

UNTERSUCHUNGEN DES ZUSAMMENHANGS
ZWISCHEN DEM
TUMORSUPPRESSORGEN P53
UND DEM
SAUERSTOFFPARTIALDRUCK
IN PRIMÄREN MAMMAKARZINOMEN

Peter Wolf

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe -
Großhadern
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Hepp

Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen dem
Tumorsuppressorgen p53 und dem Sauerstoffpartialdruck
in primären Mammakarzinomen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Peter Wolf

aus

Murnau

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. E. R. Weissenbacher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. L. Sommer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. W. Eiermann
Dr. med. G. Raab

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2. Therapiemöglichkeiten beim primären Mammakarzinom	2
1.2.1. Chirurgische Therapie	2
1.2.2. Systemische Therapie	2
1.2.2.1. Postoperative (adjuvante) Chemotherapie	2
1.2.2.2. Primäre (neoadjuvante) Chemotherapie	2
1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom	4
1.4. Das Tumorsuppressorgen p53	5
1.4.1. Aufbau und Funktion von p53	6
1.4.2. Bedeutung von p53 für die Karzinogenese	8
1.4.3. p53 und Chemosensitivität	9
1.5. Tumoroxygenierung	10
1.5.1. Hypoxie und Tumorbiologie	11
1.5.2. Tumoroxygenierung und Radiosensitivität	11
1.5.3. Tumoroxygenierung und Chemosensitivität	11
1.6. Tumoroxygenierung und p53-Akkumulation	13
2. Zielsetzung der Arbeit	14
2.1. Ziel des Gesamtprojekts	14
2.2. Ziel der vorliegenden Arbeit	14

3.	Patientencharakteristik und Methodik	15
3.1.	Patientencharakteristik	15
3.2.	Methodik	15
3.2.1.	Messung des intratumoralen Sauerstoffpartialdrucks (pO ₂)	15
3.2.2.	Bestimmung des Phosphoproteins p53	17
3.2.3.	Bewertung des Ansprechens auf primäre Chemotherapie	18
3.2.4.	Therapieprotokolle	18
3.3.	Datenauswertung	20
4.	Ergebnisse	21
4.1.	Patientencharakteristik	21
4.1.1.	Altersverteilung	21
4.1.2.	Verteilung der Tumoren nach histopathologischen Kriterien	22
4.1.3.	Ansprechen auf primäre Chemotherapie	23
4.2.	pO ₂ -Messungen	24
4.2.1.	Verteilung der medianen pO ₂ -Werte	24
4.2.2.	pO ₂ -Werte und klassische Prognosefaktoren	26
4.2.2.1.	Hormonrezeptorstatus	27
4.2.2.2.	Nodalstatus	27
4.2.2.3.	Grading	28
4.2.3.	Tumoroxygenierung und Ansprechen auf primäre Chemotherapie	29
4.3.	p53-Messungen	30
4.3.1.	Verteilung der p53-Akkumulation	30
4.3.2.	p53 und klassische Prognosefaktoren	31
4.3.2.1.	Hormonrezeptorstatus	31
4.3.2.2.	Nodalstatus	32
4.3.2.3.	Grading	32

4.3.2.4.	Menopausenstatus	32
4.3.3.	p53 und Ansprechen auf primäre Chemotherapie	32
4.4.	p53-Akkumulation und Tumoroxygenierung	33
5.	Diskussion	36
6.	Zusammenfassung	50
7.	Literaturverzeichnis	51
8.	Abbildungsverzeichnis	67
9.	Tabellenverzeichnis	67
10.	Danksagung	68
11.	Lebenslauf	69

Abkürzungen

A	Adriamycin
ADoc	Adriamycin/Docetaxel
AgCl	Silberchlorid
AC	Adriamycin / Cyclophosphamid
AT	Adriamycin / Taxol [®]
ATAC	Arimidex [®] / Tamoxifen Alone or in Combination
bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2 protein
cCR	Clinical Complete Remission
CMF	Cyclophosphamid / Methotrexat / 5-Fluorouracil
cPR	Clinical Partial Remission
cSD	Clinical Stable Disease
DAB	Diaminobenzidine
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Desoxyribonuclein acid
ECTO	European Cooperative Trial in Operable breast cancer
FACS	Fluorescence Activated Spectral Analysis
GABG	German Adjuvant Breast Cancer Group
GENARI	German Neoadjuvant Aromataseinhibitor study group
GEPAR-DO	German Preoperative Adriamycin and Docetaxel study
GEPAR-DUO	German Preoperative Adriamycin and Docetaxel study II
GEPAR-TRIO	German Preoperative Adriamycin and Docetaxel study III
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
Hg	Chemisches Symbol für Quecksilber
HIF 1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 α
Ig	Immunglobulin
jdk	C-jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
MAb	Monoclonal antibody
mdm-2	Mouse-double-minute-2-protein
μ m	Mikrometer

mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger Ribonuclein Acid
mt-p53	Mutiertes Phosphoprotein p53
n	Anzahl
N+	Lymphknotenbeteiligung
N-	Keine Lymphknotenbeteiligung
NaCl	Natriumchlorid
n.s.	Nicht signifikant
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowell Project
OH-Radikale	Hydroxy-Radikale
OP	Operation
PAb	Polyclonal Antibody
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCR	Pathological Complete Remission
PCR	Polymerase Chain Reaction
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pPD	Pathological Progressive Disease
pPR	Pathological Partial Remission
präop	Präoperativ
pSD	Pathological Stable Disease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Tam	Tamoxifen
TNM	Tumor, Noduli, Metastasen
TTGE	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
UICC	Union International Contre le Cancer
uPA/PAI 1	Urokinase Plasminogen Aktivator/Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
wt-p53	Wildtyp-Phosphoprotein p53

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist in der westlichen Welt die häufigste zum Tode führende bösartige Erkrankung der Frau. Epidemiologische Studien belegen, dass heutzutage etwa jede 10. Frau in der Bundesrepublik an Brustkrebs erkrankt (in den USA liegen die Zahlen noch etwas höher; dort erkrankt etwa jede 8. Frau an Brustkrebs). Die Inzidenz von Brustkrebs ist steigend. Derzeit erkranken jährlich über 46000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs, davon etwa 19000 im Alter unter 60 Jahren. Brustkrebs ist für knapp 26% aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen und mehr als ein Drittel (36%) der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren, mehr als 3 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebsarten. Die Erkrankungsraten für Deutschland liegen im europäischen Vergleich im unteren Drittel [64]. In den Niederlanden, Dänemark, Schweden und Finnland ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit deutlich höher, in südeuropäischen Ländern wie Spanien, Griechenland und Portugal deutlich niedriger [64].

1.2. Therapiemöglichkeiten beim primären Mammakarzinom

1.2.1. Chirurgische Therapie

Die operative Standardbehandlung des primären Mammakarzinoms ist heutzutage in 2/3 der Fälle die brusterhaltende Operation mit der Entfernung des Primärtumors im Gesunden und dem axillären Lymphknotenstaging, das entweder die komplette Resektion der axillären Lymphknoten, oder die Sentinel-Lymphknoten-Biopsie beinhaltet. Anschließend erfolgt die Bestrahlung der Brust [36]. Je nach Tumorstadium und Tumoreigenschaften, die auch als Prognosefaktoren dienen, muss entschieden werden ob, und falls ja, welche systemische Therapie zusätzlich notwendig ist [55].

1.2.2. Systemische Therapie

Die systemische Therapie des frühen Mammakarzinoms umfasst heute Chemotherapie und die endokrine Therapie.

Abhängig vom Zeitpunkt der Applikation unterscheidet man zwischen postoperativer (adjuvanter) und präoperativer (primärer oder neoadjuvanter) systemischer Therapie.

1.2.2.1. Postoperative (adjuvante) Chemotherapie

Die postoperative Chemotherapie dient als Zusatz zur chirurgischen Therapie und Bestrahlung. Die Effektivität dieser Therapieform kann jedoch nicht kurzfristig beurteilt werden, sondern muss aufgrund des Fehlens eines direkten Messparameters nach der Zeit bis zum Auftreten von Rezidiven oder Metastasen und des Gesamtüberlebens bewertet werden.

1.2.2.2. Primäre (neoadjuvante) Chemotherapie

Ziel der Applikation einer Chemotherapie vor der Operation ist es zum einen, den Tumor zu verkleinern um weniger radikal operieren zu können und zum anderen, um anhand des Ausmaßes des Tumorsprechens die Effektivität der Chemotherapie zu bestimmen (in vivo Chemosensitivitätstest) [73, 84].

Die präoperative Verabreichung der systemischen Chemotherapie führt bei primär operablen Mammakarzinomen zu einer identischen Senkung des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens wie die postoperative Applikation der gleichen Chemotherapie [37, 84, 156]. Durch die präoperative Verabreichung kann die Rate brusterhaltender Operationen signifikant gesteigert werden und der Effekt der Chemotherapie sofort erfasst werden [73]. Mehrere Autoren [13, 44, 58, 122] fanden, dass das histopathologische Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie der beste Prädiktor für das krankheitsfreie Überleben ist. Patientinnen mit einer kompletten Remission des Primärtumors haben eine signifikant bessere Prognose als Patientinnen mit einer partiellen Remission, einer unveränderten Tumorgroße oder einer Progression während der Chemotherapie. Der momentan zuverlässigste Indikator für ein maximales Therapieansprechen ist die histopathologische Bestätigung einer kompletten Remission, die pathologische Komplettremission (pCR).

Der Nachweis einer pCR korreliert mit einer sehr günstigen Prognose. Ein Problem ist jedoch, dass es nicht möglich ist, die Patientinnen mit pathologischer Komplettremission herauszufinden, solange die definitive Brustkrebsoperation nicht stattgefunden hat. Dies unterstreicht die unveränderte Bedeutung einer operativen Resektion des Primärtumors sogar in Fällen, bei denen eine klinische Komplettremission des Tumors nach Chemotherapie vorliegt.

Die zeitliche Vorverlegung der systemischen Therapie kann als sicher angesehen werden, da ein Fortschreiten der Erkrankung nur in etwa 3% der Fälle beobachtet wird. Diese Erkenntnisse konnten durch eine große randomisierte Studie der NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) mit 1500 Patientinnen gewonnen werden [44].

Unter der Annahme, dass das lokale Ansprechen mit dem zytotoxischen Effekt an lokalen und distanten „Mikrometastasen“ korreliert, kann das Erreichen einer pCR als Surrogatkriterium für einen günstigen Krankheitsverlauf herangezogen werden [14]. Somit ist eine Langzeitnachbeobachtung, wie bei der adjuvanten Therapie, zur Beurteilung des Therapieeffekts nicht mehr wesentlich. Durch den Vergleich der pCR-Raten können Ergebnisse randomisierter Therapiestudien schneller verfügbar werden. Das Prinzip der präoperativen systemischen Chemotherapie dient als in vivo Sensitivitätstest.

Weiterhin erlaubt die präoperative Therapiesituation die Untersuchung und Beurteilung prädiktiver Faktoren vor und nach der Therapie und ist ideal für die Erprobung neuer Medikamente im Frühstadium der Brustkrebserkrankung.

Mit den modernsten Therapieregimen werden heute, insbesondere unter Hinzunahme von Taxanen pCR-Raten von etwa 20% erreicht [158, 159, 160, 162]. Prädiktoren für das Erreichen einer pCR sind das klinische Ansprechen zu Beginn der Chemotherapie und ein negativer Hormonrezeptorstatus [161, 52]. In der ECTO-Studie konnte gezeigt werden, dass die pCR-Rate bei negativem Hormonrezeptorstatus viermal so hoch ist, wie bei positiven Rezeptoren (45% vs 11%). Zudem wurde durch die präoperative Chemotherapie die lokale Kontrolle nicht beeinträchtigt [37]. Das Tumoransprechen nach den ersten Chemotherapiezyklen scheint einen gewissen Vorhersagewert für eine pCR zu haben [147]. Hinsichtlich der modernen Biomarker liegen derzeit keine schlüssigen Ergebnisse vor.

1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom

Um den Krankheitsverlauf einer Mammakarzinompatientin prospektiv abschätzen zu können müssen klinisch relevante Prognosefaktoren herangezogen werden [43, 105]. Prädiktive Faktoren geben Information über das Ansprechen auf spezifische onkologische Therapieformen.

Die Bedeutung der Prognosefaktoren steigt noch vor dem Hintergrund, dass zwar die meisten Brustkrebspatientinnen eine Chemotherapie erhalten, aber nur etwa die Hälfte von ihnen davon profitiert [40, 82, 137]. Eine Identifikation der Faktoren, die das Ansprechen auf Chemotherapie vorhersagen, ist in der klinischen Onkologie sehr wichtig, um eine Selektion der geeigneten Patienten für die Chemotherapie zu ermöglichen und andere vor unnötiger toxischer Exposition zu bewahren [137].

Prädiktive Faktoren können gleichzeitig prognostischen Wert besitzen, müssen jedoch nicht.

Zu den etablierten Prognosefaktoren des National Cancer Institute, die im Allgemeinen beim primären Mammakarzinom angewandt werden, zählen der TNM-Status (Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung), die Morphologie (histopathologischer Typ, Grading, Lymphangiosis carcinomatosa) und der Steroidhormonrezeptorstatus [108].

Als neuere prognostische Faktoren werden die Expression von diversen Faktoren wie z.B. Ki-67, c-erbB1-3 , Bcl-2 (B-cell lymphoma-2 protein)[60], p21 [34], Cyclooxygenase-2 [34], Cathepsin-D, die Mitoserate, die Gefäßinvasion [100], die Proteasen PA, PAI-1 [62] und p53 herangezogen.

Derzeit sind nur 2 biologische prädiktive Marker vorhanden, die das Ansprechen auf spezifische Therapien vorhersagen: HER2/neu für das Ansprechen auf Trastuzumab-Gabe und der Hormonrezeptorstatus für die endokrine Therapie [125, 128, 137].

Die Größe des Primärtumors wird neben dem histopathologischen Grading bei nodal-negativen Patientinnen zum wichtigsten prognostischen Faktor [100]. Bei nodal-positiven Patientinnen hingegen wird der Lymphknotenbefall gegenüber der Tumorgöße als relevanter für prospektive Aussagen bewertet [22]

Klinische Studien haben gezeigt, dass einige Patienten auf Chemo- oder Radiotherapie ansprechen, während andere mit dem gleichen histologischen Tumortyp nicht reagieren. Da genetische Veränderungen zu einem großen Teil die Verantwortung für die Entstehung und die biologischen Eigenschaften von Tumoren tragen, liegt es nahe, zu vermuten, dass es ebenfalls genetische Veränderungen sind, die das Ansprechen auf eine Chemotherapie beeinflussen. Viele Studien haben sich daher mit der Rolle von p53 auf das therapeutische Ansprechen beschäftigt [24, 50, 72, 96, 134, 146].

1.4. Das Tumorsuppressorgen p53

Während des letzten Jahrzehnts wurde es immer offensichtlicher, dass die meisten gegen Tumoren gerichteten Medikamente ebenso wie die Strahlentherapie die Zellen durch Induktion der Apoptose töten [136].

Mutationen in den Mediatoren der Apoptose können daher zu behandlungsresistenten Tumoren führen [95].

Einer der wichtigsten dieser Mediatoren ist das Tumorsuppressorgen p53.

Viele Chemotherapeutika schädigen die DNA und aktivieren das Tumorsuppressorgen p53, das, sofern es nicht mutiert ist, die Apoptose auslöst.

Bei einem hohen Prozentsatz der Karzinome liegt eine Akkumulation von p53 vor. Diese wird vor allem bei mutiertem p53 und unter hypoxischen Bedingungen beobachtet [136], da Zellen mit deaktiviertem p53 bei Hypoxie einen Selektionsvorteil besitzen. Zudem wird p53 durch Hypoxie stabilisiert.

Intaktes p53 induziert die Apoptose als Folge von ionisierender Strahlung, während ein Funktionsverlust von p53 die Zellen unempfindlich gegen eine Reihe chemotherapeutischer Substanzen macht [82].

Das Tumorsuppressorgen p53 zählt damit zu den aktuellen, histopathologisch bewertbaren, vielversprechenden Biomarkern zur Vorhersage des Ansprechens auf eine Chemotherapie, insbesondere auch auf die primäre Chemotherapie.

1.4.1. Aufbau und Funktion von p53

p53 wurde erstmalig von Lane und Crawford 1979 [92] beschrieben. Es handelt sich um ein Zellkernprotein aus 393 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 53 kDa. Das p53-Gen ist auf dem p-Arm des Chromosoms 17 in Position 17p13.1 lokalisiert

Das Tumorsuppressorgen p53 wird als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da sein Transkriptionsprodukt während der Zellteilung den Gesundheitszustand der Zelle kontrolliert. Man vermutet, dass das p53-Tumorsuppressorprotein in einem Proteinkomplex (p53 bildet Komplexe aus 4 Molekülen und bindet dann an die DNA) zusammen mit der DNA-Polymerase I die DNA-Stränge entlangpatrouilliert. Auf diese Weise spielt das p53-Protein vom Wild-Typ eine wichtige Rolle bei der Tumorbekämpfung durch DNA-Schäden (z.B. durch ionisierende Strahlung, Zigarettenrauch, Hypoxie, Chemotherapeutika, oxidativen Stress), die insgesamt zur Instabilität des Genoms führen [118].

Die Halbwertszeit von p53 liegt im Bereich weniger Minuten [2], sodass Wildtyp-p53 (wt-p53) nur in geringen Mengen in normalen Zellen zu finden ist. Eine Akkumulation von p53 kann durch eine Reihe von Faktoren bewirkt werden. Dazu zählen ionisierende Strahlung, UV-Licht, Hyperthermie, die Unterdrückung von Wachstumsfaktoren und DNA-Schäden durch verschiedenste zytotoxische Substanzen, sowie auch die Tumorphypoxie.

Hypoxie induziert eine p53-Akkumulation durch die Herunterregulation des Gehaltes an mouse-double-minute-2-Protein (mdm-2) und durch Verhinderung von Interaktionen mit Proteinkomplexen [2].

p53 gewährleistet genetische Stabilität durch seinen Einfluss auf mehrere Zellzyklus-Kontrollpunkte. Zellen können nach DNA-Schäden einem p53-abhängigen G₀/G₁-Phasen-Arrest unterliegen, dem DNA-Reparatur oder Apoptose folgt [33].

Das Anhalten der Replikation bietet Reparaturenzymen die Chance, Schäden an der DNA vor Eintritt in die S-Phase zu beheben [165].

p53 kann auch für einen Kontrollpunkt-Arrest in der G₂-Phase verantwortlich sein, vermittelt durch eine Splice-Variante von p53, durch p21 oder ein anderes cdc2-verbundenes Protein [142].

Zellen in G₂-Phasen-Arrest unterliegen eher der Apoptose, als solche in G₀/G₁-Phasen-Arrest [80].

Der genaue Mechanismus, durch den p53 DNA-Schäden oder andere Stress-Signale empfindet ist noch nicht bekannt. Ein möglicher Sensor könnte das Ataxia-telangiectasia (ATM)-Gen-Produkt sein [104].

