stark positive Reaktion in über 80% der Zellkerne

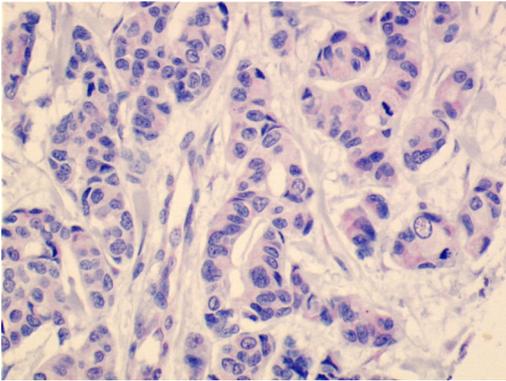


Abbildung 29: p53

Immunohistochemischer Nachweis von p53.
Es findet sich keine Reaktion für p53 in den Zellkernen.

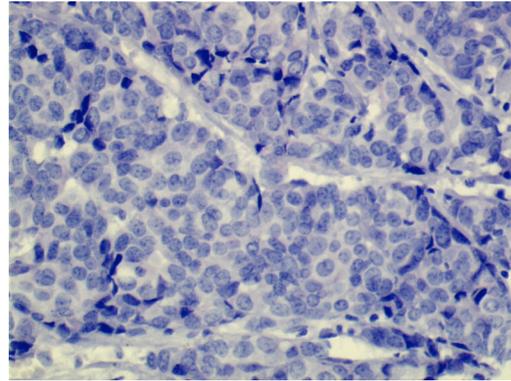


Abbildung 30: c-erbB2

Immunohistochemischer Nachweis von
c-erbB2.
Es findet sich keine Reaktion für c-erbB2 in
den Zellmembranen.

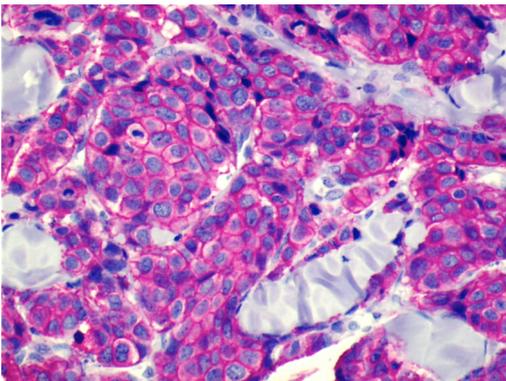


Abbildung 31: c-erbB2

Immunohistochemischer Nachweis von
c-erbB2.
Es findet sich eine stark positive Reaktion
(3plus) für c-erbB2 in nahezu allen
Zellmembranen.

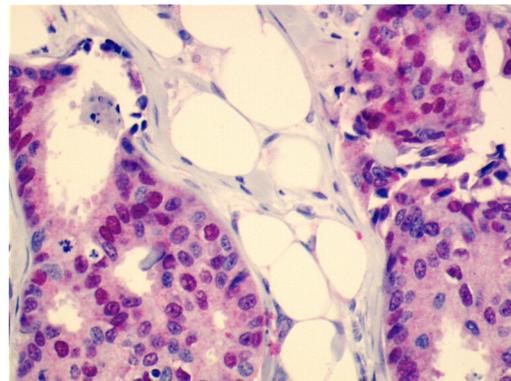


Abbildung 32: Cyclin D1

Immunohistochemischer Nachweis von
Cyclin D1.
Es findet sich eine mittelstark positive
Reaktion für Cyclin D1 in 70% der Zellkerne.

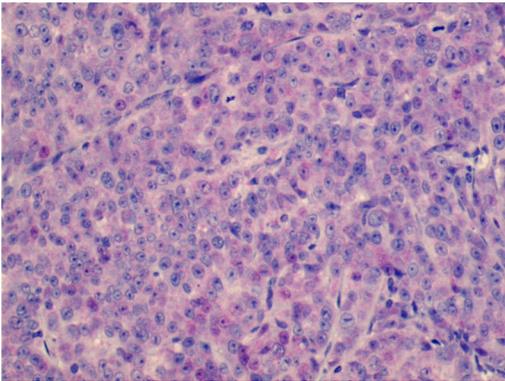


Abbildung 33: Cyclin D1

Immunhistochemischer Nachweis von Cyclin D1.

Es findet sich keine Reaktion für Cyclin D1 in den Zellkernen.

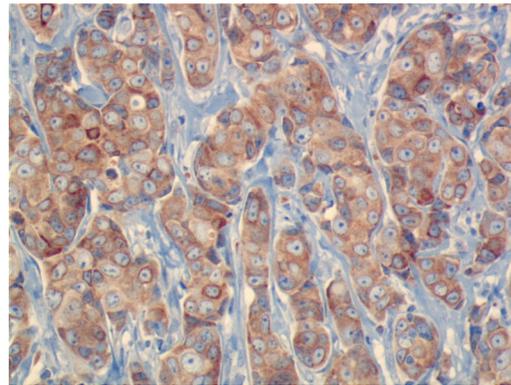


Abbildung 34: bcl-2

Immunhistochemischer Nachweis von bcl-2.

Es findet sich eine starke Reaktion für bcl-2 im Zytoplasma von nahezu allen Tumorzellen.

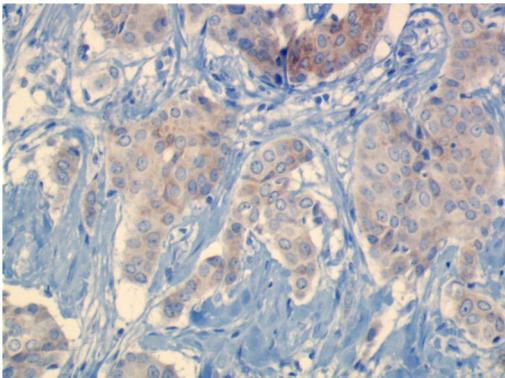


Abbildung 35: bcl-2

Immunhistochemischer Nachweis von bcl-2.

Es findet sich eine schwach positive Reaktion für bcl-2 im Zytoplasma einiger Tumorzellen.

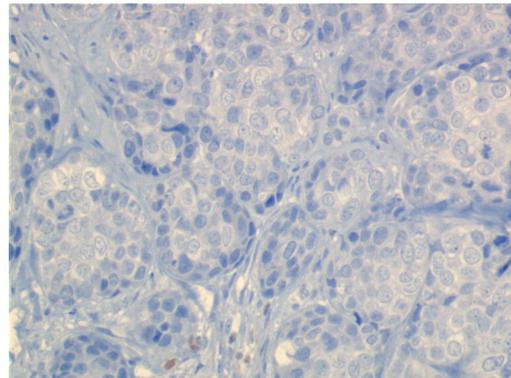


Abbildung 36: bcl-2

Immunhistochemischer Nachweis von bcl-2.

