

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

Prognostische Relevanz disseminierter Tumorzellen im Knochenmark
sowie tumorbiologischer Faktoren bei 265 Patientinnen mit
Mammakarzinom

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
An der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Theresa Marie Kampik
Aus München
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Sommer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Stausberg
Prof. Dr. Ralf Issels

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. C. Schindlbeck
Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Mammakarzinom	5
1.2	Definition und Bedeutung eines Prognosefaktors	6
1.3	Klassische Risiko- und Prognosefaktoren des Mamma-Karzinoms	8
1.3.1	Patientencharakteristika.....	8
1.3.2	TNM-Klassifikation	8
1.3.3	Bestimmung des histologischen Malignitätsgrades.....	11
1.3.4	Hormonrezeptorstatus	11
1.4	Neue Prognosefaktoren	13
1.4.1	Bedeutung neuer Prognosefaktoren	13
1.4.2	Disseminierte Zellen im Knochenmark.....	13
1.4.3	Tumorsuppressorprotein p53.....	15
1.4.4	Proliferationsmarker Ki-67	17
1.4.5	Topoisomerase II α	19
1.4.6	Human Epithelial Growth Factor Receptor 2 (HER2 oder cerbB2).....	21
1.5	Fragestellung der Arbeit.....	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Patientengut.....	25
2.2	Knochenmarksaspiration und immunzytochemische Untersuchung des Knochenmarks.....	26
2.3	Tumorgewebe-Proben	27
2.3.1	Tissue Micro Arrays	27
2.3.2	Vorbehandlung der Gewebeproben zur immunhistochemischen Färbung.....	29
2.3.3	Immunhistochemischer Nachweis einer HER2-Überexpression .	30
2.3.4	Immunhistochemischer Nachweis einer Topoisomerase II α - Überexpression	33
2.3.5	Immunhistochemischer Nachweis einer Ki-67-Überexpression ..	35
2.3.6	Immunhistochemischer Nachweis von p53.....	36

2.3.7	Nachweis einer HER2- und Topoisomerase II α -Amplifikation durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH).....	37
2.4	Statistische Methoden.....	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Patientencharakteristika und histologische Parameter.....	44
3.2	Immunzytochemische Analyse des Knochenmarkes	46
3.3	HER2 - Immunhistochemie und FISH	46
3.4	Topoisomerase II α - Immunhistochemie und FISH.....	48
3.5	Ki67 – Immunhistochemie.....	49
3.6	P53 – Immunhistochemie.....	50
3.7	Prognosefaktoren und krankheitsfreies Überleben	51
3.8	Prognosefaktoren und metastasenfreie Überlebenszeit.....	53
3.9	Prognosefaktoren und Gesamtüberleben	54
4	Diskussion	57
4.1	Methodenkritik.....	57
4.2	Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark	60
4.3	Bedeutung von p53.....	61
4.4	Bedeutung von Ki-67.....	63
4.5	Bedeutung der Topoisomerase.....	65
4.6	Bedeutung von HER2	66
4.7	Schlussfolgerungen.....	68
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	72
7	Danksagung	84
8	Lebenslauf	85

1 Einleitung

1.1 *Das Mammakarzinom*

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Neubildung bei Frauen in Deutschland und weltweit (23;98). Im Jahr 2000 erkrankten nach Schätzungen der WHO über eine Million Frauen auf der ganzen Welt an Brustkrebs, 370 000 verstarben daran (45). Für Europa ging man im selben Jahr von 350 000 Neuerkrankungen und 130 000 Sterbefällen aus (112). Knapp 50 000 Frauen erkrankten jährlich in Deutschland neu an einem Mammakarzinom. Im Jahr 2003 verstarben laut Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes 17.173 Frauen in Deutschland an Brustkrebs (45). Das mittlere Lebenszeitrisko von Frauen an Brustkrebs zu erkranken beträgt in Deutschland 9,2%. Das heißt, durchschnittlich jede 11. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (98). Die Überlebenschancen sind im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen günstig. Nach neuesten Schätzungen des Robert-Koch-Instituts beträgt die relative Überlebenschance nach fünf Jahren 78%. Die Prognose hat sich seit Beginn der 1980er Jahre erheblich verbessert. Dies dürfte nicht nur auf bessere Therapiemöglichkeiten, sondern auch darauf zurückzuführen sein, dass durch frühzeitigere Diagnose Tumore zunehmend in früheren Stadien entdeckt werden, die sodann mit besseren Heilungsaussichten therapiert werden können (45).