Das p53-Protein leitet bei irreparablen Schäden durch die Aktivierung einer Enzymkaskade den programmierten Zelltod ein. Dies erfolgt in erster Linie durch die Regulation des bax-Gens, wodurch die Apoptose-Geschwindigkeit kontrolliert wird [141].

Unter normalen Bedingungen bilden bax und bcl-2 Heterodimere und halten dadurch ein Gleichgewicht. p53 induziert die Expression von bax und verändert das Gleichgewicht zu Gunsten von bax, das dann den Apoptoseweg initiiert [101].

Die bcl-2-Expression kann die p53-vermittelte Apoptose komplett verhindern und damit die Aktivität von p53 von der Auslösung der Apoptose zum Zellzyklusarrest umleiten. Dies könnte zu seiner onkogenen und antiapoptotischen Aktivität beitragen [27]. Ein alternatives Modell der p53-vermittelten Apoptose bezieht die transkriptionelle Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den oxidativen Abbau mitochondrialer Komponenten mit ein, die zum programmierten Zelltod führen [123].

Der Abbau von p53 wird vor allem durch mdm2 und jnk(c-jun N-terminal kinase) gefördert [118]. Das mdm2-Protein spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von p53. Es bindet an p53 und bedeckt dessen Transaktivierungs-Domäne, wodurch p53-abhängige Effekte im Zellzyklus-Arrest und in der Apoptose ausgeschaltet werden. mdm2-Protein fördert dazu den schnellen proteosomalen Abbau von p53 [90].

Nach Zellstress wird p53 an verschiedenen Stellen phosphoryliert und verliert die Affinität zu mdm2 mit der Folge reduzierten Abbaus, was zur Stabilisierung von p53 beiträgt [118].

1.4.2. Bedeutung von p53 für die Karzinogenese

Karzinogenese ist ein Prozess, der das Wachstumsmuster normaler Zellen von kontrolliertem zu unkontrolliertem Wachstum umwandelt. Koordinierte Regulation der Zellproliferationsraten und des Zelltodes ist eine entscheidende Bedingung im Erhalt der Homöostase. Der Verlust der Regulationsfähigkeit kann begründet sein in genetischen Veränderungen wachstumsfördernder Gene oder wachstumshemmender Gene, wie den Tumorsuppressorgenen.

Durch Kontrollmechanismen wird gewährleistet, dass DNA-Schäden bzw. fremde DNA nicht auf die Tochterzellen weitervererbt werden und zu einer Entartung oder Zerstörung der Nachkommenschaft führen kann. Aufgrund seiner Kontrollfunktionen wird dem p53-Tumorsuppressionsgen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von malignen Tumoren zugeschrieben.

Jerry et al. 2000 [78] konnten im Tierversuch an Mäusen belegen, dass fehlendes p53 die Entwicklung von Brusttumoren bedingt. p53 ist aber vermutlich nicht das einzige Gen, das die Apoptose und damit die Karzinogenese und maligne Progression beeinflusst.

Im Gegensatz zu Onkogenen manifestieren sich Fehler bei Tumorsuppressorgenen erst dann, wenn Veränderungen in beiden allelen Genen vorliegen. Dennoch stellen Mutationen im p53-Gen die häufigste genetische Veränderung bei der Entwicklung und Progression humaner Tumoren dar. Entscheidend ist allerdings der Typ und die Lokalisation der Mutation [107]. Bei den Mutationen handelt es sich meist um Einzelbasenmutationen in der zentralen DNA-bindenden Domäne, wodurch die Fähigkeit der DNA-Bindung blockiert wird.

Verschiedene p53-Mutantenallele bilden Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die überwiegende Zahl der auftretenden Mutationen betreffen die hochkonservierten Domänen in der hydrophoben Mittelregion des p53-Proteins, wobei insbesondere die Codons 175, 245, 248, 249, 273 und 282 als "hot spots" im humanen Gen angesehen werden.

Zusätzlich zu p53-Mutationen inaktivieren einige Tumoren p53 durch Erhöhung des mdm2-Gens. Veränderungen der mdm2- und p53-Expression könnten für andere Wege der Tumorentstehung verantwortlich sein.

Fehler im p53 Gen treten bei ca. 46-61% der Krebskranken (Brust, Lunge, Leber, Haut, Prostata, Blase, Zervix, Colon) auf [103, 121].

Das nicht funktionierende p53-Protein ist dann in hoher Konzentration in diesen Zellen messbar. Akkumulation von p53 zeigt gewöhnlich einen Verlust der p53-Funktion, der entweder auf abnormale Proteinstruktur oder auf Bindung durch p53-bindende Proteine zurückzuführen ist [146]. Munshi et al. 1998 [107] konnten in gesundem Gewebe keine Akkumulation von p53 feststellen und folgerten, dass die Akkumulation von p53 in leicht dysplastischem und normalproliferierendem Gewebe gering ist und durch Analyseverfahren nicht erfasst wird.

Akkumulation von p53 im Zellkern wurde bei einer Reihe humaner Tumoren beobachtet. Dazu zählen das Mammakarzinom, Lungen- und Kolonkarzinome.

1.4.3. p53 und Chemosensitivität

Auch nach Exposition mit zytotoxischen Chemotherapeutika treten wahrscheinlich alle Funktionen und Wirkungen von p53 auf. Daher können zwei entgegengesetzte Bilder aufgezeigt werden, die auf molekularer Ebene nach zytotoxischer Chemotherapie in Abhängigkeit vom zellulären Umfeld entstehen.

Auf der einen Seite hat p53 das Potential die Apoptose in Zellen zu induzieren, die empfänglich dafür sind. Auf der anderen Seite kann ein Zellzyklus-Arrest mit folgender DNA-Reparatur anstelle der Apoptose eintreten. Daraus können zwei mögliche Szenarien nach zytotoxischer Chemotherapie folgen. Zum einen kann p53 als Apoptose-Mediator die Chemosensitivität vermitteln, zum anderen kann p53 aber auch durch Induktion des Zellzyklus-Arrests eine Chemoresistenz verursachen.

In der Theorie erwartet man einen Zusammenhang von mt-p53 und schlechterem Ansprechen auf zytotoxische Therapie.

Wildtyp-p53 spielt eine entscheidende Rolle in der positiven Regulation der Apoptose. Dies ist ein wichtiger Schritt in der Beseitigung von Tumorzellen nach chemotherapieinduziertem DNA-Schaden.

Chemotherapeutika wie Adriamycin, Etoposide und Doxorubicin induzieren einen DNA-Schaden und die p53-abhängige Apoptose. Daher können Zellen mit p53-Mutationen und einem Wirkungsverlust von p53 eine Chemoresistenz gegen diese Substanzen aufweisen. Der Mechanismus, der die Apoptose nach DNA-Schaden auslöst ist unklar. Ein mutationsbedingter Verlust der Tumorsuppressionsfunktion von p53 wurde in vielen Tumoren beobachtet. Die duale Rolle des Wildtyp-p53 als Initiator der DNA-Reparatur und Trigger der Apoptose war entweder mit erhöhter oder mit erniedrigter Chemosensitivität der betroffenen Tumoren verbunden. Die zytotoxischen Effekte der DNA-verbindenden Chemotherapeutika wie Cisplatin können durch mutiertes p53, das nicht mehr länger die Reparatur des medikamenteninduzierten DNA-Schadens einleiten kann, gesteigert werden. Gleiches gilt für die Therapie mit Paclitaxel, das Mikrotubuli stabilisiert. Im Gegensatz dazu können DNA-Synthese-Blocker wie Fluorouracil die Apoptose über p53-abhängige Mechanismen auslösen. Daher wird die Wirkung dieser Chemotherapeutika bei fehlender p53-Funktion abnehmen [106]

1.5. Tumoroxygenierung

Aus klinischer Sicht zeichnet sich Gewebhypoxie durch eine geringe Sauerstoffverfügbarkeit oder niedrigen Sauerstoffpartialdruck (pO_2) aus, biochemisch ist es ein Zustand sauerstofflimitierten Elektronentransports.

Intratumorale Hypoxie ist die Folge einer unzureichenden Sauerstoffversorgung aufgrund funktioneller und struktureller Störungen der Mikrozirkulation, der Verschlechterung der Diffusionsbedingungen und tumorbedingter Anämie [152].

Bei zahlreichen Tumoren finden sich hypoxische Areale, die nur eine mangelhafte Sauerstoffversorgung aufweisen sowie anoxische Bereiche, die keinerlei funktionierende Sauerstoffversorgung mehr besitzen. Ursachen für die Hypoxie sind die schnelle Proliferation des Tumorgewebes, die mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch einhergeht, und eine anormale Vaskularisierung und Mikrozirkulation innerhalb des Tumors [68].

Zellen maligner Tumoren müssen nicht notwendigerweise die gleichen zellphysiologischen Funktionen wie gesunde Zellen erfüllen, daher ist in der Tumorforschung die Beobachtung biologischer und molekularer Effekte, die unter einem bestimmten kritischen pO_2 auftreten, von großer Bedeutung.

1.5.1. Hypoxie und Tumorbiologie

Es existieren generell drei Hauptmöglichkeiten zellulärer Antwort auf Hypoxie: Inhibition der zellulären Proliferation, Induktion der Apoptose und die Freisetzung von Zytokinen. Tumorhypoxie und Reperfusion wechseln oft in kurzen Zeitintervallen, und die Art des Zelltodes, die der Reperfusion nach Ischämie folgt, ist die Apoptose.

Bcl-2 und BclxL verhindern konzentrationsabhängig den hypoxieinduzierten Zelltod.

Dauerhafte Hypoxie führt zu Instabilität und Heterogenität des Genoms und zu Selektionsdruck. Durch klonale Expansion werden Zelllinien gefördert, die bei niedrigerem pO_2 besser überleben und sich vermehren können. Dies bedingt eine maligne Progression, die sich klinisch in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit lokaler, perifokaler, regionaler und entfernter Verbreitung zeigen kann [48, 69,85, 166]. Durch Sauerstoffmangel wird außerdem die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren induziert, die die Neovaskularisierung des Tumors anregen [126]. Hierdurch werden weiteres Tumorwachstum und Redzidivbildung gefördert.

1.5.2. Tumoroxygenierung und Radiosensitivität

Die Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes ist entscheidend für das Ansprechen auf Radiotherapie, da bei einem geringen pO_2 im Tumorgewebe eine höhere Strahlendosis eingesetzt werden muss, um die gleiche Menge an Tumorzellen wie unter normoxischen Bedingungen abzutöten. Durch die Bestrahlung bilden sich Radikale, die Schäden an der DNA der Tumorzellen hervorrufen. Unter hypoxischen Bedingungen handelt es sich dabei vor allem um OH-Radikale, während im normoxischen Milieu vorwiegend die aggressiveren Peroxy-Radikale entstehen, deren DNA-Addukte die Zelle nur unvollständig reparieren kann [69].

Für die klinische Relevanz der Tumoroxygenierung auf den Erfolg einer Strahlentherapie gibt es eine Reihe von Hinweisen. Verschiedene Studien zeigen, dass eine mangelhafte Tumoroxygenierung mit einer schlechteren Prognose, kürzerem krankheitsfreiem Überleben und höherer Fernmetastierungsrate einhergeht und somit die Prognose verschlechtert. [130]

1.5.3. Tumoroxygenierung und Chemosensitivität

Auch für die Chemotherapie ist das Vorhandensein von Sauerstoff von zentraler Bedeutung, denn Zytostatika schädigen vornehmlich schnell proliferierende Zellen. Bei Sauerstoffmangel ist die Zellteilungsrate und somit auch die Wirksamkeit einer Chemotherapie jedoch deutlich vermindert. Für bestimmte alkylierende Substanzen, Antibiotika und Antimetaboliten konnte eine direkte Sauerstoffabhängigkeit in Bezug auf die Wirksamkeit gezeigt werden [155].

Teicher et al. 1981 [144] konnten in vitro belegen, dass die geringe Zellteilungsrate hypoxischer Zellen diese unempfindlich gegen Chemotherapeutika macht, die sich vornehmlich gegen sich schnell vermehrende Zellen richten.

Der Metabolismus von Zellen kann bei Hypoxie derart verändert sein [145], dass durch gesteigerte Zytostatikaentgiftung eine Chemoresistenz resultieren kann.

Schlechte Perfusion kann die Medikamentenverbreitung in hypoxischen Regionen zusätzlich noch limitieren.

Eine Veränderung der Genexpression, die den Zellen das Überleben bei hypoxischen Bedingungen ermöglicht, kann den intra- und extrazellulären pH-Wert verändern. Ojugo et al. 1998 [117] untersuchten die Aufnahme von 5-Fluorouracil durch Tumorzellen in vitro und stellten eine pH-Abhängigkeit fest.

Eine verbreitetes Chemotherapieschema ist das CMF-Schema. Teicher et al. 1994 [145] wiesen in vitro nach, dass das Ansprechen auf Cyclophosphamid durch oxygenierungsfördernde Medikamente verbessert wird.

Hypoxie ist vor allem auf Tumorzellen beschränkt. Daher gibt es Bemühungen, von dieser Eigenschaft maligner Zellen therapeutischen Gebrauch zu machen. Dies hat zur Entwicklung bioreduktiver Medikamente geführt, die sich vor allem gegen hypoxische Zellen richten. Der Prototyp bioreduktiver Agentien ist das Mitomycin C, ein Chinon-alkylierender Wirkstoff.

1.6. Tumoroxygenierung und p53-Akkumulation

Der Zusammenhang zwischen der Tumoroxygenierung und der p53-Expression wird von mehreren Autoren beschrieben [34, 48, 89, 166]. Man erwartet aufgrund experimenteller und theoretischer Überlegungen, dass bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck im Gewebe Zellen mit normalem p53 den programmierten Zelltod begehen, während Zellen mit mutiertem p53 überleben können und angiogene Wachstumsfaktoren, die das Tumorwachstum stimulieren, freisetzen.

Der durch die Hypoxie induzierte genotoxische Stress führt zu einem G1-Phase Arrest, mit der Folge einer p53-Stabilisierung und –Akkumulation [3, 25, 57]. So fanden Chandel et al. 2000 [3] erhöhte p53-Werte in Brustkrebszellen bei Hypoxie.

2. Zielsetzung der Arbeit

2.1. Zielsetzung des Gesamtprojekts

An der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München wurde zusammen mit der Klinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München, zwischen 1999 und 2001 ein interdisziplinäres Forschungsprojekt durchgeführt. Ziel des Projekts war es herauszufinden, ob der Sauerstoffpartialdruck in malignen Mammatumoren als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf primäre Chemotherapie herangezogen werden kann, und ob er andere prognostische bzw. prädiktive Faktoren beeinflusst.

2.2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Patientinnen mit Mammakarzinomen zu prüfen, ob sich eine Beziehung zwischen Tumoroxygenierung und p53-Status nachweisen lässt.

3. Patientencharakteristik und Methodik

3.1. Patientencharakteristik

Im Rahmen des oben genannten Forschungsprojektes wurde bei allen Patientinnen mit einem Mammatumor von klinisch über 2cm Durchmesser eine Sauerstoffmessung durchgeführt. Anschließend erfolgte die histologische Diagnostik mittels Stanzbiopsie. Diese umfasste neben den Standardparametern wie Tumorart, und Hormonrezeptorstatus auch p53, VEGF und den HER-2/neu-Status. Bei den Karzinomen handelte es sich um unilaterale primäre Mammakarzinome, die sonographisch vermessen werden konnten. Das Tumorstadium war T1-3, N0-1, M0. Zum Ausschluss von Fernmetastasen wurde bei den Patientinnen ein Knochenszintigramm und eine Röntgenaufnahme des Thorax, sowie eine Leberultraschalluntersuchung durchgeführt.

Die meisten Patientinnen wurden anschließend in nationale und internationale Therapieprotokolle eingeschlossen, in denen sie entweder eine primäre oder eine postoperative Chemotherapie erhielten.

Patientinnen, die jünger als 50 Jahre waren, wurden als prämenopausal eingestuft, ältere als postmenopausal [54].

Hormonrezeptor-negativ wurden nur die Fälle gewertet, bei denen sowohl für den Östrogen-, als auch für den Progesteron-Status ein immunhistochemischer Score von 0 vorlag.

3.2. Methodik

3.2.1. Messung des intratumoralen Sauerstoffpartialdrucks (pO_2)

Die Messung des Sauerstoffpartialdrucks erfolgte prätherapeutisch im Rahmen der histologischen Sicherung vor der diagnostischen Stanzbiopsie.

Die in der Literatur ausführlich beschriebene Methode [8, 67, 112,] wurde von Auer und Raab in zwei Punkten modifiziert:

1. Verwendung eines langen Metalltrokars als Führungszylinder für die Messsonde.
2. Sauerstoffmessung unter ständiger Sichtkontrolle mit Hilfe des diagnostischen Ultraschalls.

Auf Grund der oft tiefen Lage der Mammakarzinome, des Ausweichens wegen geringer Gewebefixierung und der Derbheit mancher Karzinome ist die pO_2 -Messung in vivo nicht als trivial anzusehen.

Bei unseren Messungen wurde ein Eppendorf Histogramm verwendet, der mit einer Nadelelektrode (Kathode: Platinelektrode; 300 μm Durchmesser) polarographisch den Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Die Referenzelektrode war eine Ag/AgCl-Elektrode im Abstand von 50 mm von der Einstichstelle. Nach Anlegen einer Polarisierungsspannung von -0,6 bis -1,0 V kam es an der Kathode zur Reduktion von molekularem Sauerstoff und somit zu einem, dem Sauerstoffpartialdruck proportionalen Stromfluss zwischen den Elektroden.

Die Messungen erfolgten nach Lokalanästhesie unter sonographischer Kontrolle. Vor jeder Messung wurde die Messsonde kalibriert. Bei der Sauerstoffmessung wurde die Sonde über einen Metalltrokar (1,8 mm Venenpunktionskanüle) geführt und von einem Schrittmotor automatisch in Schritten von 0,4 bis 1,0 mm vorgeschoben. Um Kompressionsartefakte durch die Nadel zu vermeiden wurde automatisch nach einer Vorwärtsbewegung eine Rückwärtsbewegung um ca. 0,3 mm durchgeführt, sodass das Gewebe mechanisch entlastet wurde. Es wurden auf diese Weise mehrere hundert pO_2 -Werte pro Messstrecke, den Messtracks, erfasst. Pro Messung wurden 4-6 Messtracks durchgeführt, aus deren Einzelwerten der Median des pO_2 des Tumors errechnet wurde. Es wurde darauf geachtet, dass die Messsonde nicht über die gegenüberliegende Grenze des Tumors hinaus geführt wurde. Nach jeder Messung wurde die Messsonde nachkalibriert.

Nur sonographisch bestätigte vollständig intratumorale Messungen wurden ausgewertet.

Im Anschluss an die Sauerstoffmessung erfolgte die Stanzbiopsie.

In der Literatur gibt es keine einheitliche Definition von biologisch begründbaren Gewebeoxygenierungsstufen [152].