Es findet sich keine Reaktion für bcl-2 im Zytoplasma der Tumorzellen.

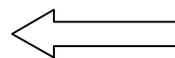
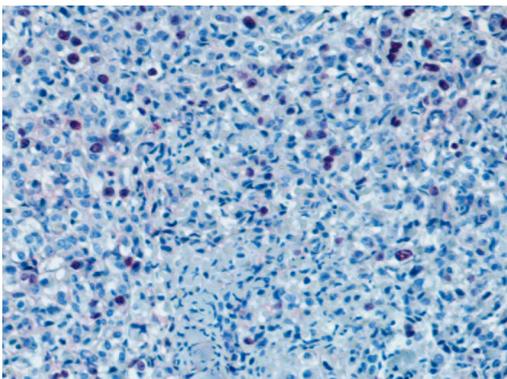


Abbildung 37: Mib-1

Immunhistochemischer Nachweis von Mib-1.

Es findet sich eine positive Reaktion für Mib-1 in ca. 20% der Zellkerne.

5 Diskussion

Seit der Entschlüsselung des humanen Genoms sind zahlreiche Proteine bekannt geworden, die nun den schon lange bekannten Krankheitsbildern zugeordnet werden können. Auf dem Gebiet der Krebsforschung ist die Relevanz einiger Proteine für den Verlauf von Tumorerkrankungen von großem Interesse. Da das Mammakarzinom eines der häufigsten Todesursachen bei Frauen darstellt und weltweit eine grosse Zahl von Neuerkrankungen auftreten, ist das Bestreben gross, sicherere Aussagen über die Prognose und Prädiktion zu treffen und die Therapiemethoden adäquater für die betroffene Patientin auszuwählen.

Im vergangenen Jahrzehnt wurden viele Untersuchungen auf dem Gebiet der Tumormarker unternommen, jedoch blieb stets die Hürde der Standardisierung der Untersuchungsmethoden, so dass viele Untersuchungen nicht zuletzt aufgrund unterschiedlicher Methoden zu widersprüchlichen Ergebnissen bei demselben Tumormarker kamen.

Beim Mammakarzinom können neu entdeckte Gene/ Proteine als klinisch bedeutsame Prognosefaktoren dienen. Dabei hat die Bestimmung von Prognosefaktoren und prädiktiven Faktoren das Ziel, den Krankheitsverlauf und das Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen für die jeweilige Patientin vorauszusagen. Aus diesem Grund wird versucht, bekannte Gewebemarker hinsichtlich ihrer prognostischen und prädiktiven Relevanz zu untersuchen und auch neue Marker zu entdecken. Um aussagekräftige Ergebnisse über die Relevanz der Marker zu erhalten, waren bisher zeitaufwändige und teure immunhistochemische Untersuchungen in großer Anzahl notwendig. Zur Vereinfachung der immunhistochemischen Untersuchungen wurden in der Vergangenheit zahlreiche Methoden wie zum Beispiel das sogenannte sausage- Verfahren beschrieben. Die von Kononen et al. im Jahre 1998 beschriebene Methode der Tissue Mikroarrays zeichnet sich im Vergleich zu allen vorher beschriebenen Verfahren durch ihre hohe Präzision und dennoch zeitsparende und kosteneffiziente Technik aus.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, TMA's zu konstruieren, um daran die prädiktive und prognostische Relevanz von ER, PR, p53, *c-erbB-2*, Mib-1, bcl-2, und Cyclin D1 beim Mammakarzinom in einem speziellen Kollektiv von 222 Patientinnen zu untersuchen, und anhand dessen, die Möglichkeiten und Schwierigkeiten der TMA- Methode zu definieren.

Als Grundlage für die Evaluation der Prognosefaktoren diente die derzeit gültige Kategorisierung des amerikanischen Pathologenkollegs (Fitzgibbons et al., 1999 und Hammond et al., 2000):

Die Prognosefaktoren der 1. Kategorie wie TNM- Status, histologischer Typ, Grading, Mitoserate, Hormonrezeptorstatus gelten als gesicherte, gut untersuchte Faktoren von prognostischer und/oder prädiktiver Relevanz und sind klinisch etablierte Faktoren. Sie werden routinemässig bei den Patientinnen bestimmt.

Die Prognosefaktoren der 2. Kategorie wie *c-erbB2* und p53 sind prognostische und /oder prädiktive Faktoren, die biologisch gut untersucht, jedoch erst in wenigen klinischen Studien überprüft worden sind.

Zu der 3. Kategorie gehören Faktoren wie Mib-1/Ki-67, bcl-2 und Cyclin D1. Diese Faktoren können weder der 1. Kategorie, noch der 2. Kategorie zugeordnet werden. Es gilt, die Relevanz dieser Faktoren für die Prognose bzw. Prädiktion noch herauszustellen.

c-erbB2

In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir eine Korrelation für die Expression von *c-erbB2* mit einer verkürzten Überlebensdauer nachweisen.

c-erbB2 ist das am häufigsten überexprimierte/ amplifizierte Onkogen beim Mammakarzinom (Eidtmann et al., 1995, Simon et al., 2001). Slamon et al. beschrieben im Jahre 1987 als erste, dass dieses Onkoprotein prognostische Relevanz besaß (Slamon et al., 1987). Die Überexpression von *c-erbB2* korrelierte mit einer schlechteren Prognose für die Patientin (Yarden, 2001), da

sie mit einem schlechterem Grading und einer geringeren Überlebensdauer einherging (Fitzgibbons et al., 1998, Ross et al., 2003, Schindlbeck et al., 2005). Doch auch als prädiktiver Faktor hat *c-erbB2* in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen (Hammond et al., 2000). Bei *c-erbB2*-Positivität (Überexpression) schlugen die Patientinnen weniger gut auf Hormontherapien wie Tamoxifen an (Ross et al., 1998, Fitzgibbons et al., 1999, Menard et al., 2001, Tumorzentrum München 2005).