Früher wurde Brustkrebs als eine tödliche Erkrankung angesehen, für die auch extremste Behandlungsformen gerechtfertigt schienen. Bereits 1600 vor Christus behandelten die Ägypter das Mammakarzinom mit Hilfe der Kauterisation. In der Renaissance versuchte man durch heroische Operationen den Tumor mitsamt der umgebenden Muskeln und Knochen zu entfernen (101). Eine etwas weniger invasive Operation wurde im späten 19. Jahrhundert von Halsted eingeführt und galt lange Zeit als Goldstandard (69).

Erst im 20. Jahrhundert erkannte man, dass nicht alle Mammakarzinome dieselbe Prognose haben und somit auch nicht derselben Therapie bedürfen. Seither versucht man Charakteristika herauszufinden, die es ermöglichen

zwischen aggressiven Tumoren, die eine aggressive Therapie benötigen und harmloseren Tumoren, die mit einer milderen Therapie behandelt werden können, zu unterscheiden (102). Das Verständnis des Mammakarzinoms hat sich grundlegend geändert: Hielt man es früher für eine zunächst auf die Brust begrenzte Erkrankung, so versteht man es heute als ein von Beginn an eher generalisiertes Geschehen. Die kurative, operative lokale Therapie verliert daher an Bedeutung (114). Dafür erhalten immer mehr Patienten in allen Stadien der Erkrankung eine systemische Chemo- oder Hormontherapie (18), unabhängig von den üblichen Parametern wie Tumorgröße oder Lymphknotenstatus.

1.2 Definition und Bedeutung eines Prognosefaktors

Im klinischen Alltag dienen Prognosefaktoren dazu, den individuellen Krankheitsverlauf eines Patienten besser vorhersagen zu können, Therapieergebnisse zu vergleichen und für den einzelnen Patienten die passende Therapie festzulegen. Mit Hilfe von Prognosefaktoren soll auch entschieden werden, bei welchen Patienten eine systemische Therapie in einem vernünftigen Nutzen-/Risikoverhältnis steht. Bei klinischen Studien helfen Prognosefaktoren, Patienten in Untergruppen einzuteilen, um Unterschiede z.B. im Ansprechen auf verschiedene Therapien festzustellen.

Das *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) definiert einen Prognosefaktor als Marker, der unabhängig von anderen Faktoren eine Aussage über das Überleben oder das krankheitsfreie Überleben ermöglicht (122). Es ist wichtig, die Unabhängigkeit eines Prognosefaktors in einer Multivarianzanalyse zu berechnen, da manche Marker sehr stark mit anderen Faktoren wie der Tumorgröße oder dem Lymphknotenstatus korrelieren können und damit nicht mehr unabhängige Faktoren darstellen (74). Von Prognosefaktoren abzugrenzen sind prädiktive Faktoren, wie z.B. der Hormonrezeptorstatus, die das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie unabhängig vorhersagen sollen (122).

Hermanek et al. beschrieben fünf Anforderungen, die an einen Prognosefaktor gestellt werden müssen, bevor er in die Klassifikation zur Stadiengruppierung aufgenommen werden kann (51):

1. Ein neuer Prognosefaktor sollte zusätzlich zu bereits bestehenden Prognosefaktoren neue prognostische Information liefern.
2. Es sollte untersucht sein, ob die prognostische Aussagekraft nur für eine spezielle Patientengruppe oder für alle Patienten gültig ist.
3. Signifikanz und Unabhängigkeit sollten durch Multivarianzanalysen gesichert sein.
4. Die Methode zur Bestimmung des Prognosefaktors sollte standardisiert und in allen Behandlungszentren durchführbar sein.
5. Die Kosten für die Bestimmung des Prognosefaktors sollten in einem angemessenen Verhältnis zum Nutzen durch die neue Information stehen.