Tumoren mit einem pO_2 von weniger oder gleich 2,5 mmHg wurden als anoxisch klassifiziert, Tumoren mit einem pO_2 von mehr als 2,5 mmHg wurden als nicht-anoxisch bezeichnet [70, 153, 113]. Diese Einteilung wird in der Literatur auch bei Chemotherapie häufig verwendet, stammt jedoch ursprünglich aus der Strahlentherapie. Anoxische Tumoren sind charakterisiert durch eine um 50%

reduzierte Strahlensensibilität gegenüber normoxischem Gewebe, das nach Hohenberger et al. 1998 [70] mindestens 10 mmHg Sauerstoffpartialdruck aufweist.

3.2.2. Bestimmung des Phosphoproteins p53

Die immunhistochemische p53-Bestimmung im Tumorgewebe erfolgte im pathologischen Institut am Rotkreuz Krankenhaus in München unter der Leitung von Herrn Dr. med. B. Högel und Herrn Dr. med. H. Stöger.

Es wurden immunhistochemischen Verfahren unter Verwendung eines polyklonalen Maus-Antikörpers eingesetzt (Firma Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA, Klon BP 53.12).

Der Antikörper bindet sowohl an den Wild-Typ des p53 als auch an das mutierte p53.

Er wurde in einer Verdünnung von 1 : 200 verwendet.

Die Schnittpräparate des in Formalin fixierten Tumorgewebes wurden in üblicher Weise entparaffiniert und rehydriert. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte mit 3% H₂O₂ (10 Minuten). Durch zweimalige mikrowelleninduzierte Erhitzung auf 100 Grad Celsius und anschließender Abkühlung für 20 Minuten erfolgte eine Demaskierung von Antigenen (Antigen retrieval).

Nach Inkubation in Vectostain Normalserum (20 Minuten) erfolgten Immunreaktionsschritte mit anti-p53 (60 Minuten), anti-Maus Sekundärantikörper (20 Minuten) und Vectastain ABC Reagenz (Vector-Laboratories, Burlingame, CA, USA) (20 Minuten). Nicht gebundener Antikörper wurde in den Zwischenschritten zwischen den Antikörperinkubationen durch Spülung der Schnittpräparate mit PBS entfernt.

Die p53-gebundenen Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch DAB (7 Minuten) markiert und die Schnittpräparate mit Hämatoxylin gegengefärbt. Alle Immunreaktionen erfolgten bei Raumtemperatur in Coverslips (Fa. Shandon).

P53 war durch ein braunes Reaktionsprodukt markiert, die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit einem Mikroskop BX (Fa. Olympus).

In Anlehnung an die Literatur wurde bei einer nukleären Färbung in mehr als 10% der Zellen das Gewebe als p53-positiv bewertet, Werte unter 10% als negativ [9, 29, 82, 136, 140].

Die Tumoren wurden gemäß konventioneller Kriterien der UICC histologisch klassifiziert [138].

3.2.3. Bewertung des Ansprechens auf primäre Chemotherapie

Das Ansprechen auf primäre Chemotherapie wurde histologisch nach der Operation bestimmt. Es wurde gemäß WHO-Kriterien [98] in Responder und non-Responder unterschieden.

Zu den Respondern zählten alle Tumoren mit pathologischer partieller Remission und pathologischer Komplettremission. Pathologische partielle Remission (pPR) war definiert als Reduktion des Produktes der größten beiden senkrecht aufeinanderstehenden Durchmesser vom Zeitpunkt der Stanze bis zum Operationszeitpunkt um mehr als 50% [58]. Von besonderer Bedeutung war die Untergruppe der pathologischen Komplettremission (pCR). Diese war definiert als das Fehlen jeglicher vitaler Tumorzellen im OP-Präparat. Zu den non-Respondern zählten alle Tumoren mit weniger als 50% Größenabnahme oder mit bis zu 25% Größenzunahme (pSD: pathological stable disease). Mehr als 25% Größenzunahme wurde als pPD (pathological progressive disease) bezeichnet [58].

3.2.4. Therapieprotokolle

Während des Zeitraumes in dem die Sauerstoffmessungen erfolgten, waren zwei nationale (GEPAR-DUO, GENARI) und ein internationales Studienprotokoll (ECTO) zur primär systemischen Therapie des Mammakarzinoms für die Patientenrekrutierung geöffnet. Die wichtigsten Ein- und Ausschlusskriterien waren bei diesen drei Studien im wesentlichen die gleichen und setzten ein histologisch gesichertes, zweidimensional messbares, unilaterales Mammakarzinom von über 2 cm Durchmesser voraus. Fernmetastasen mußten ausgeschlossen sein. Für das GENARI Protokoll, bei dem eine chemoendokrine Therapie verabreicht wurde, mußte ein positiver Hormonrezeptorstatus vorliegen.

Im GEPAR-DUO Protokoll der GABG (German Adjuvant Breast Cancer Group, Studienleiter: PD Dr. G. v. Minckwitz [162]) wurde präoperativ zwischen einem dosisdichten Therapiearm mit vier Zyklen Adriamycin/Docetaxel alle zwei Wochen und einem sequentiellen Arm mit vier Zyklen Adriamycin/Cyclophosphamid alle drei Wochen gefolgt von vier Zyklen Docetaxel alle drei Wochen randomisiert [Abbildung 1].

GEPAR-DUO

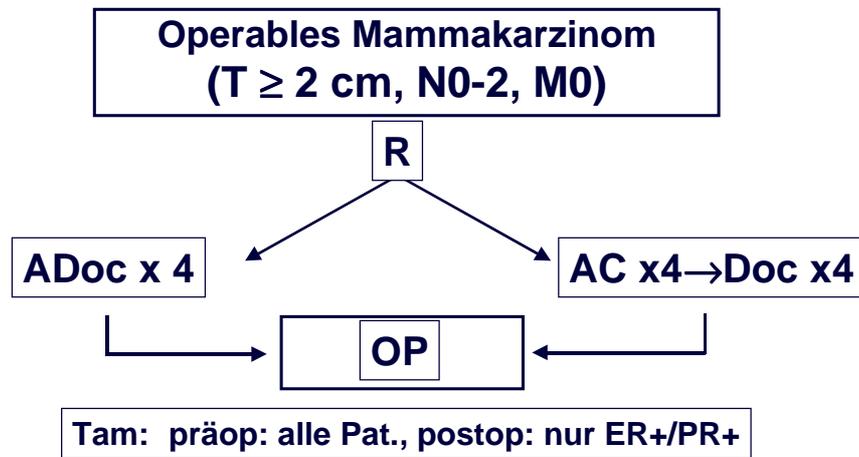


Abbildung 1: Studienschema GEPAR-DUO

Die ECTO Studie, eine vom italienischen nationalen Tumorzentrum in Mailand aus koordinierte, europaweite Studie (Studienleiter international: Prof. Luca Gianni, Studienleiter Deutschland: Prof. Eiermann [37, 52]), randomisierte zwischen drei Therapiearmen [Abbildung 2]:

ECTO - European Cooperative Trial in Operable Breast Cancer

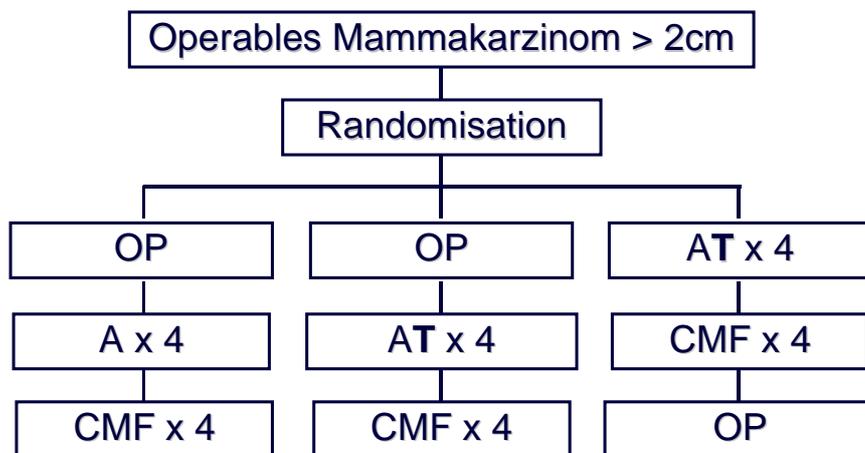


Abbildung 2: Studienschema ECTO

Arm A:

Postoperativ vier Zyklen Adriamycin alle drei Wochen gefolgt von vier Zyklen CMF, Tag 1+8 alle vier Wochen

Arm B:

Postoperativ vier Zyklen Adriamycin/Paclitaxel alle drei Wochen gefolgt von vier Zyklen CMF. Tag 1+8 alle vier Wochen

Arm C:

Präoperativ vier Zyklen Adriamycin/Paclitaxel alle drei Wochen gefolgt von vier Zyklen CMF. Tag 1+8 alle vier Wochen

Das GENARI Protokoll (Studienleiter: Prof. Eiermann) war eine Phase II Studie in der präoperativ zwölf wöchentliche Zyklen Epirubicin in Kombination mit dem oralen, steroidal Aromataseinaktivator Exemestan bei Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus verabreicht wurden [Abbildung 3].

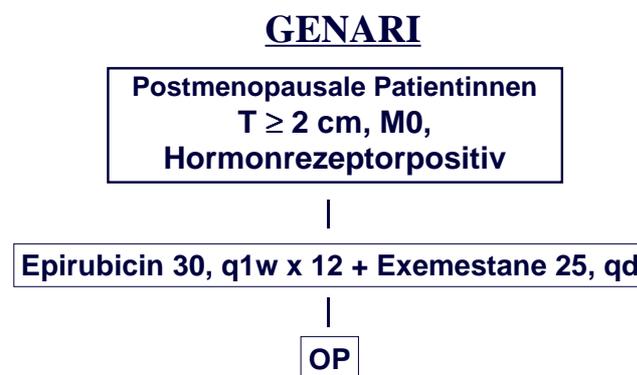


Abbildung 3: Studienschema GENARI

3.3. Datenauswertung

Alle patientenspezifischen Daten wurden in die Datenbank des von der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München entwickelten onkologischen Dokumentationssystems - ODS- eingegeben und die Ergebnisse für eine explorative Datenanalyse weitgehend deskriptiv ausgewertet, dargestellt und interpretiert.

Zur statistischen Datenauswertung wurde SPSS Version 11.0 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristik

Insgesamt wurden bei 131 Patientinnen mit invasiven Mammakarzinomen im Zeitraum von Oktober 1999 bis November 2000 der Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe und/oder der p53-Status bestimmt. Bei 109 Patientinnen wurde eine erfolgreiche Messungen des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe vorgenommen. Eine immunhistochemische Untersuchung von p53 fand bei 100 Patientinnen statt. Bei 78 Patientinnen lagen sowohl verwertbare pO₂-Messungen, als auch p53-Untersuchungen vor.

4.1.1. Altersverteilung

Der Altersmedian der Patientinnen zum Zeitpunkt der Stanzbiopsie lag bei 57 Jahren. Die jüngste erkrankte Patientin war 29 Jahre, die älteste 81 Jahre alt.

4.1.2. Verteilung der Tumoren nach histopathologischen Kriterien

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Tumoren nach histopathologischen Kriterien

Eigenschaften	n	%
Gesamt	131	
histo. Wachstumsmuster		
invasiv duktal	101	77,1
invasiv lobulär	17	13,0
sonstige	13	9,9
Nodalstatus		
N-	70	53,4
N+	61	46,6
Grading		
G1+G2	81	61,8
G3	50	38,2
Hormonrezeptor-Status		
positiv	100	76,3
negativ	31	23,7

Tabelle 1: Verteilung der Tumoren nach histopathologischen Kriterien

4.1.3. Ansprechen auf primäre Chemotherapie

Von 58 Patientinnen wurde das Ansprechen auf primäre Chemotherapie klinisch ermittelt. Dabei lag, wie Abbildung 4 veranschaulicht, die Anzahl der Responder bei 70,7% (n=41), die der non-Responder bei 29,3% (n=17).

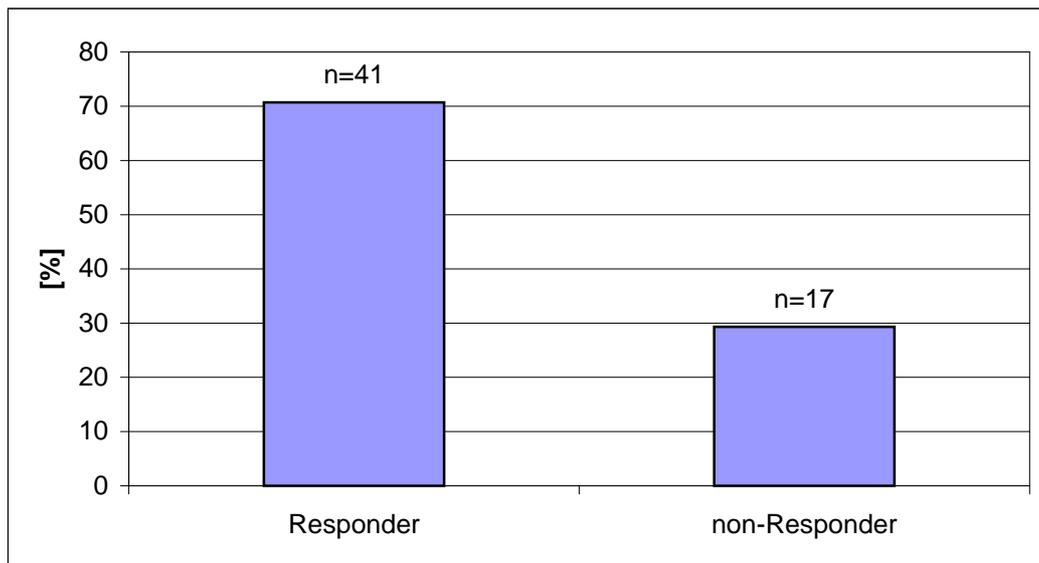


Abbildung 4: Ansprechen auf primäre Chemotherapie

4.2. pO₂-Messungen

4.2.1. Verteilung der medianen pO₂-Werte

Bei 109 Patientinnen wurde der intratumorale Sauerstoffpartialdruck gemessen.

Die pO₂-Werte lagen zwischen 0 und 45,1 mmHg mit einem Median von 1,8 mmHg.

Der Mittelwert war 5,2 mmHg ± 8,2mmHg.

Die Verteilung des pO₂-Werte ist in Abbildung 5 zu sehen.

56% (n=61) der untersuchten Tumoren hatten einen pO₂ ≤ 2,5 mmHg und waren damit anoxisch, 44,0% (n=48) waren nicht anoxisch [Abbildung 6]. Dazu zählten 13 (11,9%) mit Werten zwischen 2,6 mmHg und 5 mmHg, 12 (11,0%) lagen zwischen 5,1 mmHg und 7,5 mmHg, 5 (4,6%) zwischen 7,6 und 10,0 mmHg und 12 (16,5%) hatten einen pO₂ von mehr als 10 mmHg.

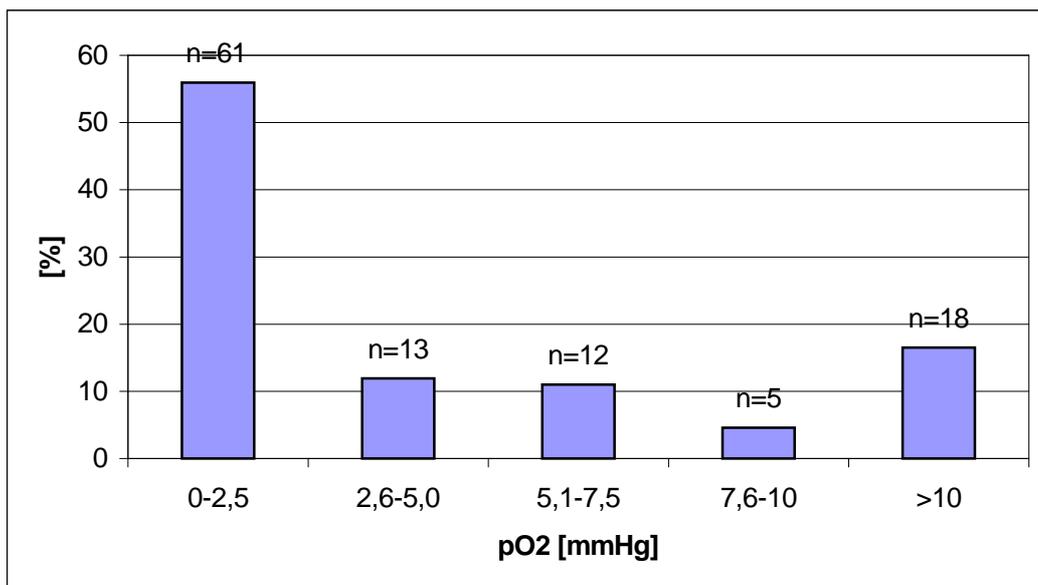


Abbildung 5: Verteilung der pO₂-Werte

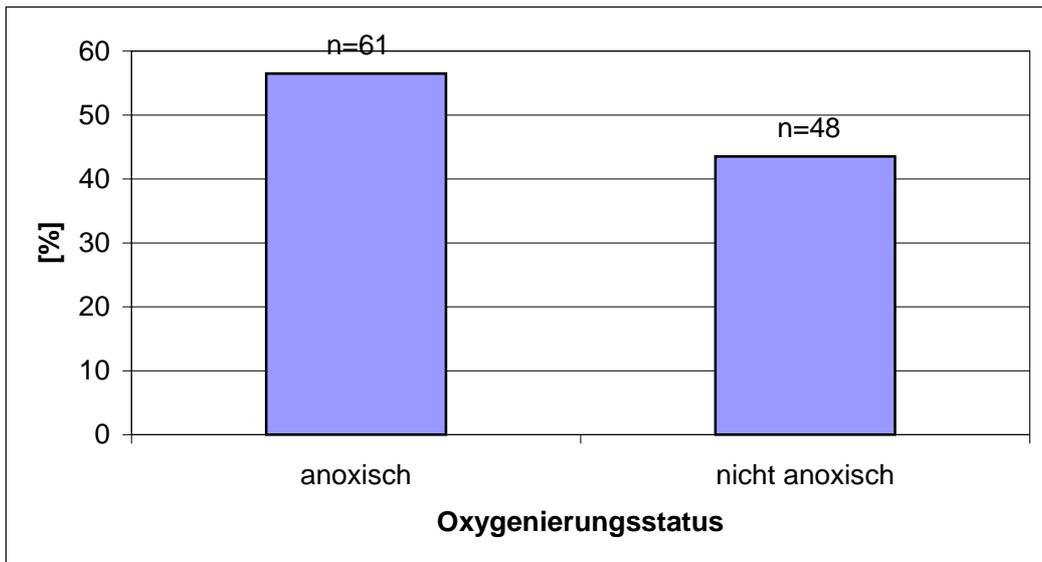


Abbildung 6: Verteilung des Oxygenierungsstatus

4.2.2. pO₂-Werte und klassische Prognosefaktoren

In Tabelle 2 ist die Verteilung der pO₂-Werte im Zusammenhang zu den klassischen Prognosefaktoren zu sehen.

	medianer pO ₂ [mmHg] (n=109)				p-Wert
	pO ₂ ≤ 2,5 mmHg (anoxisch)		pO ₂ > 2,5 mmHg (nicht anoxisch)		
Eigenschaften	n	%	n	%	
Gesamt	61	56,0	48	44,0	
Alter					
prämenopausal	18	29,5	12	25,0	0,601
postmenopausal	43	70,5	36	75,0	
Tumorgroße					
T1+T2	53	86,9	45	93,6	0,196
T3+T4	8	13,1	3	6,4	
Nodalstatus					
N-	25	41,0	31	64,6	0,012 (*)
N+	36	59,0	17	35,4	
Grading					
G1+G2	34	55,7	35	72,9	0,049 (*)
G3	27	44,3	13	27,1	
Hormonrezeptor- Status					
positiv	44	73,8	40	85,4	0,108
negativ	16	26,2	7	14,6	

Tabelle 2: pO₂-Werte und klassische Prognosefaktoren

(*) einseitiger Signifikanztest

4.2.2.1. Hormonrezeptorstatus

Bei 107 Patientinnen erfolgte eine Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks und der Hormonrezeptoren. Von diesen waren 78,5% (n=84) hormonrezeptor-positiv und 21,5% (n=23) hormonrezeptor-negativ.