Patientinnen mit *c-erbB2*-positivem Mammakarzinom profitierten von der medikamentösen Therapie mit Trastuzumab- Handelsname Herceptin von der Firma Roche- und wiesen eine längere Gesamtüberlebenszeit auf (Konsensuskonferenz: Goldhirsch et al., 2005, Simon et al., 2001, Meng et al., 2004, Piccard- Gebhart et al., 2005, Tumorzentrum München 2005). Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der an den extrazellulären Teil von *c-erbB2* bindet (Ross et al., 2003, Schindlbeck et al., 2005). Das Medikament war besonders wirksam, wenn es länger als ein Jahr verabreicht wurde (Early Breast Cancer Trialists` Collaborative Group, 2005). Neuere Studien untersuchten die Kombination von Herceptin mit Taxanen, um die unerwünschten Wirkungen von Herceptin bei *c-erbB2*-Positivität zu verringern und einen synergistischen Effekt zu erzielen (Marty et al., 2005, Joensuu et al., 2006).

Im Zusammenhang mit der o.g. medikamentösen Therapie wird der prädiktive Wert von *c-erbB2* und somit die Notwendigkeit seiner Bestimmung deutlich.

p53

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich p53 waren signifikant und spiegelten die Aussagen aus der Literatur wider. Die Überlebensgraphik ließ erkennen, dass Patientinnen mit p53-Mutationen eine kürzere Überlebensdauer aufwiesen. Das Tumorsuppressorgen p53 wird bei Mutation in eine inaktive Form umgewandelt und dient auch der Tumorprognose. Die Träger der mutierten Form des p53 Gens litten an aggressiveren Formen des Mammakarzinoms, verbunden mit einem schlechterem Grading (Isola et al., 1992, Tsuda et al., 1994, Cattoretti et al., 1988, Fitzgibbons et al., 1999). Die somatischen Mutationen treten spontan

auf, können aber auch in Zusammenhang mit Keimbahnmutationen wie dem Li-Fraumeni- Syndrom stehen. Die Relevanz von p53 als Prognosefaktor ist umstritten. Das amerikanische Pathologenkolleg gab die vorsichtige Erklärung ab, dass p53 Mutationen prognostische Wichtigkeit besonders bei nodal-negativen Patientinnen haben können und auch das Ansprechen auf eine Chemo- bzw. Radiotherapie vorhersagen, während Veronesi et al. im Jahre 2005 p53 Mutationen im Zusammenhang mit einem reduzierten Ansprechen auf eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie sahen (Veronesi et al., 2005).

Jedoch gab es keine Einigung auf die routinemässige Bestimmung von p53 Mutationen (Fitzgibbons et al., 1999, Bast et al., 2001).

Ki-67/ Mib1

Der Proliferationsmarker Ki-67 war besser durch seinen monoklonalen Antikörper Mib-1 zu bestimmen, da Ki-67 labil und im fixierten Gewebe nicht mehr bestimmbar ist. In dieser Arbeit wurde Mib-1 bestimmt. Die Ergebnisse dieser Arbeit waren bezüglich Mib-1 signifikant und zeigten, dass Mib-1-positive Patientinnen eine kürzere Überlebensdauer hatten. Des Weiteren korrelierte Mib-1 hoch signifikant mit p53 und signifikant mit ER und PR. Diese Ergebnisse stimmten mit denen in der Literatur angegebenen Daten über Ki-67 überein (Rudolph et al., 1999, Brown et al., 1996, Gasparini et al., 1994).

Ki-67 ist ein nukleäres Protein, dessen Quantität als Maß für die Zellproliferationsrate dient. Ki-67 galt bei Patientinnen mit Mammakarzinom als ein Marker, der mit verminderter Überlebenszeit korrelierte (Mirza et al., 2002, Rudolph et al., 1999, Harbeck et al., 1998). Das amerikanische Pathologenkolleg evaluierte Ki-67 als einen Marker für schlechte Prognose. Jedoch ist er noch nicht ausreichend untersucht, um in die routinemässige Bestimmung aufgenommen zu werden. Es werden zukünftige Untersuchungen vonnöten sein, um die prognostische Relevanz von Ki-67 zu bestimmen (Fitzgibbons et al., 1999).

bcl- 2

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich bcl-2 waren nicht signifikant und zeigten im Kaplan-Meier-Diagramm zunächst eine positive Korrelation der Überlebensdauer mit der Expression von bcl-2. Nach ca. 35-40 Monaten zeigten die Patientinnen mit bcl-2 Expression dann eine geringere Überlebensdauer im Vergleich zu den Patientinnen, die bcl-2 nicht exprimierten. bcl-2 korrelierte hoch signifikant mit ER, PR und Cyclin D1.

In dem Statement des amerikanischen Pathologenkollegs wurde bcl-2 als ein Marker für gute Prognose und längeres Überleben beschrieben. bcl-2 korrelierte gut mit Östrogenrezeptorpositivität und sollte gutes Ansprechen auf das Antiöstrogen Tamoxifen voraussagen (Fitzgibbons et al., 1999, Leung et al., 1999). Jedoch bestand über die prognostische Relevanz von bcl-2 keine eindeutige Übereinstimmung in der Literatur. Während Hellemans et al. im Jahre 1995 in ihrer Studie zu dem Schluss kamen, dass bcl-2 bei nodal-negativen Patientinnen keine prognostische Bedeutung besaß, vertraten Gee et al. im Jahre 1994, Visscher et al. im Jahre 1996, Elledge et al. im Jahre 1997 und Leung et al. im Jahre 1999 die Meinung, dass bcl-2 mit dem Östrogenrezeptor korrelierte und ein Marker für gute Prognose war.

Cyclin D1

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich Cyclin D1 waren nicht signifikant. Sie zeigten in der Kaplan-Meier-Analyse, dass die Patientinnen, die Cyclin D1 exprimierten, nach ca. 30 Monaten ein kürzeres Überleben aufwiesen. Cyclin D1 korrelierte hoch signifikant mit ER und PR.

Cyclin D1 ist an dem Prozess der Zellregulation beteiligt und wird bei ca. der Hälfte aller Mammakarzinome überexprimiert. Die Überexprimierung von Cyclin D1 wurde mit einer schlechten Prognose und einem aggressiveren Krankheitsverlauf in Verbindung gesetzt (Umekita et al., 2002, Coradini et al., 2004), wobei unterschiedliche Auffassungen darüber bestanden, ob dies bei ER-positiven oder –negativen Patientinnen der Fall war. (Kenny et al., 1999,

Umekita et al., 2002). Es galt, die prognostische Relevanz von Cyclin D1 und seine Korrelation zu ER und PR noch zu klären (Kenny et al., 1999, Umekita et al., 2002, Thomsen et al., 2003, Coradini et al., 2004). In den Statements der anerkannten Gesellschaften (Fitzgibbons et al., 1999, Bast et al., 2001) wurde Cyclin D1 nicht erwähnt. Um als routinemässig untersuchter Prognosefaktor anerkannt zu werden, muss die klinische Relevanz von Cyclin D1 durch zahlreiche zukünftige Studien noch belegt werden.