Positive Hormonrezeptoren zeigten 73,3% (n=44) der anoxischen Tumoren und 85,1% (n=40) der nicht anoxischen Tumoren. Bei jeweils einer Patientin mit anoxischem und nicht anoxischem Tumor wurde kein Hormonrezeptorstatus bestimmt.

Anoxische und nicht anoxische Tumoren unterschieden sich nicht signifikant im Hormonrezeptorstatus ($p=0,108$).

4.2.2.2. Nodalstatus

Von allen Tumoren mit pO_2 -Messung lag eine Angabe über den Nodalstatus vor. 48,6% (n=53) der Tumoren zeigten eine Lymphknotenbeteiligung, 51,4% (n=56) nicht.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist waren bei den anoxischen Tumoren 41% (n=25) ohne Lymphknotenbeteiligung, während es bei den nicht anoxischen Tumoren 64,4% (n=31) waren.

Anoxische und nicht anoxische Tumoren unterschieden sich statistisch signifikant ($p=0,012$) hinsichtlich der Lymphknotenbeteiligung.

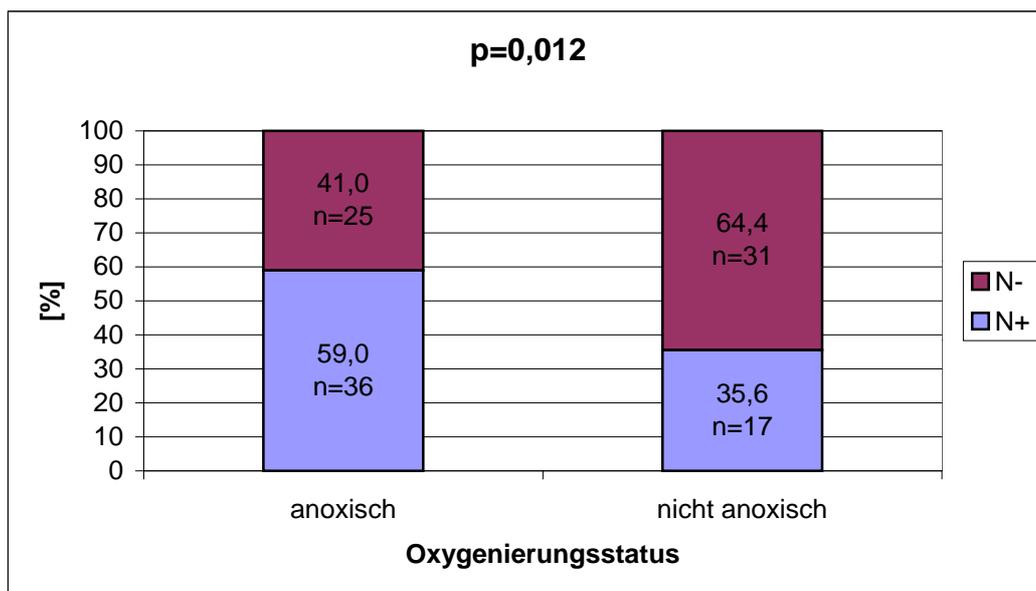


Abbildung 7: Oxygenierung und Nodalstatus

4.2.2.3. Grading

Von allen Tumoren mit pO₂-Messung lag eine Angabe über die Tumordifferenzierung vor.

Auf Grund der geringen Anzahl an G1-Tumoren wurde eine Gruppe aus G1 und G2 Tumoren gebildet. Insgesamt waren 63,3% (n=69) der Tumoren G1- und G2-Tumoren, 36,7% (n=40) waren G3-Tumoren.

Von den anoxischen Tumoren waren 44,3% (n=27) G3-Tumoren; bei den nicht anoxischen Tumoren waren es 27,0% (n=13).

Anoxische Tumoren waren damit statistisch signifikant (p=0,049) häufiger niedrig differenziert als nicht anoxische Tumoren [Abbildung 8].

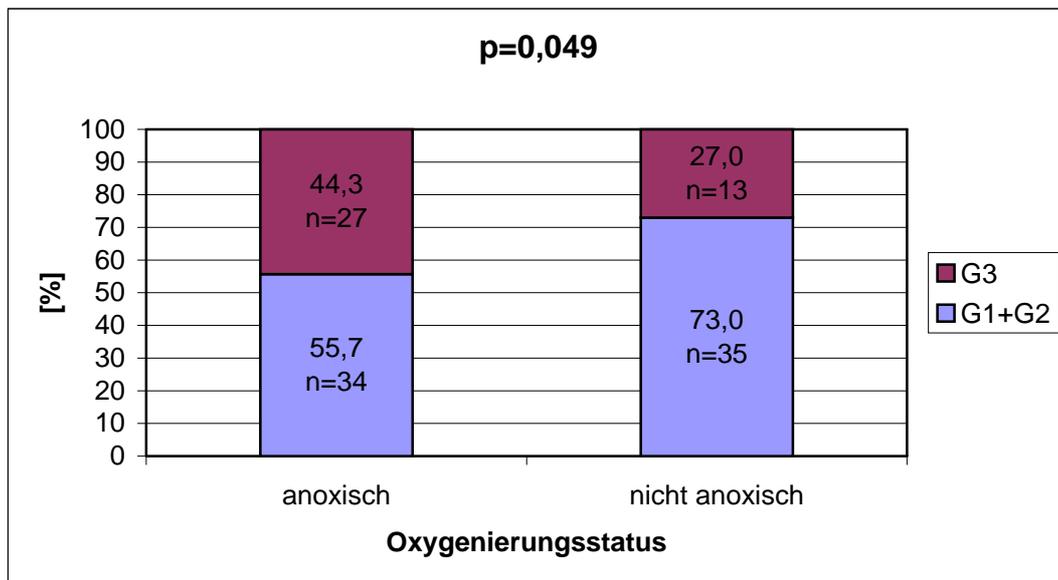


Abbildung 8: Tumoroxygenierung und Grading

4.2.3. Tumoroxygenierung und Ansprechen auf primäre Chemotherapie

Von 49 Patientinnen mit pO₂-Messung wurde das Ansprechen auf primäre Chemotherapie erfasst. Davon waren 29 anoxische Tumoren und 20 nicht-anoxische Tumoren. 72,4% (n=21) der anoxischen Tumoren waren Responder, während es bei den nicht anoxischen Tumoren 65% (n=13) waren.

Anoxische und nicht-anoxische Tumoren unterschieden sich im Ansprechen auf primäre Chemotherapie nicht signifikant (p=0,754) [Abbildung 9].

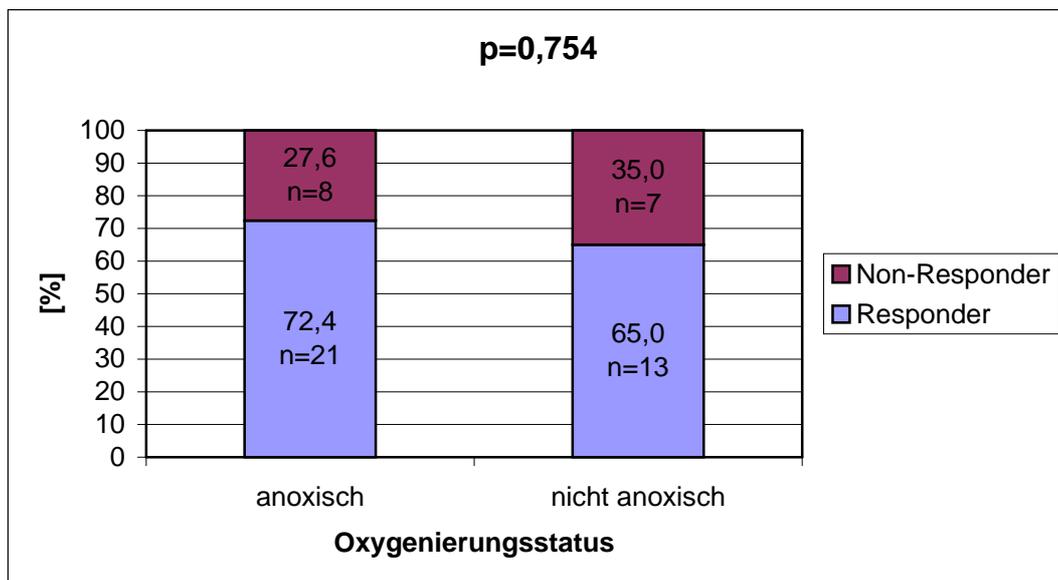


Abbildung 9: Tumoroxygenierung und Ansprechen auf primäre Chemotherapie

4.3. p53-Messungen:

4.3.1. Verteilung der p53-Akkumulation

Bei 100 Tumoren erfolgte eine Untersuchung auf p53.

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, ließen sich 67,0% (n=67) der untersuchten Tumoren immunhistochemisch mit dem MAbs BP53.12 anfärben und zeigten damit eine Akkumulation des Phosphoproteins p53. Bei 33,0% (n=33) Tumoren gelang dieser Nachweis nicht.

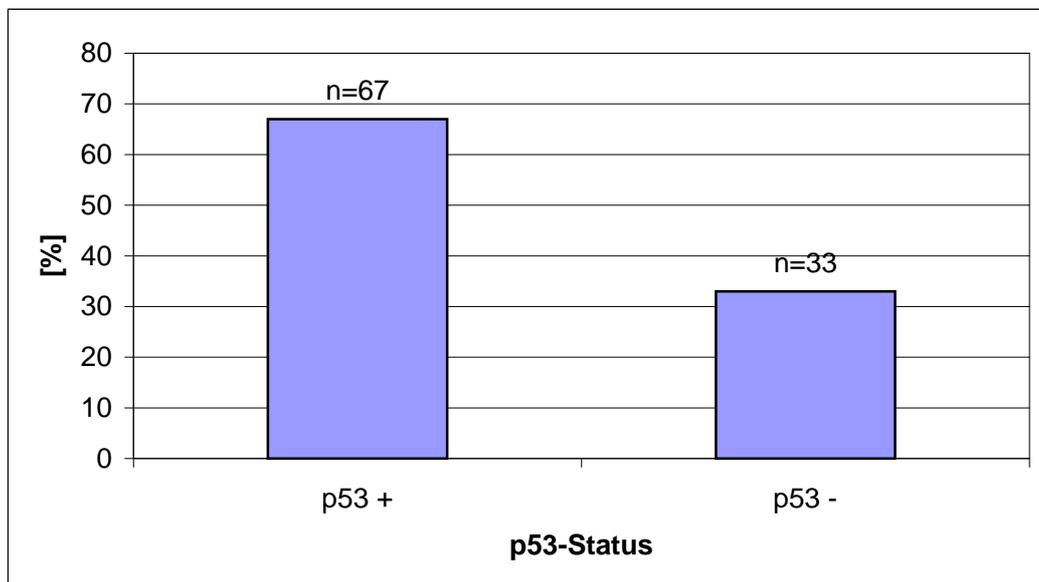


Abbildung 10: Nachweis der Akkumulation des Phosphoproteins p53

4.3.2. p53 und klassische Prognosefaktoren

Tabelle 3 zeigt die Verteilung des p53-Status in Abhängigkeit von den klassischen Prognosefaktoren.

	p53-Status (n=100)				p-Wert
	positiv		negativ		
Eigenschaften	n	%	n	%	
Gesamt	67	67,0	33	33,0	
Alter					
prämenopausal	18	26,9	12	36,4	0,36
postmenopausal	49	73,1	21	63,6	
Nodalstatus					
N-	37	55,2	16	48,5	0,67
N+	30	44,8	17	51,5	
Grading					
G1+G2	34	51,5	23	69,7	0,065
G3	33	48,5	10	30,3	
Hormonrezeptor- Status					
positiv	52	77,6	25	75,8	0,512
negativ	15	22,4	8	24,2	

Tabelle 3: p53-Status und klassische Prognosefaktoren

4.3.2.1. Hormonrezeptorstatus

Von allen Tumoren mit p53-Bestimmung wurde der Hormonrezeptorstatus bestimmt. 75,8% (n=25) der p53-negativen Tumoren waren hormonrezeptor-positiv; bei den p53-positiven Tumoren waren es 77,6% (n=52). Damit unterschieden sich p53-positive und -negative Tumoren statistisch nicht signifikant (p=0,512) im Hormonrezeptorstatus.

4.3.2.2. Nodalstatus

Eine Nodalstatus-Bestimmung lag bei allen Patientinnen mit p53-Bestimmung vor.

Von den 33 p53-negativen Tumoren waren 51,5% (n=17) mit Lymphknotenbeteiligung, während es bei den p53-positiven Tumoren 44,8% (n=30) waren.

p53-positive und -negative Tumoren unterschieden sich statistisch nicht signifikant im Nodalstatus ($p=0,67$).

4.3.2.3. Grading

Die Tumordifferenzierung wurde bei allen Tumoren mit p53-Bestimmung bewertet.

Von den p53-negativen Tumoren waren 30,3% (n=10) G3-Tumoren. Bei den p53-positiven Tumoren waren es 48,5% (n=33).

Es ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem p53-Status und der Tumordifferenzierung ($p=0,065$).

4.3.2.4. Menopausenstatus

Von den p53-negativen Patientinnen waren 63,6% postmenopausal; bei den p53-positiven Patientinnen waren es 73,1% (n=49).

Die Patientinnen mit unterschiedlichem p53-Status zeigten keine statistisch signifikanten Differenzen im Menopausenstatus ($p=0,36$).

4.3.3. p53 und Ansprechen auf primäre Chemotherapie

Insgesamt wurde bei 44 Patientinnen mit p53-Messung das Ansprechen auf primäre Chemotherapie erfasst. Davon waren 15 p53-negativ und 29 p53-positiv.

Bei den p53-negativen Patientinnen zeigten, wie in Tabelle 4 und Abbildung 11 illustriert, 66,7% (n=10) ein positives Ansprechen (Responder). Bei den p53-positiven Patientinnen waren 79,3% (n=23) Responder. p53-positive Patientinnen unterschieden sich damit im Therapieerfolg statistisch nicht signifikant von p53-negativen Patientinnen ($p=0,468$).

	p53-negativ	p53-positiv
Responder	66,7% (n=10)	79,3% (n=23)
non-Responder	33,3% (n=5)	20,7% (n=6)

Tabelle 4: Ansprechen auf primäre Chemotherapie und p53-Status

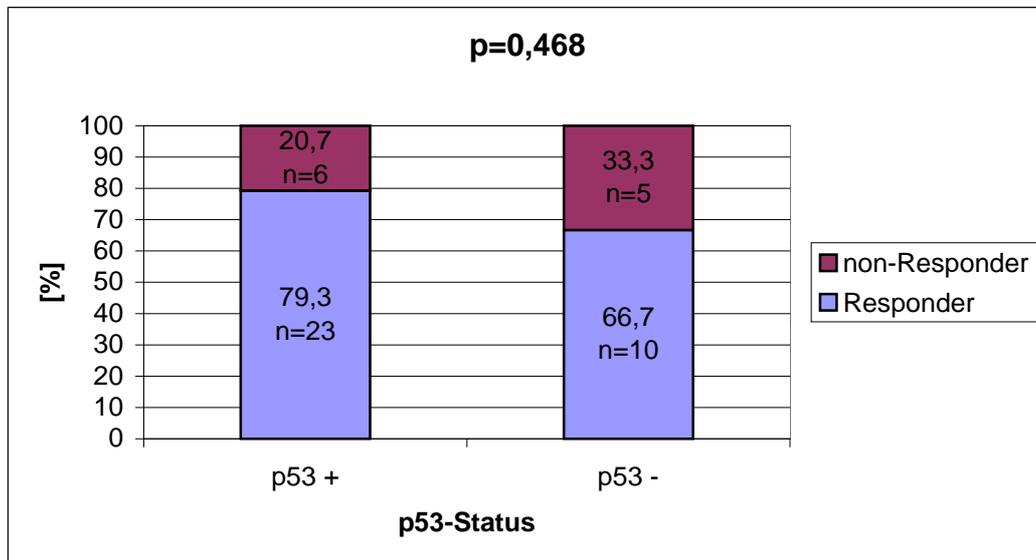


Abbildung 11: p53 und Ansprechen auf primäre Chemotherapie

4.4. p53-Akkumulation und Tumoroxygenierung

Bei 78 Tumoren wurde sowohl eine p53-Bestimmung, als auch eine pO₂-Messung durchgeführt. Von diesen Tumoren waren 53,8% (n=42) anoxisch und 46,2% (n=36) nicht-anoxisch; 32,1% (n=25) waren p53-negativ und 67,9% (n=53) p53-positiv. 73,8% (n=31) der anoxischen Tumoren waren p53-positiv. Bei den nicht anoxischen Tumoren waren 61,1% (n=22) p53-positiv. Statistisch waren p53-positive und -negative Tumoren nicht signifikant (p=0,331) im p53-Status verschieden. Tabelle 5 und Abbildung 12 verdeutlichen die Verteilung.

Die Ergebnisse des Teilkollektivs entsprechen den Ergebnissen des Gesamtkollektivs, wie in Abbildung 13 und 14 dargestellt wird.

	anoxisch	nicht anoxisch
p53-negativ	26,2% (n=11)	38,9% (n=14)
p53-positiv	73,8% (n=31)	61,1% (n=22)

Tabelle 5: p53-Akkumulation und Oxygenierungsstatus

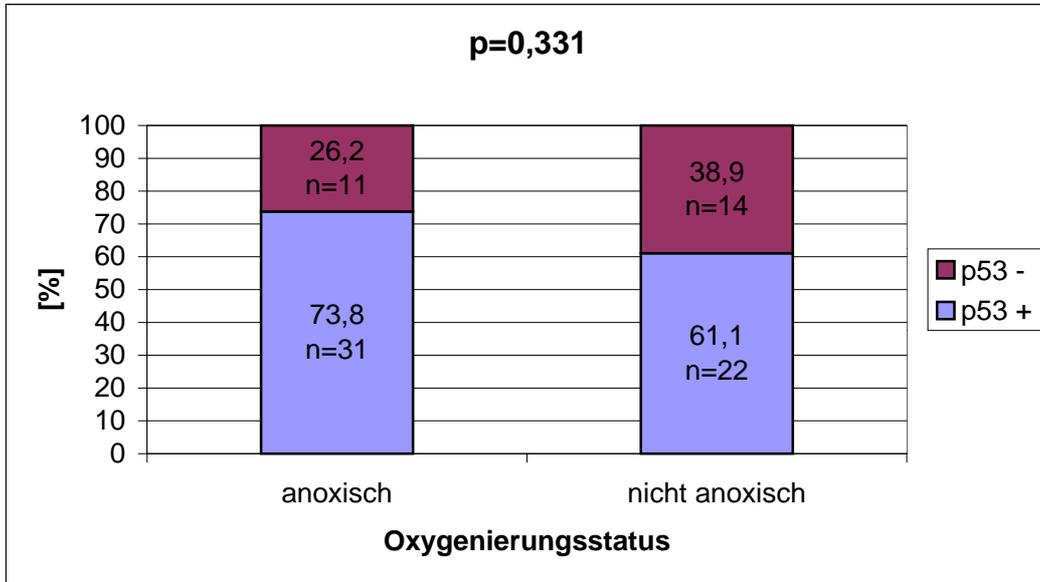


Abbildung 12: Tumoroxygenierung und p53-Akkumulation

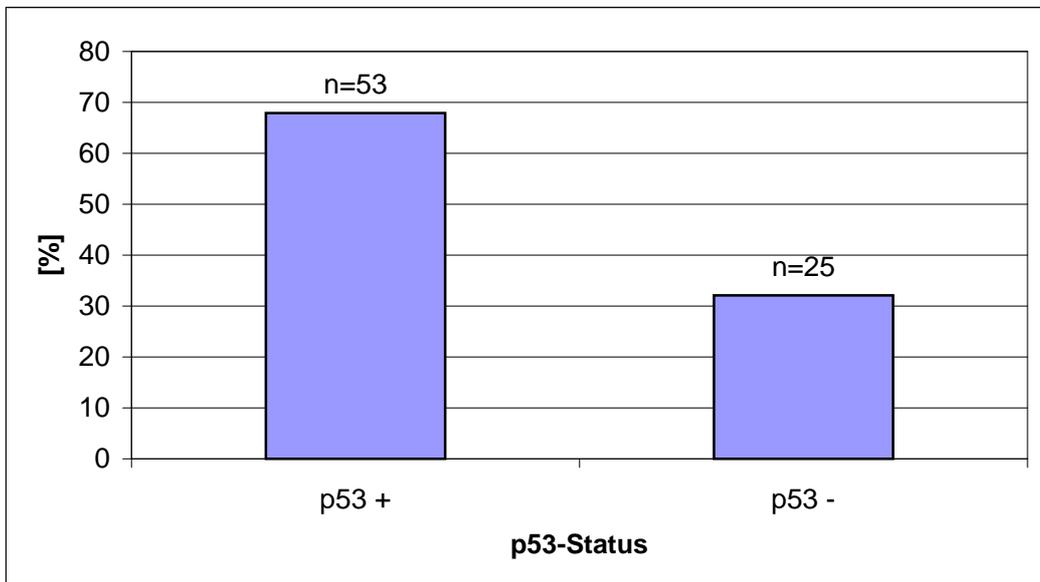


Abbildung 13: Nachweis der Akkumulation des Phosphoproteins p53 im pO₂-Kollektiv

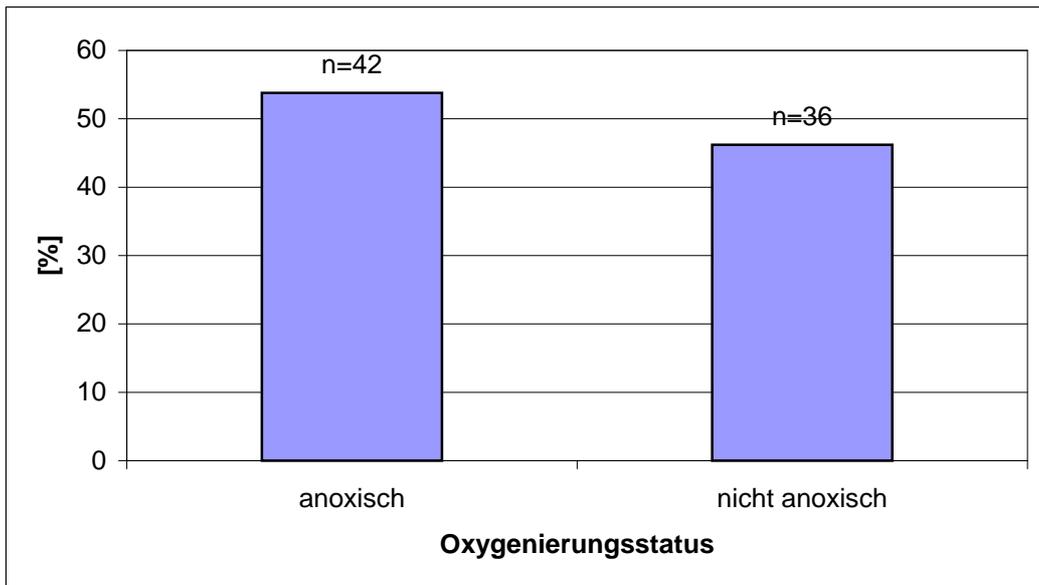


Abbildung 14: Verteilung des Oxygenierungsstatus im pO₂-Kollektiv

5. Diskussion

Viele biologische und zelluläre Marker wurden bereits auf ihren prognostischen Wert beim Mammakarzinom untersucht (eine Zusammenfassung findet sich in Sjöström 2002 [137] und Norberg et al. 1996 [110]).

Die Ergebnisse der Studien zu den verschiedenen prädiktiven Faktoren sind aber nach wie vor widersprüchlich.

Das Interesse am Zusammenhang von p53 und der Tumoroxygenierung beim Mammakarzinom basiert auf der biologischen Funktion dieses Tumorsuppressorgens. Während es im normalen Proliferationsgeschehen anscheinend eine eher untergeordnete Rolle spielt, wird es in genotoxischen Stresssituationen aktiviert. Zu den Auslösern von Zellstress, der zu verstärkter p53-Expression führt, gehören beispielsweise die Hyperthermie, chemische Mutagene, virale Onkoproteine, ionisierende Strahlung und auch die Hypoxie.

Das p53-Protein ist in normalen Zellen auf Grund der kurzen Halbwertszeit kaum nachweisbar. Erst nach Zellstress steigt die Halbwertszeit deutlich an, mit der Folge eines intrazellulären Konzentrationsanstiegs [2].

Durch p53 werden Prozesse aktiviert, die entweder den Zellzyklus in der G1-Phase stoppen und dadurch Reparatur des Defekts ermöglichen oder bei stärkeren Schäden durch Apoptose zur Eliminierung der betroffenen Zelle führen.

In 46 –71% der humanen Tumoren ist p53 durch Mutation inaktiviert [103, 121], was zur Entwicklung und Entdifferenzierung von Tumoren führen kann.

In unserer Studie wurde der Zusammenhang zwischen dem Tumorsuppressorgen p53 und dem Sauerstoffpartialdruck in primären Mammakarzinomen am Modell der primär systemischen Chemotherapie untersucht. In vivo-Vergleichsmessungen des Sauerstoffpartialdrucks in Mammakarzinomen wurden bisher nur in Kollektiven von maximal 36 Patientinnen durchgeführt [70].

Unsere Studie war die erste klinische Studie mit einem Kollektiv von mehr als 100 Patientinnen.

Unser Patientenkollektiv entsprach hinsichtlich der klassischen Prognosefaktoren wie Alter, Histopathologie, Tumorigradung und Hormonrezeptorstatus den Erwartungen, die sich aus den Studien von Makris et al. 1997 [96], Geisler et al. 2001 [50] und Fisher et

al. 1998 [44] ergaben. Lediglich bei der Tumorgröße zeigte sich entsprechend der von uns gewählten Selektion eine Häufung der T2-Tumoren.

67% der von uns immunhistochemisch mit dem Antikörper BP53.12 untersuchten Tumoren waren p53-positiv. Dies ist ein etwas höherer Wert als bei Studien an Brusttumoren von Aziz et al. 2001 [7] (55,2%), Sjöström et al. 2000 [136] (48%), Ioakim-Liossi et al. 1998 [75] (45%) und 2001 [74] (51%) gefunden wurde, steht aber in Einklang mit Ergebnissen von Hollstein et al. 1991 [71] die eine Mutation des p53-Gens mit Akkumulation von p53 bei wenigstens 50% der humanen Tumoren belegen konnten.

Wir konnten in unserer Studie keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der p53-Expression und den klassischen Prognosefaktoren finden, was von Klorin et al. 2002 [87] in einer Studie an 216 primären Mammakarzinomen ebenfalls gezeigt wurde.

Dagegen fanden Thor et al. 1992 [146] in einer retrospektiven Studie an 295 Patientinnen mit primären Mammakarzinomen eine Korrelation von p53 zu negativem Hormonrezeptorstatus. Dabei wurde p53 im Gegensatz zu unserer Nachweismethode mit dem Antikörper PAb1801 bestimmt. Es fand sich zudem eine Korrelation von p53 und Grading.

Ciesielinski et al. 1995 [28] zeigten ebenfalls eine signifikante Beziehungen von p53-Akkumulation und niedriger Hormonrezeptorausstattung.

Mehrere Studien stellten ebenso wie wir keinen Zusammenhang zwischen dem p53-Status und dem klinischen Nodalstatus am Mammakarzinom fest [6, 60, 102]. Darunter war eine Studie von Montero et al. 2002 [102] an 458 operablen Mammakarzinomen. Der verwendete p53-Antikörper war dabei PAb1801.

Ioakim-Liossi et al. 2001 [74] berichteten in einer Studie an 75 invasiv duktalem Mammakarzinomen von einem Zusammenhang zwischen Tumordifferenzierung und p53-Status. Studien anderer Autoren zeigten ebenfalls diesen Zusammenhang [77].

Eine Korrelation von p53-Akkumulation und Tumorgröße war in unserem Patientenkollektiv nicht gegeben. Dies entspricht dem Ergebnis von Gursan et al. 2001 [60], die an 75 invasiv duktalem Mammakarzinomen auch keinen Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und der p53-Protein-Akkumulation bestätigen konnten. Thor et al. 1992 [146] berichteten Gleiches.

Hinsichtlich des Ansprechens auf primäre Chemotherapie erwarteten wir ein schlechteres Ansprechen p53-positiver Tumoren, unter der Annahme, dass ein hoher Teil der p53-positiven Tumoren mutiertes p53 akkumuliert. Diesen Zusammenhang konnten wir an den 44 Patientinnen mit vorwiegend T2-Tumoren, bei denen wir das Ansprechen auf primäre Chemotherapie beurteilten, jedoch nicht bestätigen.

Im Ansprechen auf primäre Chemotherapie unterschieden sich p53-positive Patientinnen nicht signifikant ($p=0,468$) von p53-negativen Patientinnen. Bei den p53-negativen Patientinnen zeigten 10 (66,7%) ein positives Ansprechen (Responder), 5 (33,3%) waren non-Responder. Von den 29 p53-positiven Patientinnen waren 23 (79,3%) Responder und 6 (20,7%) non-Responder.

Diese Resultate stehen in Einklang mit einer Studie von Makris et al. 1997 [96]. Darin konnte an 90 Patientinnen mit primären Mammakarzinom ebenfalls kein prädiktiver Wert von p53 für das Ansprechen auf primäre Chemotherapie belegt werden. Allerdings waren hier nur 39% der untersuchten Tumoren p53-positiv. Die Bewertung von p53 erfolgte immunhistochemisch mit einer Mischung der p53-Antikörper PAb240 und PAb1801. p53 wurde über einen Score aus Anzahl der gefärbten Zellen und Färbungsintensität bewertet. Die Chemotherapie bestand aus 4 Zyklen Mitoxantron und Methotrexat, in unserem Kollektiv kamen hingegen häufiger Taxane zur Anwendung.

Sjögren et al. 1996 [135] beurteilten p53 durch Sequenzierung und immunhistochemisch mit dem Antikörper PAb180 bei 316 Patientinnen mit primären Mammakarzinomen. Patientinnen, die p53-positiv waren, hatten ein signifikant kürzeres Überleben und eine höhere Rezidivrate. Daidone et al. 1999 [30] fanden dagegen bei 136 primären operablen Mammakarzinomen ein besseres Ansprechen p53-positiver Tumoren.

In der Literatur existieren einige Studien, die den prädiktiven Wert von p53 am fortgeschrittenen Mammakarzinom beurteilen [1, 15, 17, 29, 30, 50, 61, 82, 97, 109, 136].

Hamilton et al. 2000 [61] konnten dabei keine Korrelation zwischen der p53-Akkumulation und dem klinischen Ansprechen auf Doxorubicin oder Paclitaxel bei 114 Patientinnen mit fortgeschrittenen Mammakarzinom feststellen.

Geisler et al. 2001 [50] fanden ebenso keinen Zusammenhang zwischen dem immunhistochemischen p53-Status und dem Ansprechen auf primäre Chemotherapie mit Doxorubicin. Das Patientenkollektiv bestand hier aus 94 Patientinnen mit T3/T4-

und/oder N2-Mammakarzinomen. p53 wurde über einen Index, der sich aus Anzahl der gefärbten Zellen und Intensität der Färbung zusammensetzte, bewertet. Der verwendete Antikörper war DO7, das Ansprechen wurde klinisch bewertet, wobei SD, PR und CR als Responder gewertet wurden. Diese Einteilung der Responder entspricht nicht unserer Einteilung. Wir werteten nur pCR und pPR als Responder.

Eine fehlende Assoziation zwischen dem p53-Status und dem Ansprechen auf primäre Chemotherapie mit A-VCMF fanden auch Mathieu et al. 1995 [97] bei 86 fortgeschrittenen Mammakarzinomen, wobei der cut off für die Beurteilung der p53-Akkumulation bei 5% gefärbter Zellen lag.

Sjöström et al. 2000 [136] konnten die Rolle von p53 als prädiktiven Marker beim fortgeschrittenen Mammakarzinom in einer randomisierten multizenter-Studie weder an 72 Patientinnen mit Docetaxel-Chemotherapie noch an 62 Patientinnen mit Methotrexat/5-Fluorouracil-Chemotherapie bestätigen. Die immunhistochemische p53-Bestimmung wurde dabei mit dem Klon DO7 von Dako durchgeführt. Eine Positivität von p53 wurde ab 10% gefärbter Zellen zuerkannt.

Bottini et al. 2000 [17] verglichen an 143 T2-4, N0-1, M0 Mammakarzinomen die Eignung von p53 als prädiktiven Marker bei primärer Chemotherapie mit CMF/Tamoxifen gegen Epirubicin. Patienten mit akkumuliertem p53 zeigten hier ein schlechteres Ansprechen auf primäre Epirubicin-Chemotherapie. Der cut off für die Bewertung von p53 lag bei 10%, der verwendete Antikörper war DO7.

Die Rolle des p53-Status als prognostischen Marker bei adjuvanter Chemotherapie an Mammakarzinompatientinnen wurde auch bereits von mehreren Autoren beschrieben [134, 146, 24, 93] und zeigte ebenso kein einheitliches Bild.

Die Ursachen der unterschiedlichen Ergebnisse aus Studien mit immunhistochemischen Methodiken der p53-Bestimmung können vielfältig sein.

Der von uns verwendete panreaktive Antikörper BP53.12 markiert sowohl den Wildtyp als auch die mutierte Form des p53-Proteins. Insbesondere zu Beginn der klinischen p53-Analysen wurde postuliert, dass wt-p53 auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit im Gegensatz zu mutierten Varianten immunhistochemisch nicht nachweisbar ist. Auf Grund der geringen Halbwertszeit von wt-p53 detektiert man zwar hauptsächlich akkumuliertes mutiertes-p53 (mt-p53), die Messung unterliegt allerdings Ungenauigkeiten von bis zu 30% [149]. Andere Autoren [18] konnten höhere

Konzentrationen von wt-p53 nachweisen, die beispielsweise über eine Absenkung des mdm2-Proteins entstehen können.

Mutiertes p53 ohne Überexpression des Proteins findet sich bei verschiedenen Autoren zwar auch, wurde aber insgesamt eher selten beschrieben [56].

Eine weitere Quelle der Ungenauigkeit in immunhistochemischen Studien ist, dass sie bei heterogener Expression nur eine Schätzung positiver Anfärbung verschiedener Proteine liefern. Es können keine Rückschlüsse über Interaktionen verschiedener Faktoren gezogen werden. Daher wäre eine doppelte immunhistochemische Technik besser geeignet.

Die Variabilität der p53-Ergebnisse könnte zudem auf die unterschiedlichen immunhistochemischen Techniken zurückzuführen sein. So unterscheiden sich die Methoden der Antigen-Erkennung durch Verwendung unterschiedlicher Enzyme, Hitzezuführung, Pufferexposition und Zeitprotokolle, wodurch die Ergebnisse beeinflusst werden.

Von großer Bedeutung bei der Bewertung der p53-Akkumulation ist der Schwellenwert im immunhistochemischen Präparat, ab dem das Präparat als positiv bewertet wird. Da es keinen standardisierten Schwellenwert gibt, wird dieser von vielen Autoren unterschiedlich angesetzt und ist damit eine Schwachstelle in der Interpretation. So werteten beispielsweise Becker et al. 2000 [9] Präparate mit mehr als 10% gefärbter Kerne als p53-positiv, während O'Hanlon et al. 2002 [116] ab 20% eine p53-Positivität zuerkannten. Thor et al. 1992 [146] bewerteten dagegen ein Präparat bei dem geringste Immunfärbung zu sehen war bereits als p53-positiv. Bei Fresno et al. 1997 [46] waren Präparate erst mit mehr als 50% gefärbter Zellen p53-positiv. Sirvent et al. 2001 [134] bewerteten p53 semiquantitativ über einen Score in den die Zahl der gefärbten Zellen und die Färbeintensität eingingen.

Als zusätzliche Problematik könnte fehlende Färbung auf subzelluläre Rückverteilung von mt-p53 zurückzuführen sein, mit der Folge eines Unterschreitens des Schwellenwerts.

Der für unsere Studie verwendete Antikörper BP53.12 ermöglichte, wie alle kommerziell verfügbaren Antikörper, keine Differenzierung zwischen mt-p53 und wt-p53. Zur Bestimmung von p53 wurden in der Literatur eine Vielzahl verschiedener Antikörper verwendet, die an ähnliche, aber nicht gleiche Epitope binden und sowohl an wt-p53 und an mt-p53 binden [72].

Die Verwendung unterschiedlich spezifischer und sensitiver Antikörper gegen p53 erschwert Vergleiche zwischen den Studien.

In einigen Studien wurde p53 nicht immunhistochemisch quantifiziert.