Progesteronrezeptor

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine längere Überlebensdauer der Patientinnen bei Progesteronrezeptorpositivität. Im Kaplan- Meier- Diagramm war eine positive Korrelation von Überlebensdauer und der Expression von PR zu sehen. Nach 50 Monaten zeigte das Diagramm einen drastischen Abfall der Überlebensdauer der Patientinnen, die den Progesteronrezeptor nicht exprimierten.

Die Bestimmung des Progesteronrezeptors beim Mammakarzinom gehört heute ebenfalls wie die des Östrogenrezeptors zu den routinemässig bestimmten Faktoren. Der Progesteronrezeptorstatus wird oftmals gemeinsam mit dem Östrogenrezeptorstatus erwähnt, ist jedoch unabhängig von diesem. In der Literatur waren die Angaben bezüglich der längeren Gesamtüberlebenszeit bei Progesteronrezeptorpositivität positiv (Jänicke, 2002) und somit zu vergleichen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Schnitt fasste in seinem Review von 2001 zusammen, dass der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor) jedoch nur geringe Bedeutung im Bezug auf die Prognostik hatte, jedoch ein starker prädiktiver Faktor im Bezug auf das Ansprechen Hormonrezeptor- positiver Patientinnen auf Hormon- bzw. Antiöstrogentherapie war (Schnitt , 2001). Patientinnen, die Östrogenrezeptornegativ waren aber eine Progesteronrezeptorpositivität aufwiesen, sollten demnach eine adjuvante Hormontherapie erhalten (National Institutes of Health Consensus Panel, 2001).

Östrogenrezeptor

Im Vergleich zur einschlägigen Literatur konnten wir in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation von positivem Östrogenrezeptorstatus und besserem Überleben nicht belegen. Vielmehr zeigte die Kaplan-Meier Auswertung einen Überlebensvorteil für die Östrogenrezeptor- negativen Patientinnen im Vergleich zu den ER positiven Patientinnen, d.h., dass die letzteren nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine kürzere Überlebensdauer aufwiesen. Ein Grund für das im Vergleich zur Literatur unterschiedliche Ergebnis könnte sein, dass das dieser Arbeit zugrunde liegende Patientenkollektiv zu klein und stark risikobehaftet war. Gegen diesen Grund sprachen jedoch teilweise die Ergebnisse der anderen untersuchten Prognosefaktoren (PR, *c-erbB2*, p53, bcl-2, Mib-1 und Cyclin D1), die bezüglich der Überlebenserwartung der Patientinnen mit den in der Literatur angegebenen Auffassungen übereinstimmten.

Ein weiterer Grund für das vorgelegene Ergebnis könnte die Tatsache gewesen sein, dass das untersuchte, in Paraffin eingebettete Material des Kollektivs relativ alt war und das Material seiner Zeit nicht optimal aufgearbeitet wurde. Das Material unterlag zum Beispiel wechselnden Fixationsbedingungen. Mitte der 90er Jahre wurde der Östrogenrezeptor noch biochemisch nachgewiesen. Erst ein Jahrzehnt später wurde allgemein die Immunhistochemie als Nachweismethode genutzt. Trotzdem stellte sich die Frage, warum die Ergebnisse der anderen untersuchten Proteine demnach nicht fehlerbehaftet waren. Eine Erklärung liegt in der Tatsache, dass der Antikörper zum Nachweis des Östrogenrezeptors wesentlich anfälliger und labiler im Bezug auf die Methodik war als zum Beispiel der Antikörper für p53, welches auch der stabilste Antikörper der untersuchten Proteine war. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass für p53 signifikante Ergebnisse gezeigt werden konnten.

Der Östrogenrezeptor gilt heute als ein anerkannter Prognosefaktor, der routinemäßig beim Mammakarzinom bestimmt wird (Pertschuk et al., 1990; Molino et al., 1997; Allred et al., 1998, Fitzgibbons et al., 1999, Jänicke , 2002). Die erste Publikation bezüglich der prognostischen Relevanz von Östrogen wurde

schon im Jahre 1977 von Knight et al. veröffentlicht. Die Positivität eines Tumors bezüglich des Östrogenrezeptors wies auf eine längere Überlebenszeit der Patientin hin. Zu dem hatte der Östrogenrezeptor auch prädiktive Bedeutung. Östrogenrezeptorpositiven Patientinnen wurde eine hohe therapeutische Wirksamkeit von Antiöstrogenen wie Tamoxifen zugesprochen (National Institutes of Health Consensus Panel, 2001, Baum et al., 2002), während die adjuvante Verabreichung von Tamoxifen bei Östrogenrezeptor-negativen Patientinnen nicht empfohlen wurde (International Breast Cancer Study Group, 2006).

Abschließend ist zu sagen, dass die Bestimmung von ER, PR und *c-erbB2* wertvoll für die Abschätzung des Risikos der jeweiligen Patientin und ihrer Therapiewahl ist und die Bestimmung von p53 möglicherweise bald in die routinemässige Untersuchung mit aufgenommen wird. Die weiteren Faktoren bcl-2, Cyclin D1 und Ki-67 scheinen vielversprechend zu sein, sind zum derzeitigen Stand der Forschung aber noch nicht hinreichend untersucht und haben den nötigen Level of Evidence noch nicht erreicht.

Es bleibt zu hoffen, dass durch verbreiterte Anwendung von Methoden wie der TMA- Technik die Erforschung dieser und neuer Prognosemarker zukünftig schneller und effizienter erfolgt.

Kritische Betrachtung des TMA- Verfahrens

Die sorgfältige Auswahl der Biopsieentnahmestelle ist ein essentiell wichtiges Kriterium. Die Limitierung der Methode besteht jedoch in der Qualität des Ausgangsmaterials, da die Methode immer nur so gut wie das Ausgangsmaterial sein kann. Im vorliegenden Fall war das Ausgangsmaterial alt und sehr heterogen.

Es wurden pro Tumor zwei Stenzen mit einem Durchmesser von je 0,6 mm entnommen. Dies führte durchschnittlich zu einer 86,4%igen Auswertbarkeit der untersuchten Prognosefaktoren.

Die durchschnittlichen nicht auswertbaren 13,6% können durch mehrere Faktoren verursacht worden sein. Zum Einen kann ein Verlust des Biopsats beim Stanzen des Empfängerblöckchens aufgetreten sein, zum Anderen kann es bei den immunhistochemischen Untersuchungen zu einer Fehlerbehaftung und somit zu nicht auswertbaren Ergebnissen gekommen sein. Jedoch kann man mit den erreichten Ergebnissen dieser Arbeit zu dem Schluss kommen, dass das angewandte Verfahren für die untersuchten Tumormarker repräsentativ war.