Neben der immunhistochemischen Bestimmung wurden beispielsweise die FACS-Analyse [166] und der Western Blot [22] angewandt. Teilweise erfolgte auch mittels PCR die Messung von RNA anstelle des Proteins [133], wobei die quantitative Umsetzung in Protein schwer abzuschätzen war.

Die vermeintlichen Widersprüche der klinischen Daten im Vergleich zu experimentellen Daten von Graeber et al. 1994 [57] und Amellem et al. 1997 [4] sind neben den methodischen Problemen erklärbar durch eine reduzierte Betrachtungsweise der experimentellen Studien, bei denen eine definierte Sondersituation untersucht wurde. In diesen Studien wurden Zellen mit Wildtyp-p53 mit solchen verglichen, bei denen lediglich das p53-Gen mutiert war. Zur Evaluierung des Effekts wurden weitere genetische Veränderungen soweit wie möglich ausgeschlossen, was für klinische Tumoren sehr untypisch ist. Klinisch erwartet man eher eine Mischung verschiedener Mutationen, die zu einer höheren Wahrscheinlichkeit führen, einem hypoxievermitteltem Selektionsdruck auszuweichen. Tumoren, die nicht mit p53-Mutationen einhergehen, bestätigen durch ihr Verhalten diese Aussagen. Beispielsweise kann p53 auch unmutiert durch virale Onkogene stabilisiert und inaktiviert werden. Im Ablauf der Apoptose können auch andere vorgeschaltete mutierte Gene wirksam werden, so dass kein Selektionsdruck für Mutationen im p53-Gen besteht.

Hypoxie kann so auf völlig verschiedenen, auch p53-unabhängigen Wegen zur Malignisierung der Tumoren führen [4, 25]. Eine gesteigerte Tumoraggressivität kann daher, muss aber nicht mit einer p53-Überexpression assoziiert sein.

Von zukünftiger Bedeutung wird die analytische Unterscheidung von mutiertem und Wild-Typ-p53 sein, sowie die Lokalisation von Mutationen, die entscheidend ist für biologische Konsequenzen.

Dieser biologisch aktive Anteil könnte prädiktiven Wert aufweisen, ist jedoch schwer ermittelbar, da es eine Vielzahl von Mutationen gibt und die Bestimmung technisch sehr anspruchsvoll ist. Geeignet wäre beispielsweise die DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) [59] und die TTGE (temporal temperature gradient gel electrophoresis, wie sie von Börresen-Dale 1997 [16] verwendet wurde, gefolgt von einer

Sequenzanalyse. Allerdings ist sie technisch aufwendig, stör anfällig und zeitintensiv [39].

Cabelguenne et al. 2000 [23] belegten in einer prospektiven Studie an 106 Patienten mit Kopf-/Hals-Tumoren eine Assoziation von mutiertem p53-Gen in der Tumor DNA und dem Ansprechen auf primäre 5-FU-Cisplatin-Chemotherapie.

Die Analyse des mutierten p53-Gens wurde mittels DGGE und Sequenzanalyse durchgeführt. Es wurden dabei Mutationen von Exon 4 bis 9 untersucht. Der p53-Mutationsstatus der Tumoren korrelierte nicht mit der Tumorgröße und der Lymphknotenbeteiligung.

Es konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Mutationstypen (gain-of-function oder loss-of-function) und dem Ansprechen auf primäre Chemotherapie gefunden werden, wie ihn Aas et al. 1996 [1] und Bergh et al. 1995 [11] bei Mammakarzinompatientinnen fanden.

Bei DNA-schädigender Therapie (Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid) hatte in einer Studie von Kandioler-Eckersberger et al. 2000 [82] an 82 Patientinnen mit T3- und T4-Mammakarzinomen p53-Akkumulation und Mutation einen signifikant negativen Einfluss auf das Ansprechen primärer Chemotherapie, während bei Paclitaxeltherapie mutiertes p53 mit besserem Ansprechen assoziiert war. Dies könnte mit einem Verlust des G1-Arrests durch p53-Versagen zusammenhängen. Daher könnten Patienten mit nicht funktionierendem p53 mehr von Paclitaxel profitieren.

Der Grund für den fehlenden Zusammenhang zwischen der p53-Akkumulation und dem Ansprechen auf Chemotherapie, der in unserer Studie gezeigt wurde, könnte neben der bereits erörterten methodischen Problematik darin liegen, dass die p53-abhängige Apoptose nicht die einzige Reaktion auf DNA-Schädigung durch primäre Chemotherapie ist.

Eine Zelle mit defektem p53 wird durch DNA-schädigende Chemotherapeutika keine p53-abhängige Apoptose begehen können, p53-unabhängige Apoptosewege werden aber dennoch möglich sein [21]. Daher muß p53-unabhängigen Mediatoren der Apoptose, wie bcl-2 [38], p63, p73 [76], oder p21 mehr Bedeutung bei der Frage nach Chemotherapieresistenz beigemessen werden [167].

Royds et al. 1997 [129] beschrieben drei Haupttypen der zellulären Antwort auf Hypoxie in Normalgewebe:

Inhibition der zellulären Proliferation, Induktion der Apoptose und die Freisetzung proangiogener Zytokine.

Im Tumorgewebe spielt das meist mutierte p53-Protein eine wichtige Rolle bei der Regulation von Transkriptionsgenen des Zellzyklus und der Apoptose. Mutiertes p53 stellt jedoch auch einen Überlebensvorteil für Zellen unter hypoxischen Bedingungen dar. Der durch Hypoxie ausgelöste Zellstress induziert vermutlich p53 über andere Wege als DNA schädigende Substanzen.

Diese Zusammenhänge sollten in unserer Studie näher untersucht werden.

Eine wesentliche Erkenntnis unserer Ergebnisse ist die geringe Oxygenierung von Mammakarzinomen.

Die pO₂-Werte der 109 in unserem Kollektiv gemessenen Patientinnen lagen zwischen 0 und 45,1 mmHg mit einem Median über alle Tumoren von 1,8 mmHg. Der Mittelwert lag bei 5,2 mmHg ± 8,2 mmHg.

Vaupel et al. 1991 [153] fanden bei 15 Mammakarzinomen (T1-T4) einen medianen pO₂-Wert von 30 mmHg. 6 der 15 untersuchten Tumoren hatten einen pO₂-Wert von weniger als 2,5 mmHg.

Hohenberger et al. 1998 [70] untersuchten in einer klinischen Studie 36 Mammakarzinome. Die Median-pO₂-Werte dieser Studie unterschieden sich mit einem Gesamt-Median von 44 mmHg erheblich von den in unserer Studie gemessenen Werten. Runkel et al. [132] fanden in einer Studie an 26 Mammakarzinomen einen Median-pO₂ von 31,5 mmHg (n=26).

Die gemessenen Oxygenierungswerte von Mammakarzinomen waren in diesen Studien höher als in der Literatur für benignes Mammgewebe angegeben ist [132, 153].

Die intra- und intertumorale Variabilität der pO₂-Werte war bei den 109 vorwiegend T2-Mammakarzinomen unserer Studie sehr hoch. Vaupel et al. 1990 [154] fanden bei ihren Messungen an 6 primären Mammakarzinomen ebenfalls eine hohe Inhomogenität der intra- und intertumoralen pO₂-Messwerte.

Ebenso wie Vaupel et al. 2000 [151] konnten wir keine Korrelation zwischen dem Hormonrezeptorstatus, der Tumorgröße und dem Oxygenierungsstatus zeigen, allerdings fanden wir einen Zusammenhang mit dem Grading und dem klinischen Nodalstatus. G3-Tumoren wiesen wie bei Hohenberger et al. 1998 [70] eine reduzierte

Gewebeoxygenierung auf, die auf eine Verschlechterung der Mikrozirkulation und der Diffusionsbedingungen zurückgeführt werden kann [152]. Der häufigere Lymphknotenbefall anoxischer Tumoren deutet auf eine höhere Aggressivität dieser Tumoren hin.

Die Gewebeoxygenierung wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren unterschiedlich bestimmt, wobei die polarographische Messung mit der Eppendorf-Sonde bei der klinischen Messung als Goldstandard gilt.

Die großen Unterschiede unserer Messergebnisse im Vergleich zur Literatur sind durch methodische Unterschiede erklärbar.

Wir verwendeten zur pO_2 -Messung einen starren Metalltrokar, der im Gegensatz zu dem sonst verwendeten Kunststofftrokar keine Flexion und damit Verfälschung der Ergebnisse verursacht. Daneben kontrollierten wir während des gesamten Messprozesses und nicht nur anfänglich die Lage der Elektrode sonographisch, um sicherzustellen, dass die Messungen ausschließlich im Tumor stattfanden. Diese Kontrollmöglichkeit bestand bei den in der Literatur beschriebenen Messungen nicht [70, 151].

Im Falle einer Assoziation von Hypoxie und p53-Status wäre es mit Hilfe der Eppendorf-Sonde potentiell möglich, nicht nur die strahlentherapeutisch relevante Hypoxie der Tumoren zu bestimmen, sondern indirekt auch Hinweise auf die Aggressivität der Malignome zu gewinnen.

Im Gegensatz zu vorliegenden experimentellen und klinischen Daten fand sich jedoch in unserem Patientengut keine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem p53-Status und der Tumoroxygenierung.

73,8% der anoxischen Tumoren in unserem Kollektiv waren p53-positiv, während es bei den nicht anoxischen Tumoren 61,1% waren. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,331$).

Die Zuordnung von Tumoroxygenierung und p53-Status ist in vivo nicht mit hoher Auflösung möglich. Der angegebene pO_2 -Wert mittelt als Median über den Tumor und lässt keine zelluläre Zuordnung hinsichtlich des p53-Status zu.

Intratumorale Inhomogenität der pO_2 -Werte bewirkt eine inhomogene Selektion von Tumorzellen. Es resultierten vermutlich Tumoren mit sehr unterschiedlichen Zellverteilungen hinsichtlich des p53-Mutationsstatus.

Dies kann die Erklärung dafür sein, dass wir in unserer Studie beim Mammakarzinom keinen Zusammenhang zwischen der Akkumulation des Tumorsuppressorgens p53 und der Tumoroxygenierung belegen konnten.

Die experimentellen und theoretischen Erkenntnisse mehrerer Autoren [34, 48, 57, 68, 85, 166], wonach Gewebhypoxie über Instabilität und Heterogenität des Genoms zu einem Selektionsvorteil p53-defekter Zellen führte, ließen sich durch unsere Ergebnisse nicht bestätigen.

Hypoxie ist eine häufige Folge struktureller und funktioneller Störungen in Tumoren und stellt einen wesentlichen Selektionsdruck für maligne Zellen dar. Yu et al. 2002 [166] konnten in vitro zeigen, dass Zellverbände mit Wildtyp-p53 auf Hypoxie mit Apoptose reagierten, während ihre p53-mutierten Korrelate im gleichen Ansatz größtenteils überlebten. Diesen Zusammenhang konnten Amellem et al. 1997 [4] nur für moderate Hypoxie bestätigen.

Hohenberger et al. 1998 [70] fanden dagegen an 36 Patientinnen mit Mammakarzinom einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Tumoroxygenierung und der Expression von p53. Tumoren mit einer p53-Akkumulation zeigten entgegen den Erwartungen aus in-vitro-Studien signifikant höhere pO_2 -Werte. Die immunhistochemische Bestimmung von p53 erfolgte in dieser Studie mit dem Antikörper DO7 (Dako).

Unsere Ergebnisse stehen dennoch nicht notwendigerweise in Widerspruch mit experimentellen und klinischen Daten, die eine Beziehung von Hypoxie und p53-vermittelter Malignitätserhöhung von Tumorzellen zeigen.

Der vergleichbare Oxygenierungsstatus p53-positiver und -negativer Tumoren in unserer Studie kann durch eine hypoxievermittelte, aber p53-unabhängige Selektion von Tumorzellen mit einem maligneren Phänotyp im Mammakarzinom verursacht sein. Graeber et al. 1994 [57] und Kim et al. 1997 [85] fanden, dass Hypoxie zu einem G1-Phase Arrest führte mit der Folge einer p53-Stabilisierung und -Akkumulation, jedoch war die Aktivierung eines G1-Phase Kontrollpunktes bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck unabhängig vom p53-Status. p53 ist nicht alleine verantwortlich für die zelluläre Reaktion auf Hypoxie. Eines der am deutlichsten transaktivierten Gene als Antwort auf p53-Induktion ist der Zellzyklusinhibitor p21 [89].

Bei Patientinnen mit Kopf-/Hals-Karzinomen konnte in mehreren Studien keine Assoziation zwischen dem p53-Status und der Tumoroxygenierung festgestellt werden [9, 114].

In Untersuchungen von Amellem et al. 1997 [4] zeigte der p53-Status in den 3 untersuchten Zelllinien keinen Einfluss auf das Zellüberleben nach extremer Hypoxie (<4 mmHg), was durch eine fehlende Korrelation von p53 zur Apoptose-Aktivität belegt wurde.

Im Gegensatz dazu fanden Yu et al. 2002 [166] im Tierversuch mit kolorektalen Karzinomzelllinien an immunsupprimierten Mäusen in Arealen mit besserer Sauerstoffversorgung einen höheren Anteil p53-positiver Zellen, während in hypoxischen Arealen die Verteilung zu Gunsten der p53-negativen Zellen verschoben war. Dies bestätigt die These, dass p53-positive Zellen empfindlicher gegen hypoxieinduzierte Apoptose sind.

In hypoxischen Arealen p53-positiver Tumoren war die Apoptose größer, als in hypoxischen Arealen p53-negativer Tumoren. Die Ergebnisse von Yu et al. 2002 [166] basieren jedoch nicht auf pO₂-Messungen. Hypoxische Areale wurden hier durch Anfärbung von gefäßnahen Tumorbereichen definiert. Daneben wurde p53 mittels FACS-Analyse bestimmt und nicht wie in unserer Studie über immunhistologische Verfahren.

Für die Chemotherapie ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff von zentraler Bedeutung, denn Zytostatika schädigen vornehmlich schnell proliferierende Zellen.

In der Literatur werden mehrere Mechanismen der hypoxieinduzierten Chemotherapieresistenz diskutiert. Darunter ist die Inhibition der Zellproliferation [10], eine reduzierte Zytotoxizität der Chemotherapeutika bei Hypoxie [35, 145] und die Gewebeazidose [164].

Zudem können Stressproteine und der Verlust des Apoptosepotentials bei Hypoxie eine Resistenz gegen bestimmte Chemotherapeutika bewirken [5, 65].

Sauerstoffabhängigkeit wurde für einige Chemotherapeutika (z.B. Cyclophosphamid, Carboplatin und Doxorubicin) in vivo und in vitro beschrieben [144]. Diese Untersuchungen sind jedoch mehr von qualitativer Natur und geben keine klaren Schwellenwerte für sauerstoffabhängige Chemotherapeutika. Daher sind zusätzliche Untersuchungen notwendig, um quantitative Informationen zur hypoxieinduzierten

Chemotherapieresistenz zu erhalten. Diese Informationen sind allerdings in vivo sehr schwer zu erhalten.

Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf primäre Chemotherapie und dem gemessenen pO_2 . Ein $pO_2 \leq 2,5$ mmHg war kein unabhängiger prädiktiver Faktor für den Therapieerfolg einer primären Chemotherapie beim Mammakarzinom.

Rudat et al. 2000 [131] untersuchten Lymphknoten-Metastasen von 194 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Hals-Bereichs und fraktionierter Radiotherapie kombiniert mit adjuvanter Chemotherapie. Es ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen der Zahl der pO_2 -Werte $\leq 2,5$ mmHg und dem Überleben der Patienten, aber die histographisch gemessene Tumoroxygenierung war nicht geeignet zur Auswahl von Patienten für verschiedene Therapieoptionen.

In mehreren Studien konnten unabhängig von der Therapie eine Korrelation von Hypoxie und ansteigender Tumoraggressivität (kürzeres Überleben, verminderte lokale Kontrolle, erhöhte Rate an Fernmetastasen, ungünstigeres histologisches Grading) gezeigt werden [19, 67, 111, 114, 139, 151]. Nordmark et al. 2001 [111] fanden an 31 Weichgewebesarkomen mit pO_2 Werten zwischen 1 und 58 mmHg (Median 19 mmHg) mit einer medianen Nachuntersuchungszeit von 74 Monaten signifikant schlechteres Überleben hypoxischer Tumoren. Nordmark et al. 1996 [114] konnten bei 34 fortgeschrittenen Kopf-/Hals-Tumoren und Radiotherapie gefolgt von Nimorazol-Chemotherapie einen starken prognostischen Wert der Tumoroxygenierung für schlechteres Überleben belegen. Stadler et al. 1999 [139] führten eine Studie an 59 fortgeschrittenen Kopf-/Hals-Tumoren mit Radiotherapie und Mitomycin und 5-Fluorouracil-Chemotherapie durch und kamen zu dem Ergebnis, dass die Tumoroxygenierung assoziiert war mit schlechterem Überleben. Brizel et al. 1996 [19] untersuchten 63 Patienten mit Tx-T4-Kopf-/Hals-Tumoren, die Radiotherapie und im fortgeschrittenen Stadium Cisplatin und 5-Fluorouracil-Chemotherapie bekamen. Ein Median- $pO_2 > 10$ mmHg war assoziiert mit längerem Überleben und längerer lokaler Kontrolle. Höckel et al. 1996 [67] fanden, dass der Median- pO_2 der stärkste Indikator für das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben bei 89 Zervikalkarzinomen mit Radiotherapie und adjuvanter Chemotherapie war.

Vaupel et al. 1993 und 2000 [151] beschrieben die Rolle der Tumorphypoxie für das Ansprechen auf Chemotherapie. Sie fanden eine Chemotherapieresistenz bei niedrigem

pO₂ für sauerstoffabhängige Therapieformen, wie die Therapie mit Cyclophosphamid oder Carboplatin. Daneben konnten einige Autoren [51, 69, 164] den Einfluss schlechter Gewebeoxygenierung auf eine Reihe biologischer Parameter belegen, die das maligne Potential eines Tumors entscheidend beeinflussen könnten.

Sonographisch kontrollierte polarographische Messungen der Tumorphypoxie mit dem Eppendorf Histogrammen an einer größeren Zahl von Brusttumoren sind bisher nicht publiziert.

In der Literatur existiert zudem keine einheitliche Einteilung der Gewebeoxygenierungsgrade. Insbesondere in Bezug auf die biologischen Gewebefunktionen gibt es keinen begründbaren standardisierten Grenzwert.

Weiterhin können Messungen in nekrotischem Gewebe zur Überschätzung der biologisch relevanten Hypoxie führen, da es nicht möglich ist, zwischen hypoxischen vitalen Bereichen, die Selektionsdruck erzeugen, und nekrotischen Bereichen zu differenzieren.

Eine weitere Problematik besteht in der Gewinnung der Gewebeprobe. Es kann nicht immer davon ausgegangen werden, dass die entnommene Biopsie repräsentativ für das gesamte Malignom ist. Zudem ist es nicht möglich mit der Eppendorf-pO₂-Histogrammie zwischen diffusionsbedingter und perfusionsbedingter Hypoxie zu unterscheiden. Dies kann von Bedeutung sein, da eine selektionsbedingte Malignisierung vor allem bei chronischer, diffusionsbedingter Hypoxie auftritt.