Seit der Erstbeschreibung der TMA- Methode von Kononen et al. im Jahre 1998 gab es eine Flut von Publikationen, in denen die TMA- Methode thematisiert und mit den Ergebnissen aus Untersuchungen mit den herkömmlichen Methoden verglichen wurde (Kononen, 1998, Schraml et al., 1999, Camp et al., 2000, Bucher et al., 1999, Gillet et al., 2000, Sallinen et al., 2000, Hoos et al. 2001b, Torhorst et al., 2001, Skacel et al., 2002). Alle Autoren kamen zu dem Schluss, dass bei der Anwendung der TMA- Methode eine bis zu 100%ige Konkordanz mit den Ergebnissen aus den herkömmlichen Untersuchungsverfahren besteht.

Zudem wurden die Kriterien, die man bei der Anwendung der TMA- Methode erfüllen muss, in den Publikationen untersucht. Wie klein darf der Stanzen- durchmesser sein, um noch repräsentativ für den Tumor zu sein und wie viele Stanzen werden pro Tumor benötigt?

Zu der Frage der Grösse des Durchmessers der einzelnen Stanzen stellten Horvath et al. fest, dass die Wahrscheinlichkeit eine Stanze zu verlieren mit der Verkleinerung des Stanzendurchmessers zunahm (Horvath et al., 2002). Packeisen et al. stellten in ihrem Review fest, dass in der Tumorforschung ein Stanzendurchmesser von 0,6 mm für die TMA- Herstellung ausreichend war. Größere Stanzendurchmesser konnten sogar zum Bruch des Empfängerblöckchens führen und verringerten die Anzahl der auf dem Empfängerblöckchen enthaltenen Tumoren (Packeisen et al., 2003).

Über die Anzahl der Stenzen bestand keine Einigkeit. Während Hoos et al. 2001 in ihrer Übersichtsarbeit zu dem Ergebnis kamen, dass drei Stenzen á 0,6 mm zu repräsentativen Ergebnissen des TMA- Blocks führten- bei heterogenem Gewebematerial konnten nämlich zwei Stenzen aus demselben Tumor zu gegenteiligen Ergebnissen führen, die dritte Stanze konnte dann bei der Auswertung hilfreich sein (Hoos et al., 2001a)- hingte für Skacel et al. die Anzahl der Stenzen von dem Stanzendurchmesser ab, da bei kleinerem Durchmesser die Stanze leichter verlustig war (Skacel et al., 2002).

Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die TMA- Methode ein herausragendes Hilfsmittel für die Untersuchung von grossen Tumorphpopulationen war, durch welches die Analyse der Gewebe um ein Vielfaches erleichtert wurde. Dabei war das wichtigste Kriterium, welches erfüllt werden musste, um aussagekräftige Ergebnisse aus dem TMA- Block zu erhalten, die sorgfältige Auswahl der Region des Tumors, aus welchem die Biopsie entnommen werden sollte (Kallioniemi, 2001, Bubendorf et al., 2001, Moch et al., 2001, Skacel et al., 2002, Hoos et al., 2002b, Packeisen et al., 2003).

Zusammenfassend bleibt allerdings festzuhalten, dass die TMA- Methode für die Untersuchung zahlreicher Prognosemarker eine repräsentative, zeiteffiziente und kostengünstige Methode für die Untersuchung grosser Patientienkollektive darstellte und zudem eine gute Möglichkeit der standardisierten Aufarbeitung bat.

6 Literaturverzeichnis

1. **Allred DC, Havey JN, Bernardo M, Clark GM (1998)**
Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis
Mod Pathol, 11; 155-168
2. **Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, Michalek AM, Laughlin R, Nemoto T, Gillenwater KA, Harrington AM, Shields PG (1996)**
Cigarette Smoking, N-Acetyltransferase 2 Genetic Polymorphisms, and Breast Cancer Risk
JAMA, 276; 1494-1501
3. **Andersson I, Aspergren K, Janzon L et al. (1988)**
Mammographic screening and mortality from breast cancer: the Malmö mammographic screening trial
Br Med J, 297; 943-948
4. **Armstrong K, Eisen A, Weber B (2000)**
Assessing the Risk of Breast Cancer
N Engl J Med, 24; 564-571
5. **Baselga J (2003)**
Breast Cancer Therapy Annual
Martin Duniz, London
6. **Bässler R (1995)**
Histopathologische Kriterien und aktuelle Klassifikation des Mammakarzinoms
Onkologe, 1; 180-189
7. **Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S., Fritsche H Jr., Jessup JM, Kemeny N, Locker GY, Mennel RG, Somerfield M (2001)**
For the American Society of Clinical Oncology Tumor Marker Expert Panel
Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology
J Clin Oncol, 19; 1865- 1878
8. **Battifora H (1986)**
The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing
Lab Invest 55 ;244- 248
9. **Baum M, Buzdar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton J , Klijn JGM, Sahmoud T (2002)**

The ATAC Trialists` Group: Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer
Lancet, 359; 2132- 2139

10. **Beecher Instruments (2002)**
Automated Arrayer
www.beecherinstruments.com/prod_autoarr.html
11. **Birkmayer JGD (1984)**
Tumorbiologie
Karger, Basel
12. **Bishop JM (1985)**
Viral oncogenes
Cell, 42; 23- 38
13. **Bishop JM (1987)**
The molecular genetics of cancer
Science, 235; 305- 311
14. **Bloom HJG, Richardson WW (1957)**
Histologic grading and prognosis in breast cancer, a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years
Br J Cancer, 9; 359- 377
15. **Bonk UE (2000)**
Breast Cancer, International Recommendations for an Objective Diagnosis
Urban und Fischer, München
16. **Borrensens-Dale AI (2003)**
tp53 and Breast Cancer
Hum Mutat, 21; 292- 300
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. **Bucher C, Torhorst J, Bubendorf L, Schraml P, Kononen J, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G (1999)**
Tissue microarrays (`tissue chips`) for high throughput cancer genetics: Linking molecular changes to clinical endpoints
Am J Hum Genet, 65; Suppl 316
19. **Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schafer KL, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W (1999 a)**

Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes
J Path, 189; 521- 526

20. **Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, Riethdorf L Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W (1999b)**
Comparative genomic hybridisation of ductal carcinoma in situ of the breast- evidence of multiple pathways
J Pathol, 187; 396- 402
21. **Camp RL, Charette LA, Rimm DL (2000)**
Validation of tissue microarray technology in breast cancer
Lab Invest, 80; 1943- 1949
22. **CattorettiG, Rilke F, Andreola S (1988)**
p53 expression in breast cancer
Int J Cancer, 41; 178- 183
23. **Chang J, Clark GM, Allred DG, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM (2003)**
Survival of patients with metastatic breast carcinoma
Cancer, 97; 545-553
24. **Coradini D, Daidone MG (2004)**
Biomolecular and prognostic factors in breast cancer
Curr Opin Obstet Gynecol, 16; 49- 55
25. **Daidone MG, Silvestrini R (2001)**
Prognostic and predictive role of proliferation indices in adjuvant therapy of breast cancer
J Natl Cancer Inst Monogr, 30; 27- 35
26. **Done SJ, Eskandarian S, Bull S, Redston M, Andrusis IL (2001)**
P53 missense mutations in microdissected high-grade ductal carcinoma in situ of the breast
J Nat Cancer Inst, 93;700- 704
27. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (2005)**
Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15- year survival: an overview of the randomised trial
Lancet, 365; 1687- 1717
28. **Eidtmann H, Bahnsen J, Jonat W (1995)**
Diagnostik und Prognosefaktoren beim Mammakarzinom
Onkologe, 1; 190- 197

29. **Elledge RM, Clark GM, Chamness GC, Osborne CK (1994)**
Tumor Biologic Factors and Breast Cancer Prognosis among White, Hispanic and Black Women in the United States
J Natl Cancer Inst, 86, 9; 705- 712
30. **Elledge RM, Green S, Howes L, Clark GM, Berardo M, Allred DC, Pugh R, Ciocca D, Ravdin P, O'Sullivan J, Rivkin S, Martino S, Osborne CK (1997)**
Bcl-2, p53 and responsive to Tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: A Southwest Oncology Group Study
J Clin Oncol, 15; 1916- 1922
31. **Elston CW, Ellis IO (1991)**
Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with-long term follow-up.
Histopathology, 19; 403- 410
32. **Ferlay J, Bray F, Pisane P, Parkin DM (2001)**
Cancer incidence and prevalence worldwide
Globocan 2000 (CD-ROM), IARC Press
<http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>
33. **Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ (2000)**
Prognostic Factors in Breast Cancer
College of American Pathologists Consensus Statement 1999
Arch Pathol Lab Med, 124; 966- 978
34. **Foot FW, Stuart FW (1941)**
Lobular carcinoma in situ; a rare form of mammary cancer
Am J Path, 17; 491
35. **Ganten D, Ruckpaul K (1997)**
Tumorerkrankungen, Handbuch der Molekularen Medizin
Springer, Berlin
36. **Gasparini G, Boracchi P, Verderio P (1994)**
Cell kinetics in human breast cancer: Comparison between the prognostic value of the cytofluorimetric S- phase fraction and that of the antibodies to Ki-67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry
Int J Cancer, 57; 822- 829
37. **Gillet CE, Springall RJ, Barnes DM, Henby AM (2000)**
Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation

- study
J Pathol, 192, 549- 553
38. **Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ and Panel Members (2005)**
Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005
Ann Oncol, 16; 1569– 1583
39. **Gordon NH, Crowe JP, Brumberg DJ, Berger NA (1992)**
Socioeconomic factors and race in breast cancer recurrence and survival
Am J Epidemiol, 135; 609-618
40. **Hammond MEH, Fitzgibbons PL, Compton CC, Grignon DJ, Page DL, Fielding LP, Bostwick D, Pajak TF, for the Members of the Cancer Committee and Conference Participants (2000)**
College of American Pathologists Conference XXXV
Solid Tumor Prognostic Factors—Which, How and So What?
Summary Document and Recommendations for Implementation
Arch Pathol Lab Med, 124; 958– 965
41. **Hanf C (2002)**
Mammakarzinom und Umweltfaktoren
In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D (Hrsg).
Management des Mammakarzinoms, 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 8- 32
42. **Harbeck N, Ross JS, Yurdseven S, Dettmar P, Polcher M, Kuhn W, Ulm K, Graeff H, Schmitt M (1999)**
HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridisation allows risk group assessment in node negative breast cancer
Int J Oncol, 14; 663- 671
43. **Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselmann B, Kuhn W, Ulm K, Jaenicke F, Hofler H, Graeff H, Schmitt M (1998)**
Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node negative breast cancer
Anticancer Res, 18; 2187- 2197
44. **Hellemans P, van Dam PA, Weyler J, van Oosterom AT, Buytaert P, Van Marck E (1995)**
Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer
Br J Cancer, 72; 354- 360
45. **Hoeffken W, Lanyi M (1973)**
Röntgenuntersuchung der Brust
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

46. **Hoos A, Cordon-Cardo C (2001a)**
Tissue microarray profiling cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations
Lab Invest, 81; 1331- 1338
47. **Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastroides S, Dudas M, Kuo D, Leung DHY, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C (2001b)**
Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors
Am J Pathol, 158; 1245- 1251
48. **Horvath L, Henshall S (2001)**
The application of tissue microarrays to cancer research
Pathology, 33: 125- 129
49. **Howe GR, Friedenreich CM, Jain M, Miller AB (1991)**
A cohort study of fat intake and risk of breast cancer
J Natl Cancer Inst, 83; 336- 340
50. **International Breast Cancer Study Group (2006)**
Tamoxifen after adjuvant chemotherapy for prämenopausal women with lymph node-positive breast cancer: International Breast Cancer Group Trial 13- 93
J Clin Oncol, 24; 1332- 1341
51. **Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP (1992)**
Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node negative breast cancer patients
J Nat Cancer Inst, 84; 1109- 1114
52. **Jänicke F (2002)**
Prognostische und prädiktive Faktoren bei Patientinnen mit Mammakarzinom
In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D, Hrsg. Management des Mammakarzinoms, 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 144-159
53. **Jonsson H, Larsson L-G, Lenner P (2003)**
Detection of breast cancer with mammography in the first screening round in relation to expected incidence in different age groups
Acta Oncologica 42; 22- 29
54. **Kantor JA, Lee YH, Chirikjian JG, Feller WF (1979)**
DNA-Polymerase with characteristics of reverse transcriptase

purified from human milk
Science, 204; 511- 513

55. **Keen JC, Davidson NE (2003)**
The biology of breast carcinoma
Cancer, 97, 3 Suppl; 825- 833
56. **Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JMW, Blamey R W, Nicholson RI, Sutherland RL, Robertson JFR (1999)**
Overexpression of cyclin d1 messenger rna predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer
Clin Cancer Res, 5 ; 2069-2076
57. **Knight WA, Livingstone RB, Gregory E (1977)**
Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer
Cancer Res, 37; 4669
58. **Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bvarlund 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
59. **Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, Diest P J van, Brandt B, Boecker W, Buerger 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
60. **Krauß K (2002)**
Sexualsteroid e und die Karzinogenese des Mammakarzinoms
In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D (Hrsg.)
Management des Mammakarzinomes
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 33- 39
61. **Kreienberg R, Volm T, Alt D (2002)**
Krankheitsbild Mammakarzinom
In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D (Hrsg.)
Management des Mammakarzinomes
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 6- 9
62. **Kreienberg R, Volm T, Beck T (2002)**
Operative Therapie
In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D (Hrsg.)