Yu et al. 2002 [166] konnten eine große Inhomogenität der p53-Expression im Tierversuch mit kolorektalen Karzinomzelllinien an immunsupprimierten Mäusen nachweisen. Dabei hatten Areale mit besserer Sauerstoffversorgung einen höheren Anteil p53-positiver Zellen, während in hypoxischen Arealen die Verteilung zu Gunsten der p53-negativen Zellen verschoben war. Dagegen fanden mehrere Autoren klinisch eine Übereinstimmung des p53-Status von Primärtumoren mit dem ihrer Metastasen, was auf eine gewisse Homogenität der p53-Expression im gesamten Tumor schließen lässt [143].

Die kritische Wertung der immunologischen Verfahren zur p53-Bestimmung sowie der polarographischen Methoden der pO₂-Messung zusammenfassend, sind wir der Meinung, dass die in der Studie erlangten Ergebnisse nicht allein methodisch bedingt sind, sondern zu wesentlichen Teilen ein reales biologisches Phänomen widerspiegeln.

Es kann daher gefolgert werden, dass Hypoxie zu einer Selektion von Tumorzellen führt, die nicht alleine von p53 vermittelt wird, sondern auch von transaktivierten Genen des Zellzyklus wie p21 [57, 85, 89].

6. Zusammenfassung

Wir untersuchten in der vorliegenden Studie den Zusammenhang zwischen der Gewebeoxygenierung und dem p53-Status bei primären Mammakarzinomen.

Zudem untersuchten wir die Eignung von polarographisch bestimmten pO_2 -Werten und immunhistochemisch bestimmtem p53-Protein zur Vorhersage des Ansprechens auf primäre Chemotherapie beim Mammakarzinom, um die Hypothese, dass Zellen mit normalem p53 bei niedrigem pO_2 im Gewebe verstärkt der Apoptose unterliegen, während Zellen mit mutiertem p53 überleben, in vivo zu bestätigen.

Die mit unserer modifizierten Messmethode an einem im Vergleich zu bisher publizierten Arbeiten sehr großen und homogenen Patientenkollektiv erhaltenen pO_2 -Werte waren im Vergleich zu bisher veröffentlichten Werten sehr niedrig.

Wir fanden keinen Zusammenhang zwischen der Gewebeoxygenierung und dem p53-Status, wie wir es auf Grund theoretischer Überlegungen erwartet hatten.

Ebenso bestand keine signifikante Beziehung zwischen den vorliegenden pO_2 -Werten und dem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie. Auch für den p53-Status konnten wir keinen Zusammenhang zum Ansprechen auf primäre Chemotherapie belegen.

Es kann daher gefolgert werden, dass die Gewebeoxygenierung sowie der p53-Status nicht als prädiktive Marker für das Ansprechen von Mammakarzinomen auf neoadjuvante Chemotherapie verwendet werden können.

Das steigende Wissen über die Tumorbiologie zeigt, dass keine einzelne Variable die Reaktion auf Hypoxie und die Chemosensitivität reguliert. Daher ist es nötig, das biologischen Verhalten ganzer Zellen zu erforschen und nicht einzelner Gene oder Proteine.

Die meisten Studien zur Vorhersage des Ansprechens auf Chemotherapie sind mit Patientenzahlen unter 100 zwar sehr klein. Ein Marker, der nicht nur statistisch, sondern auch klinisch bedeutsam ist, sollte aber stark genug sein, um seinen Einfluss auch in kleineren Studien zu zeigen.

In Zukunft wird die Unterscheidung von mutiertem und Wild-Typ p53, sowie die genaue Lokalisationsbeschreibung der Mutation von Bedeutung sein, da diesen Eigenschaften größere biologische Konsequenzen beigemessen werden.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE: Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med.* 1996 Jul;2(7):811-4.
- [2] Alarcon R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ: Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer Res.* 1999 Dec 15;59(24):6046-51.
- [3] Alarcon RM, Denko NC, Giaccia AJ: Genetic determinants that influence hypoxia-induced apoptosis. *Novartis Found Symp.* 2001;240:115-28; discussion 128-32.
- [4] Amellem O, Stokke T, Sandvik JA, Smedshammer L, Pettersen EO: Hypoxia-induced apoptosis in human cells with normal p53 status and function, without any alteration in the nuclear protein level. *Exp Cell Res.* 1997 May 1;232(2):361-70.
- [5] Anthoney DA, McIlwrath AJ, Gallagher WM, Edlin AR, Brown R: Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res.* 1996 Mar 15;56(6):1374-81.
- [6] Arisio R, Sapino A, Cassoni P, Accinelli G, Cuccorese MC, Mano MP, Bussolati G: What modifies the relation between tumour size and lymph node metastases in T1 breast carcinomas? *J Clin Pathol.* 2000 Nov;53(11):846-50.
- [7] Aziz SA, Pervez S, Khan S, Kayani N, Rahbar MH: Relationship of p53 expression with clinicopathological variables and disease outcome: a prospective study on 315 consecutive breast carcinoma patients. *Malays J Pathol.* 2001 Dec;23(2):65-71.
- [8] Becker A, Hansgen G, Richter C, Dunst J: Oxygenation status of squamous cell carcinoma of the head and neck: comparison of primary tumors, their neck node metastases and normal tissue. *Strahlenther Onkol.* 1998 Sep;174(9):484-6.
- [9] Becker A, Stadler P, Krause U, Kuhnt T, Hansgen G, Dettmar P, Feldmann HJ, Rath FW, Molls M, Dunst J: No association between p53 overexpression and polarographically measured tumor oxygenation in patients with head and neck carcinomas. *Strahlenther Onkol.* 2000 Oct;176(10):475-80.
- [10] Bedford JS, Mitchell JB: The effect of hypoxia on the growth and radiation response of mammalian cells in culture. *Br J Radiol.* 1974 Oct;47(562):687-96.

- [11] Bergh J, Norberg T, Sjögren S, Lindgren A, Holmberg L: Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med.* 1995 Oct;1(10):1029-34.
- [12] Bergh J: Time for integration of predictive factors for selection of breast cancer patients who need postoperative radiation therapy? *J Natl Cancer Inst.* 1997 May 7;89(9):605-7.
- [13] Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, Zambetti M: Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol.* 1998 Jan;16(1):93-100.
- [14] Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L: Preoperative chemotherapy in operable breast cancer. *Lancet.* 1993 Jun 5;341(8858):1485.
- [15] Bonetti A, Zaninelli M, Leone R, Cetto GL, Pelosi G, Biolo S, Menghi A, Manfrin E, Bonetti F, Piubello Q: bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Oct;4(10):2331-6.
- [16] Borresen-Dale AL, Lothe RA, Meling GI, Hainaut P, Rognum TO, Skovlund E: TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival. *Clin Cancer Res.* 1998 Jan;4(1):203-10.
- [17] Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Brunelli A, Gorzegno G, DiMarco B, Aguggini S, Bolsi G, Cirillo F, Filippini L, Betri E, Bertoli G, Alquati P, Dogliotti L: p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul;6(7):2751-8.
- [18] Bristow RG, Benchimol S, Hill RP: The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol.* 1996 Sep;40(3):197-223.
- [19] Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW: Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 1996 Mar 1;56(5):941-3.
- [20] Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW: Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 May 1;38(2):285-9.

- [21] Brown DR, Deb D, Frum R, Hickes L, Munoz R, Deb S, Deb SP: The human oncoprotein MDM2 uses distinct strategies to inhibit transcriptional activation mediated by the wild-type p53 and its tumor-derived mutants. *Int J Oncol*. 2001 Mar;18(3):449-59.
- [22] Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(3):263-9.
- [23] Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Laurent-Puig P: p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol*. 2000 Apr;18(7):1465-73.
- [24] Castiglione F, Sarotto I, Fontana V, Destefanis M, Venturino A, Ferro S, Cardaropoli S, Orengo MA, Porcile G: Bcl2, p53 and clinical outcome in a series of 138 operable breast cancer patients. *Anticancer Res*. 1999 Sep-Oct;19(5C):4555-63.
- [25] Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB, Schumacker PT: Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene*. 2000 Aug 10;19(34):3840-8.
- [26] Chevillard S, Lebeau J, Pouillart P, de Toma C, Beldjord C, Asselain B, Klijanienko J, Fourquet A, Magdelenat H, Vielh P: Biological and clinical significance of concurrent p53 gene alterations, MDR1 gene expression, and S-phase fraction analyses in breast cancer patients treated with primary chemotherapy or radiotherapy. *Clin Cancer Res*. 1997 Dec;3(12 Pt 1):2471-8.
- [27] Chiou SK, Rao L, White E: Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1994 Apr;14(4):2556-63.
- [28] Ciesielski D, Dziewulska-Bokiniec A, Zoltowska A, Roszkiewicz A, Kopacz A, Wojtacki J: p53 expression in breast cancer related to prognostic factors. *Neoplasma*. 1995;42(5):235-7.
- [29] Colleoni M, Orvieto E, Nole F, Orlando L, Minchella I, Viale G, Peruzzotti G, Robertson C, Noberasco C, Galimberti V, Sacchini V, Veronesi P, Zurrada S, Orecchia R, Goldhirsch A: Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer*. 1999 Apr;35(4):574-9.
- [30] Daidone MG, Veneroni S, Benini E, Tomasic G, Coradini D, Mastore M, Brambilla C, Ferrari L, Silvestrini R: Biological markers as indicators of

- response to primary and adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int J Cancer*. 1999 Dec 22;84(6):580-6.
- [31] Davis AR: Breast cancer: the search for new prognostic markers. *Br J Biomed Sci*. 1996 Jun;53(2):157-61.
- [32] Denko NC, Green SL, Edwards D, Giaccia AJ: p53 checkpoint-defective cells are sensitive to X rays, but not hypoxia. *Exp Cell Res*. 2000 Jul 10;258(1):82-91.
- [33] Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM: DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*. 1994 Nov 1;8(21):2540-51.
- [34] Domagala W, Welcker M, Chosia M, Karbowniczek M, Harezga B, Bartkova J, Bartek J, Osborn M: p21/WAF1/Cip1 expression in invasive ductal breast carcinoma: relationship to p53, proliferation rate, and survival at 5 years. *Virchows Arch*. 2001 Aug;439(2):132-40.
- [35] Durand RE: The influence of microenvironmental factors during cancer therapy. *In Vivo*. 1994 Nov-Dec;8(5):691-702.
- [36] Eiermann W., Baumeister R., de Waal C.J., Füger Th., Gabka C., Raab G.: Interdisziplinäres Vorgehen in der Primärtherapie des Mammakarzinoms. In: „Mammakarzinom Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge“. Zuckschwerdt, München Bern Wien New York (2001).
- [37] Eiermann W, Sabadell D, Baselga J, Vazquez C, Guillem V, Semiglazov VP, Garcia-Conde J, Zambetti M, Bonadonna G, Gianni L for the ECTO Study Group: No increased risk of local breast tumor recurrence as first and only event after primary systemic therapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; abstract 37.
- [38] Eissa S, Labib R, Khalifa A, Swelam N, Khalil F, El-Shenawy AM: Regulators of apoptosis in human breast cancer. *Clin Biochem*. 1999 Jul;32(5):321-6.
- [39] Elledge RM, Allred DC: Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):79-98.
- [40] Ellis P, Smith I, Ashley S, Walsh G, Ebbs S, Baum M, Sacks N, McKinna J: Clinical prognostic and predictive factors for primary chemotherapy in operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998 Jan;16(1):107-14.
- [41] Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.

- [42] Feldmann HJ, Molls M, Vaupel P: Blood flow and oxygenation status of human tumors. *Clinical investigations. Strahlenther Onkol.* 1999 Jan;175(1):1-9.
- [43] Ferno M: Prognostic factors in breast cancer: a brief review. *Anticancer Res.* 1998 May-Jun;18(3C):2167-71.
- [44] Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD: Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Aug;16(8):2672-85.
- [45] Fisher B, Costantino J: Highlights of the NSABP Breast Cancer Prevention Trial. *Cancer Control.* 1997 Jan;4(1):78-86.
- [46] Fresno M, Molina R, Perez del Rio MJ, Alvarez S, Diaz-Iglesias JM, Garcia I, Herrero A: p53 expression is of independent predictive value in lymph node-negative breast carcinoma. *Eur J Cancer.* 1997 Jul;33(8):1268-74.
- [47] Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh MC, Pintilie M, Sun A, Chapman W, Levin W, Manchul L, Keane TJ, Hill RP: Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol.* 1998 Aug;48(2):149-56.
- [48] Gammack D, Byrne HM, Lewis CE: Estimating the selective advantage of mutant p53 tumour cells to repeated rounds of hypoxia. *Bull Math Biol.* 2001 Jan;63(1):135-66.
- [49] Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ: Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1988 May;14(5):831-8.
- [50] Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL: Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2505-12.
- [51] Giaccia AJ, Brown JM, Wouters B, Denko N, Koumenis C: Cancer therapy and tumor physiology. *Science.* 1998 Jan 2;279(5347):12-3.
- [52] Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta VG, Semiglazov V, Garcia-Conde J, Zambetti M, Valagussa P, Bondonna G: First report of the European cooperative

- trial in operable breast cancer: effect of primary systemic therapy on local regional disease. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: abstract 132.
- [53] Giatromanolaki A, Harris AL: Tumour hypoxia, hypoxia signaling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer. *Anticancer Res.* 2001 Nov-Dec;21(6B):4317-24.
- [54] Gold EB, Bromberger J, Crawford S, Samuels S, Greendale GA, Harlow SD, Skurnick J: Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *Am J Epidemiol.* 2001 May 1;153(9):865-74.
- [55] Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ: Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Sep 1;21(17):3357-65. Epub 2003 Jul 07.
- [56] Gorgoulis V, Zoumpourlis V, Rassidakis G, Karameris A, Barbatis C, Spandidos DA, Kittas C. Molecular analysis of p53 gene in laryngeal premalignant and malignant lesions. p53 protein immunohistochemical expression is positively related to proliferating cell nuclear antigen labelling index. *Virchows Arch.* 1995;426(4):339-44.
- [57] Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ Jr, Giaccia AJ: Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol.* 1994 Sep;14(9):6264-77.
- [58] Green M, Hortobagyi GN: Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. *Oncology (Huntingt).* 2002 Jul;16(7):871-84, 889; discussion 889-90, 892-4, 897-8.
- [59] Gulberg P, Nedergaard T, Nielsen HJ, Olsen AC, Ahrenkiel V, Zeuthen J: Single-step DGGE-based mutation scanning of the p53 gene: application to genetic diagnosis of colorectal cancer. *Hum Mutat.* 1997;9(4):348-55.
- [60] Gursan N, Karakok M, Sari I, Gursan MS: The relationship between expression of p53/Bcl-2 and histopathological criteria in breast invasive ductal carcinomas. *Int J Clin Pract.* 2001 Nov;55(9):589-90.
- [61] Hamilton A, Larsimont D, Paridaens R, Drijkoningen M, van de Vijver M, Bruning P, Hanby A, Houston S, Treilleux I, Guastalla JP, Van Vreckem A, Sylvester R, Piccart M: A study of the value of p53, HER2, and Bcl-2 in the prediction of response to doxorubicin and paclitaxel as single agents in

- metastatic breast cancer: a companion study to EORTC 10923. *Clin Breast Cancer*. 2000 Oct;1(3):233-40; discussion 241-2.
- [62] Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Lebeau A, Permanetter W, Untch M: Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. In: „Mammakarzinom Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge“. Zuckschwerdt, München Bern Wien New York (2000)
- [63] Hayward JL, Carbone PP, Heusen JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD: Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1977 Mar;35(3):292-8.
- [64] Heyweg-Köhbrunner, Deutsche Röntgengesellschaft, Ausschuss für Mammadiagnostik in AWMF online, Stand September 2003
- [65] Hickman JA: Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*. 1992 Sep;11(2):121-39.
- [66] Höckel M, Knoop C, Schlenger K, Vorndran B, Bausmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P: Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol*. 1993 Jan;26(1):45-50.
- [67] Höckel M, Schlenger K, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P: Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors. *Semin Radiat Oncol*. 1996 Jan;6(1):3-9.
- [68] Höckel M, Vaupel P: Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol*. 2001 Apr;28(2 Suppl 8):36-41.
- [69] Höckel M, Vaupel P: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Feb 21;93(4):266-76
- [70] Hohenberger P, Felgner C, Haensch W, Schlag PM: Tumor oxygenation correlates with molecular growth determinants in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998 Mar;48(2):97-106.
- [71] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49-53.
- [72] Horne GM, Anderson JJ, Tiniakos DG, McIntosh GG, Thomas MD, Angus B, Henry JA, Lennard TW, Horne CH: p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma: a comparison of four antibodies for immunohistochemistry. *Br J Cancer*. 1996 Jan;73(1):29-35.
- [73] Ikeda T, Jinno H, Matsu A, Masamura S, Kitajima M: The role of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer treatment. *Breast Cancer*. 2002; 9(1):8-14.

- [74] Ioakim-Liossi A, Karakitsos P, Markopoulos C, Aroni K, Athanassiadou P, Delivelioti K, Athanassiades P, Vaiopoulos G: p53 protein expression and oestrogen and progesteron receptor status in invasive ductal breast carcinomas. *Cytopathology*. 2001 Jun; 12(3):197-202.
- [75] Ioakim-Liossi A, Markopoulos C, Karakitsos P, Safioleas M, Gogas J, Vaiopoulos G: p53 protein expression in benign and malignant breast lesions. *Acta Cytol*. 1998 Jul-Aug;42(4):918-22.
- [76] Irwin MS, Kaelin WG Jr: Role of the newer p53 family proteins in malignancy. *Apoptosis*. 2001 Feb-Apr;6(1-2):17-29.
- [77] Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP: Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 1992 Jul 15;84(14):1109-14.
- [78] Jerry DJ, Kittrell FS, Kuperwasser C, Laucirica R, Dickinson ES, Bonilla PJ, Butel JS, Medina D: A mammary-specific model demonstrates the role of the p53 tumor suppressor gene in tumor development. *Oncogene*. 2000 Feb 21;19(8):1052-8.
- [79] Johnson KR, Fan W: Reduced expression of p53 and p21WAF1/CIP1 sensitizes human breast cancer cells to paclitaxel and its combination with 5-fluorouracil. *Anticancer Res*. 2002 Nov-Dec;22(6A):3197-204
- [80] Johnson P, Chung S, Benchimol S: Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein is accompanied by hemoglobin production and is sensitive to erythropoietin. *Mol Cell Biol*. 1993 Mar;13(3):1456-63.
- [81] Kallinowski F, Zander R, Hoeckel M, Vaupel P: Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO₂-histography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1990 Oct;19(4):953-61.
- [82] Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlbock M, Gnant M, Steger G, Jakesz R: TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000 Jan;6(1):50-6.
- [83] Kato T, Kameoka S, Kimura T, Tanaka S, Nishikawa T, Kobayashi M: p53, mitosis, apoptosis and necrosis as prognostic indicators of long-term survival in breast cancer. *Anticancer Res*. 2002 Mar-Apr;22(2B):1105-12.