Management des Mammakarzinoms
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 183- 191

63. **Lai H, Ma F, Trapido N, Meng L, Lai S (2004)**
Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival
Breast Cancer Res Treat, 83; 57-66
64. **Leung LK, Wang TTY (1999)**
Different effects of chemotherapeutic agents on the bcl-2/bax apoptosis pathway in human breast cancer cell lines
Breast Cancer Res Treat, 55; 73- 83
65. **Liehr JG (2000)**
Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?
Endocr Rev, 21; 40- 54
66. **Mackenzie I (1965)**
Breast cancer following multiple fluoroscopies
Br J Cancer, 19; 1- 8
67. **Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana- Hulin M, Chan S, Grimes D, Anton A, Liuch A, Kennedy J, O'Brian K, Conte P, Green M, Ward C, Mayne K, Extra JM (2005)**
Randomized phase II trial of the efficiency and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first line treatment: the M77001 study group
J Clin Oncol, 23; 4265- 4274
68. **Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A (2001)**
Her2 as a prognostic factor in breast cancer
Oncology, 61, Suppl 2; 67- 72
69. **Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S, Beitsch P, Khan A, Euhus D, Osborne C, Frenkel E, Hoover S, Leitch M, Clifford R, Vitetta E, Morrison L, Herlyn D, Terstappen LWMM, Fleming T, Fehm T, Tucker T, Lane N, Wang J, Uhr J (2004)**
HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses
Proc Natl Acad Sci USA, 101; 9393- 9398
70. **Micozzi MS (1987)**
Cross Cultural Correlation of Childhood Growth and Adult Breast Cancer
Am J Phys Anthropol, 73; 525- 537

71. **Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE (2002)**
Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years
Ann Surg, 235; 10- 26
72. **Mitze M (2002)**
Morphologische Grundlagen
In: Kreienberg R, Alt D, Möbus V (Hrsg.) (2002)
Management des Mammakarzinomes
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 125- 141
73. **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
74. **Molino A, Micciolo R, Turazza M (1997)**
Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods
Breast Cancer Res Treat, 45; 241- 249
75. **Morabia A, Bernstein M, Heritier S, Khatchatrian N (1996)**
Relation of Breast Cancer with Passive and Active exposure to Tobacco Smoke
Am J Epidemiol, 143; 918- 928
76. **Mousses S, Kallioniemi A, Kauraniemi P, Elkahloun A, Kallioniemi O-P (2001)**
Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays
Curr Opin Chem Biol, 6; 97- 101
77. **Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA (2000)**
Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: Evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression
Hum Pathol, 31; 406- 414
78. **Müller R-P (2002)**
Strahlentherapie des Mammakarzinomes
In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D, Hrsg.
Management des Mammakarzinoms
Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 2. Aufl., 205- 221
79. **National Institutes of Health (2000)**
Consensus Development Conference Statement
<http://consensus.nih.gov>

80. **Nocito A, Kononen J, Kallioniemi PO, Sauter G (2001)**
Tissue microarrays (TMAs) for high- throughput molecular pathology research
Int J Cancer, 94; 1- 5
81. **Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W (2002)**
Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry
J Clin Pathol, 55; 613- 615
82. **Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H (2003)**
Demystified...Tissue microarray technology
Mol Pathol, 56; 198- 204
83. **Perera NMA, Gui GPH (2003)**
Multi-ethnic differences in breast cancer: Current concepts and future directions
Int J Cancer, 106; 463- 467
84. **Pertschuk LP, Kim DS, Nayer K (1990)**
Immunocytochemical estrogen and progesterin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies
Cancer, 66; 1663- 1670
85. **Piccart- Gebhart MJ, Procter M, Leyland Jones B, Goldhirsch A, Untsch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios C H, Steger G, Huang C-S, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter T, Ruschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Strahle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD FOR THE HERCEPTIN ADJUVANT TRIAL STUDY TEAM (2005)**
Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER- 2- Positive Breast Cancer
N Engl J Med, 353; 1659- 1672
86. **Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimont D (2001)**
The Predictive Value of HER2 in Breast Cancer
Oncology, 61; 73- 82
87. **Powell B, Soong R, Iacopetta B, Seshadri R, Smith DR (2000)**
Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer
Clin Cancer Res, 6; 443- 451

88. **Pschyrembel (1993)**
Medizinisches Wörterbuch
Nikol Verlag Hamburg, 257. Aufl.
89. **Putz R, Pabst R (Hrsg) (1993)**
Sobotta, Atlas der Anatomie, Band 2
Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 20. Aufl.
90. **Rosen, PP (1997)**
Rosen's Breast Pathology
Lippincott Raven, Philadelphia, 1st Edition
91. **Ross JS, Muraca PJ, Jaffe D (1998)**
Multivariate analysis of prognostic factors in lymph node negative breast cancer
Mod Pathol, 11; 26A
92. **Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ (2003)**
The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: Biomarker and target of therapy
Oncologist, 8; 307- 325
93. **Rudolph P, Mac Grogan G, Bonichon F, Frahm SO, de Mi, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM, Parwaresch R (1999)**
Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase I expression in infiltrating ductal breast carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases
Breast Cancer Res Treat, 55; 61- 72
94. **Runnebaum IB, Emmerich D (2002)**
Familiäres Mammakarzinom-Bratung und Betreuung betroffener Familien
In: Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D (Hrsg.)
Management des Mammakarzinoms
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 43- 59
95. **Russo J, Lareef H, Tahin Q, Russo IH (2002)**
Pathways of carcinogenesis and prevention in the human breast
Eur J Cancer, 38, Suppl 6; 31- 33
96. **Russo J, Russo IH (1995)**
The etiopathogenesis of breast cancer prevention
Cancer Lett, 90; 81- 89
97. **Sallinen S-L, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helen PT, Schraml P, Kallioniemi OP, Kononen J (2000)**
Identification of differentially expressed genes in human gliomas