- [84] Kaufmann M., v.Minckwitz G, Smith R, Valer V, Gianni L, Eiermann W, Howell A, Costa SD, Beuzeboc P, Untch M, Blohmer JU, Sinn HP, Sittek R, Souchon R, Tulusan AH, Volm T, Senn HJ: International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2600-2608.
- [85] Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, Graeber TG, Lee JE, Giffard RG, DiPaolo JA, Peehl DM, Giaccia AJ: Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res.* 1997 Oct 1;57(19):4200-4.
- [86] King TC, Estalilla OC, Safran H: Role of p53 and p16 gene alterations in determining response to concurrent paclitaxel and radiation in solid tumor. *Semin Radiat Oncol.* 1999 Apr;9(2 Suppl 1):4-11.
- [87] Klorin G, Keren R: Prognostic evaluation of breast cancer in cytologic specimens. *Anal Quant Cytol Histol.* 2002 Feb;24(1):49-53.
- [88] Knowles MA: What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *Mol Pathol.* 2001 Aug;54(4):215-21.
- [89] Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe SW, Kastan M, Giaccia A: Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(4):1297-310.
- [90] Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997 May 15;387(6630):299-303.
- [91] Laframboise S, Chapman W, McLaughlin J, Andrulis IL: p53 mutations in epithelial ovarian cancers: possible role in predicting chemoresistance. *Cancer J.* 2000 Sep-Oct;6(5):302-8.
- [92] Lane DP, Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 1979 Mar 15;278(5701):261-3.
- [93] Levesque MA, Katsaros D, Yu H, Gai M, Genta F, Roagna R, Ponzzone R, Massobrio M, Sismondi P, Diamandis EP: Immunofluorometrically determined p53 accumulation as a prognostic indicator in Italian breast cancer patients. *Int J Cancer.* 1998 Apr 17;79(2):147-52.
- [94] Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y: Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene.* 1994 Aug;9(8):2261-8.

- [95] Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T: p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*. 1994 Nov 4;266(5186):807-10.
- [96] Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Osborne CK, Trott PA, Fernando IN, Ashley SE, Ormerod MG, Titley JC, Gregory RK, Allred DC: Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 1997 Apr;3(4):593-600.
- [97] Mathieu MC, Koscielny S, Le Bihan ML, Spielmann M, Arriagada R: p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer. Institut Gustave-Roussy Breast Cancer Group. *Lancet*. 1995 May 6;345(8958):1182.
- [98] Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A: Reporting results of cancer treatment. *Cancer*. 1981 Jan 1;47(1):207-14.
- [99] Milner J, Cook A, Sheldon M: A new anti-p53 monoclonal antibody, previously reported to be directed against the large T antigen of simian virus 40. *Oncogene*. 1987;1(4):453-5.
- [100] Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE: 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*. 2002 Jan;235(1):10-26.
- [101] Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994 Jun;9(6):1799-805.
- [102] Montero S, Guzman C, Vargas C, Ballestin C, Cortes-Funes H, Colomer R: Prognostic value of cytosolic p53 protein in breast cancer. *Tumour Biol*. 2001 Sep-Oct;22(5):337-44.
- [103] Moonen L, Ong F, Gallee M, Verheij M, Horenblas S, Hart AA, Bartelink H: Apoptosis, proliferation and p53, cyclin D1, and retinoblastoma gene expression in relation to radiation response in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Apr 1;49(5):1305-10.
- [104] Morgan SE, Kastan MB: p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res*. 1997;71:1-25.
- [105] Mori I, Yang Q, Kakudo K: Predictive and prognostic markers for invasive breast cancer. *Pathol Int*. 2002 Mar;52(3):186-94.

- [106] Mueller H, Eppenberger U: The dual role of mutant p53 protein in chemosensitivity of human cancers. *Anticancer Res.* 1996 Nov-Dec;16(6B):3845-8
- [107] Munshi A, Byrne P, Ramesh R, Freeman SM, Marrogi AJ: p53 molecule as a prognostic marker in human malignancies. *J La State Med Soc.* 1998 Apr;150(4):175-8.
- [108] Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Matsuoka Y, Yamashita H, Fukuda M: An evaluation of predictive factors involved in clinical or pathological response to primary chemotherapy in advanced breast cancer. *Breast Cancer.* 2002;9(2):145-52.
- [109] Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, Hietanen P, Wasenius VM: Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(7):917-22.
- [110] Norberg T, Jansson T, Sjögren S, Martensson C, Andreasson I, Fjallskog ML, Lindman H, Nordgren H, Lindgren A, Holmberg L, Bergh J: Overview on human breast cancer with focus on prognostic and predictive factors with special attention on the tumour suppressor gene p53. *Acta Oncol.* 1996;35 Suppl 5:96-102.
- [111] Nordmark M, Alsner J, Keller J, Nielsen OS, Jensen OM, Horsman MR, Overgaard J: Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. *Br J Cancer.* 2001 Apr 20;84(8):1070-5.
- [112] Nordmark M, Grau C, Horsman MR, Jorgensen HS, Overgaard J: Relationship between tumour oxygenation, bioenergetic status and radiobiological hypoxia in an experimental model. *Acta Oncol.* 1995;34(3):329-34.
- [113] Nordmark M, Keller J, Nielsen OS, Lundorf E, Overgaard J: Tumour oxygenation assessed by polarographic needle electrodes and bioenergetic status measured by ³¹P magnetic resonance spectroscopy in human soft tissue tumours. *Acta Oncol.* 1997;36(6):565-71.
- [114] Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J: Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol.* 1996 Oct;41(1):31-9.
- [115] Nordmark M: Direct measurements of tumor-tissue pO₂. A way of selecting patients for hyperoxic treatment. *Strahlenther Onkol.* 1996 Nov;172 Suppl 2:8-9.

- [116] O'Hanlon DM, Kiely M, MacConmara M, Al-Azzawi R, Connolly Y, Jeffers M, Keane FB: An immunohistochemical study of p21 and p53 expression in primary node- positive breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2002 Mar;28(2):103-7.
- [117] Ojugo AS, McSheehy PM, Stubbs M, Alder G, Bashford CL, Maxwell RJ, Leach MO, Judson IR, Griffiths JR: Influence of pH on the uptake of 5-fluorouracil into isolated tumour cells. *Br J Cancer*. 1998 Mar;77(6):873-9.
- [118] Oren M: Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 1999 Dec 17;274(51):36031-4.
- [119] Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E: Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*. 1995 Jun;15(6):3032-40.
- [120] Peller S: Clinical implications of p53: effect on prognosis, tumor progression and chemotherapy response. *Semin Cancer Biol*. 1998;8(5):379-87.
- [121] Pezeshki AM, Farjadian S, Talei A, Vasei M, Gharesi-Fard B, Doroudchi M, Ghaderi A: p53 gene alteration and protein expression in Iranian women with infiltrative ductal breast carcinoma. *Cancer Lett*. 2001 Aug 10;169(1):69-75.
- [122] Pierga JY, Mouret E, Dieras V, Laurence V, Beuzeboc P, Dorval T, Palangie T, Jouve M, Vincent-Salomon A, Scholl S, Extra JM, Asselain B, Pouillart: Prognostic value of persistent node involvement after neoadjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Br J Cancer*. 2000 Dec;83(11):1480-7.
- [123] Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. *Nature*. 1997 Sep 18;389(6648):300-5.
- [124] Raab GH, Auer F, Scheich D, Molls M, Eiermann W: Pretreatment intratumoral oxygenation tension (pO₂) is not predictive for response to primary systemic chemotherapy in operable T2 breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21: Abstract 1806.
- [125] Raab G, Eiermann W.: Trastuzumab, a new treatment approach in breast carcinoma. *Internist (Berl)*. 2001 Jun; 42(6): 835-40, 842.
- [126] Reiher FK, Ivanovich M, Huang H, Smith ND, Bouck NP, Campbell SC: The role of hypoxia and p53 in the regulation of angiogenesis in bladder cancer. *J Urol*. 2001 Jun;165(6 Pt 1):2075-81.

- [127] Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J: Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002 Feb 1;62(3):632-5.
- [128] Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ: The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* 2003; 8(4): 307-25.
- [129] Royds JA, Dower SK, Qwarnstrom EE, Lewis CE: Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *Mol Pathol.* 1998 Apr;51(2):55-61.
- [130] Rudat V, Stadler P, Becker A, Vanselow B, Dietz A, Wannemacher M, Molls M, Dunst J, Feldmann HJ: Predictive value of the tumor oxygenation by means of pO₂ histography in patients with advanced head and neck cancer. *Strahlenther Onkol.* 2001 Sep;177(9):462-8.
- [131] Rudat V, Vanselow B, Wollensack P, Bettscheider C, Osman-Ahmet S, Eble MJ, Dietz A: Repeatability and prognostic impact of the pretreatment pO₂ histography in patients with advanced head and neck cancer. *Radiother Oncol.* 2000 Oct;57(1):31-7.
- [132] Runkel S, Wischnik A, Teubner J, Kaven E, Gaa J, Melchert F: Oxygenation of mammary tumors as evaluated by ultrasound-guided computerized-pO₂-histography. *Adv Exp Med Biol.* 1994;345:451-8.
- [133] Sato T, Okazaki A, Okazaki M, Takahashi S, Hirata K: Detection of p53 gene mutations in aspiration biopsy specimens from suspected breast cancers by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res.* 1995 Feb;86(2):140-5.
- [134] Sirvent JJ, Fortuno-Mar A, Olona M, Orti A: Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histol Histopathol.* 2001 Jan;16(1):99-106.
- [135] Sjögren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L, Bergh J: The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Feb 21;88(3-4):173-82.
- [136] Sjöström J, Blomqvist C, Heikkilä P, Boguslawski KV, Raisanen-Sokolowski A, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmstrom P, Ostenstadt B, Bergh J, Wist E, Valvere V, Saksela E: Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for

- chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):3103-10.
- [137] Sjöström J: Predictive factors for response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Acta Oncol.* 2002;41(4):334-45.
- [138] Sobin LH, Wittekind C: *UICC TNM Classification of malignant tumors.* Wiley-Liss, New York 1997.
- [139] Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Hansgen G, Dunst J, Wurschmidt F, Molls M: Influence of the hypoxic subvolume on the survival of patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Jul 1;44(4):749-54.
- [140] Stal O, Stenmark Askmalm M, Wingren S, Rutqvist LE, Skoog L, Ferraud L, Sullivan S, Carstensen J, Nordenskjöld B: p53 expression and the result of adjuvant therapy of breast cancer. *Acta Oncol.* 1995;34(6):767-70.
- [141] Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1445-9.
- [142] Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M: Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene.* 1995 Jan 5;10(1):109-15.
- [143] Tannapfel A, Nusslein S, Katalinic A, Kockerling F, Wittekind C, Fietkau R: Proliferation and apoptosis before and after preoperative simultaneous radiochemotherapy of rectal carcinomas. *Strahlenther Onkol.* 1998 Jun;174(6):295-9.
- [144] Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC: Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* 1981 Jan;41(1):73-81.
- [145] Teicher BA: Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 1994 Jun;13(2):139-68.
- [146] Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH: Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1992 Jun 3;84(11):845-55.
- [147] von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, Löhner A, Gerber B, Heinrich G, Eidtmann H, Costa SD, Hilfrich J, Jakisch C, Zuna I, Kaufmann M: In-vivo-chemosensitivity adapted preoperative chemotherapy in patients with primary breast cancer. The pilot GEPARTRIO – study. *J Clin Oncol* 2003; in press.

- [148] van den Berg FM, Tigges AJ, Schipper ME, den Hartog-Jager FC, Kroes WG, alboomers JM: Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *J athol.* 1989 Mar;157(3):193-9.
- [149] Vasey PA, Jones NA, Jenkins S, Dive C, Brown R: Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. *Mol Pharmacol.* 1996 Dec;50(6):1536-40.
- [150] Vaupel P et al.: *Strahlenther Onkol* 1996, 174 Suppl4:6-12.
- [151] Vaupel P, Höckel M: Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *Int J Oncol.* 2000 Nov;17(5):869-79
- [152] Vaupel P, Kelleher DK, Höckel M: Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol.* 2001 Apr;28(2 Suppl 8):29-35.
- [153] Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M: Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 1991 Jun 15;51(12):3316-22.
- [154] Vaupel P: Oxygenation of human tumors. *Strahlenther Onkol.* 1990 Jun;166(6):377-86.
- [155] Vaupel P: The influence of tumor blood flow and microenvironmental factors on the efficacy of radiation, drugs and localized hyperthermia. *Klin. Pädiatr.* 1997; 209:243-9.
- [156] von Minckwitz G, Brunnert K, Costa SD, Friedrichs K, Jakisch C, Gerber B, Harbeck N, Junkermann H, Möbus V, Nitz U, Schaller G, Thomssen C, Untch M für die Organkommission der AGO: Primärbehandlung von Mammakarzinomen. *Frauenarzt* 2002; 43: 920-931.
- [157] von Minckwitz G, Costa SD, Eiermann W, Blohmer JU, Tulusan AH, Jackisch C, Kaufmann M: Maximized reduction of primary breast tumor size using preoperative chemotherapy with doxorubicin and docetaxel. *J Clin Oncol.* 1999 Jul;17(7):1999-2005.
- [158] von Minckwitz G, Costa SD, Raab G, Blohmer JU, Eidtmann H, Hilfrich J, Merkle E, Jackisch C, Gademann G, Tulusan AH, Eiermann W, Graf E, Kaufmann M: Dose-dense doxorubicin, docetaxel, and granulocyte colony-stimulating factor support with or without tamoxifen as preoperative therapy in

- patients with operable carcinoma of the breast: a randomized, controlled, open phase IIb study. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 1;19(15):3506-15.
- [159] von Minckwitz G, Costa SD, Raab GH: Dose-dense doxorubicin, docetaxel, and granulocyte colony-stimulating factor support with or without tamoxifen as preoperative therapy in patients with operable carcinoma of the breast: a randomized, controlled, open phase IIb study. *J Clin Oncol* 2001; 19:3506-3515.
- [160] von Minckwitz G, Costa SD: Docetaxel (taxotere) for therapy of breast carcinoma. Highest effectiveness with moderate side effects. *Med Klin*. 1997 Sep 15;92 Suppl 4:4-9.
- [161] von Minckwitz G, Raab G, Schutte M, Hilfrich J, Blohmer JU, Gerber B, Costa SD, Merkle E, Eidtmann H, Lampe D, Jackisch C, du Bois A, Tulusan AH, Gademann G, Sinn HP, Caputo A, Graf E, Kaufmann M: Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer with a dose-dense combination of doxorubicin and docetaxel (ADoc) - Experience of the GEPARDO-GABG study group. *Zentralbl Gynakol*. 2001 Sep;123(9):497-504.
- [162] von Minckwitz G, Raab G, Schütte M, Hilfrich J, Blohmer JU, Gerber B, Costa SD, Merkle E, Eidtmann H, Lampe W, Jakisch C, duBois A, Caputo A, Kaufmann M: Phase III trial of dose-dense doxorubicin plus docetaxel versus doxorubicin plus cyclophosphamide with sequential docetaxel in operable breast cancer: final results of the GEPARDUO study. *J Natl Cancer Inst* 2003; in press.
- [163] Weller M: Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res*. 1998 Jun;292(3):435-45.
- [164] Wike-Hooley JL, Haveman J, Reinhold HS: The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiother Oncol*. 1984 Dec;2(4):343-66.
- [165] Yonish-Rouach E, Choisy C, Deguin V, Breugnot C, May E: The role of p53 as a transcription factor in the induction of apoptosis. *Behring Inst Mitt*. 1996 Oct;(97):60-71.
- [166] Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ, Kerbel RS: Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science*. 2002 Feb 22;295(5559):1526-8.
- [167] Zhang WW, Labrecque S, Azoulay E, Dudley R, Matlashewski G: Development of a p53 responsive GFP reporter; identification of live cells with p53 activity. *J Biotechnol*. 2001 Nov 17;84(1):79-86.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Studienschema GEPAR-DUO
Abbildung 2:	Studienschema ECTO
Abbildung 3:	Studienschema GENARI
Abbildung 4:	Ansprechen auf primäre Chemotherapie
Abbildung 5:	Verteilung der pO ₂ -Werte
Abbildung 6:	Verteilung des Oxygenierungsstatus
Abbildung 7:	Oxygenierung und Nodalstatus
Abbildung 8:	Tumoroxygenierung und Grading
Abbildung 9:	Tumoroxygenierung und Ansprechen auf primäre Chemotherapie
Abbildung 10:	Nachweis der Akkumulation des Phosphoproteins p53
Abbildung 11:	p53 und Ansprechen auf primäre Chemotherapie
Abbildung 12:	Tumoroxygenierung und p53-Akkumulation
Abbildung 13:	Nachweis der Akkumulation des Phosphoproteins p53 im pO ₂ -Kollektiv
Abbildung 14:	Verteilung des Oxygenierungsstatus im pO ₂ -Kollektiv

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verteilung der Tumoren nach histopathologischen Kriterien
Tabelle 2:	pO ₂ -Werte und klassische Prognosefaktoren
Tabelle 3:	p53-Status und klassische Prognosefaktoren
Tabelle 4:	Ansprechen auf primäre Chemotherapie und p53-Status
Tabelle 5:	p53-Akkumulation und Oxygenierungsstatus

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Weissenbacher, Leitender Oberarzt der Frauenklinik im Klinikum Großhadern der Universität München, für die Betreuung bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Eiermann, Ärztlicher Direktor der Frauenklinik vom Roten Kreuz in München, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Günter Raab, Leitender Oberarzt der Frauenklinik vom Roten Kreuz, für die freundliche Zusammenarbeit und hilfsbereite Unterstützung und die gute Zusammenarbeit während der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Harzer, Direktor der Poliklinik für Kieferorthopädie der TU Dresden, danke ich sehr für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens und seine Unterstützung.

Herrn Dr. med. F. Auer, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Klinikums Rechts der Isar, danke ich für die Überlassung der pO₂-Daten und die kollegialen Ratschläge.

Herrn Dr. Högel, Pathologisches Institut der Rotkreuz Krankenanstalten in München, gebührt mein Dank für die Durchführung der p53-Bestimmung.

Frau R. Busch, Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum Rechts der Isar der TU München, danke ich sehr für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Den Assistentinnen und Assistenten der I. Gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung der Frauenklinik vom Roten Kreuz, danke ich für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Suche und Zusammenstellung der Patientendaten.

11.Lebenslauf

geboren am 8.11.1967 in Murnau als Sohn von Eleonore und Franz Wolf

1974-1987 Grundschule, Gymnasium, Abitur

1987-1988 Wehrpflicht

1988-1989 Studium der Humanmedizin an der LMU München

1989-1994 Studium der Geoökologie an der Universität Bayreuth, Diplom 1994

1994-2000 Studium der Zahnmedizin an der LMU München und TU Dresden

2000 Abschluss des Zahnmedizinstudiums mit Staatsexamen

seit 2001 Weiterbildungsassistent für Kieferorthopädie an der Poliklinik für
Kieferorthopädie der TU Dresden