by DNA microarray and tissue chip techniques
Cancer Res, 60; 6617- 6622

98. **Sandhu JK, Haqqani AS, Birnboim HC (2000)**
Effect of Dietary Vitamin E on Spontaneous or Nitric Oxide Donor-Induced Mutations in a Mouse Tumor Model
J Natl Cancer Inst, 92;1429- 1433
99. **Scherneck P, Köble D (1997)**
In: Ganten D, Ruckpaul K
Tumorerkrankungen, Handbuch der molekularen Medizin
Springer, Berlin
100. **Schiller AB, Clark WS, Cotsonis G, Lawson D, DeRose PB, Cohen C (2002)**
Image cytometric bcl-2:bax and bcl-2:bcl-x ratios in invasive breast carcinoma: correlation with prognosis
Cytometry, 50; 203- 209
101. **Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, Sommer H, Friese K (2005)**
Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas
Breast Cancer Res, 7; R 1174- R 1185
102. **Schnitt SJ (2001)**
Traditional and newer pathologic factors
J Natl Cancer Inst Monogr, 30; 22– 26
103. **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
104. **Shore RE, Hempelmann LH, Kowaluk E, Mansur PS, Pasternack BS, Albert R E, Haughie G E (1977)**
Breast neoplasms in women treated with x-rays for acute postpartum mastitis
J Natl Cancer Inst, 59; 813- 822
105. **Simon R, Nocito A, Hübscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, Bubendorf L, Mihatsch MM, Wilber K, Schötzau A, Kononen J, Sauter G (2001)**
Patterns of Her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer
J Natl Cancer Inst, 93;1141- 1146

106. **Skacel M, Skillton b, Pettay JD, Tubbs RR (2002)**
Tissue microarrays: A powerful tool for high throughput analysis of clinical specimen
Appl Immunohistochem Mol Morphol, 10; 1- 6
107. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Lenn WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987)**
Human breast cancer: correlation of relapse with amplication of the HER2-/neu oncogene
Science, 235; 177– 182
108. **Slattery ML (2001)**
Does An Apple a Day Keep Breast Cancer Away?
JAMA, 285; 799- 808
109. **Smith- Warner Sa, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ (1998)**
Alcohol and breast cancer in women: A pooled analysis of cohort studies
JAMA, 279; 535-540
110. **Smith-Warner SA, Spiegelmann D, Yaun S-S, Adami H-O, Beeson L, van den Brandt A, Folsom R, Fraser E, Freudenheim CM, Goldbohm A (2001)**
Intake of Fruit and Vegetables and Risk of Breast Cancer
JAMA 285, 6; 769- 776
111. **Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B (1994)**
Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: A review
Int J Cancer, 57; 1- 9
112. **State of the Art Meeting Gravenbruch (2002)**
Aktuelle Empfehlungen zur Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinome
Minckwitz G (Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien New York
113. **Statistisches Bundesamt (2000)**
Gesundheitsbericht für Deutschland 1997, 1998, 1999, 2000
Fachserie 12, Reihe 4
Metzler Poeschel, Stuttgart
114. **The World Health Organisation (2003)**
The World Health Organisation Histological Typing of Breast Tumors-Second Edition
Am J Clin Pathol, 78; 806- 816

115. **Thomssen C, Jänicke F, Harbeck N (2003)**
Clinical Relevance of Prognostic Factors in Axillary Node-Negative Breast Cancer
Onkologie, 26; 438- 445
116. **Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich A, 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
117. **Tsuda H, Hirohashi S (1994)**
Association among p53 gene mutation, nuclear accumulation of the p53 protein and aggressive phenotypes in breast cancer
Int J Cancer, 57; 498- 503
118. **Tumorzentrum München (2005)**
Manual, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome
Sauer H (Hrsg), W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York, 9.Auflage
119. **UICC, union internationale contre le cancer (1993)**
TNM-Supplement zur TNM-Klassifikation maligner Tumoren
Springer, Berlin, 4. Aufl.
120. **Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H (2002)**
Overexpression of cyclin d1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients
Int J Cancer, 98; 415- 418
121. **Vernon SW, Tilley BC, Neale AV, Steinfeldt L (1985)**
Ethnicity, survival and delay in seeking treatment for symptoms of breast cancer
Cancer, 55; 1563- 1571
122. **Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G (2005)**
Breast cancer
Lancet, 365; 1727- 1741
123. **Visscher DW, Sarker F, Tabaczka P, Cressmann J (1996)**
Clinicopathological analysis of bcl-2 immunostaining in breast carcinoma
Mod Pathol, 9; 642- 646
124. **Welsch CW (1992)**
Relationship between dietary fat and experimental mammary

gland tumorigenesis:a review and critique
Cancer Res, 52, Suppl 7; 2040s- 2048s

125. **Willett WC, Dietz WH, Colditz GA (1999)**
Guidelines for Healthy Weight
N Engl J Med, 341; 427- 434
126. **Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz G, Manson JE, Spiegelman D, Rosner B, Hennekens CH, Speizer F (1992)**
Dietary Fat and Fiber in Relation to Risk of Breast Cancer
JAMA, 268, 15; 2037- 2044
127. **Yarden Y (2001)**
Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer
Oncology ,61; 1- 13
128. Yood M U, Cole Johnson C, Blount A, Abrams J, Wolman E, McCarthy BD, Raju U, Nathanson DS, Worsham M, Wolman SR (1999)
Race Differences in Breast Cancer Survival in a Managed Care Population
J Nat Cancer Inst, 91, 17- 26

7 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Horst Bürger für die Überlassung des Dissertations- Themas. Seine wertvollen Anregungen sowie die stetige Unterstützung waren überaus hilfreich bei der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. med Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz möchte ich für seine Unterstützung schon während des Studiums der Zahnmedizin sehr danken.

Herrn Professor Dr. med. Werner Boecker danke für die freundliche Unterstützung und für die Überlassung von Arbeitsmitteln und der Laborräumlichkeiten.

Herrn Professor Dr. Burkhard Brandt danke ich für die freundliche und schnelle Bereitstellung der erforderlichen Patientendaten.

Herrn Dr. Christian Maria Kersting danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meinen Eltern, Frau Simin Farahani und Herrn Dr. med. Farhad Farahani, danke ich, dass sie mir das Studium der Zahnmedizin und die Promotion ermöglicht, mich in jeder Lebenslage liebevoll unterstützt und mir stets mit hilfreichen und weisen Ratschlägen beigestanden haben.

Diese Arbeit möchte ich meinen lieben Eltern widmen.

8 Lebenslauf