Etablierte Prognosefaktoren, die diese Kriterien bereits erfüllen und in die Stadiengruppierung einfließen, sind bei Patienten mit Mammakarzinom Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Metastasierung und histologischer Malignitätsgrad. Zudem werden als prädiktive Faktoren der Hormonrezeptorstatus und das Alter der Patientin berücksichtigt (16;18;74;122).

1.3 Klassische Risiko- und Prognosefaktoren des Mamma-Karzinoms

1.3.1 Patientencharakteristika

Im Durchschnitt hat eine Frau ein Risiko von beinahe 10% bis 15%, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken (45). Für das Mammakarzinom gibt es keinen alleinigen so bedeutenden Risikofaktor wie z.B. das Rauchen für das Bronchialkarzinom. Dennoch haben nicht alle Frauen dasselbe Brustkrebs-Risiko. Es gibt drei starke Risikofaktoren, wobei ein fortgeschrittenes Alter den bedeutendsten darstellt. 85% der Brustkrebs-Patienten sind über 50 Jahre alt, dagegen nur 5% unter 40 Jahren (120).

Ein weiterer Risikofaktor ist eine Brustkrebserkrankung bei Verwandten: Leiden mindestens zwei erstgradig Verwandte einer Frau an einem Mammakarzinom, so liegt das Risiko dieser Frau, an einem Brustkrebs zu erkranken, bei 50%. Frauen, bei denen bereits in einer Brust ein Mammakarzinom diagnostiziert wurde, haben ein erhöhtes Risiko in der anderen Brust ein Karzinom zu entwickeln (38;120).

Weitere schwächere Risikofaktoren sind unter anderen ein junges Alter von <12 Jahren bei der Menarche, ein höheres Alter von >30 Jahren bei der Geburt des ersten Kindes, ein höheres Alter von >50 Jahren bei der Menopause oder eine frühere benigne Brustkrankung. (38;55;120)

Nimmt man das Alter als prognostischen Parameter, so verhält es sich umgekehrt: ein Alter unter 40 Jahren bei Erstdiagnose kennzeichnet eine schlechtere Prognose (114).

1.3.2 TNM-Klassifikation

Das TNM-System dient der Klassifikation maligner Tumore und beschreibt die anatomische Ausbreitung der Erkrankung durch drei Komponenten: „T“ steht für

„Tumor“ und beschreibt die Ausbreitung des Primärtumors, „N“ steht für „Nodus“ und kennzeichnet das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen. Das „M“ steht für „Metastasen“ und macht eine Aussage über das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen. Wird die Einteilung anhand klinischer Befunde erhoben, kennzeichnet man sie mit „cTNM“, erfolgt sie postoperativ aufgrund histopathologischer Kriterien, wird dies durch „pTNM“ gekennzeichnet. Nach der Festlegung von T-, N- und M-Kategorien, können diese zu Stadien gruppiert werden: Jede Gruppe ist in sich homogen bezüglich der Überlebensraten (107). Diese genaue Beschreibung des Tumors dient mehreren Zielen: Es hilft einen Therapieplan zu erstellen, die Prognose einzuschätzen und die Behandlungsergebnisse auszuwerten. Zudem erleichtert es die Kommunikation zwischen Behandlungszentren (122).

Das TNM-System wurde von Pierre Denoix in Frankreich zwischen 1943 und 1952 entwickelt. 1958 veröffentlichte ein Komitee der *International Union Against Cancer* (UICC) erste Empfehlungen für die klinische Stadieneinteilung des Brust- und Larynxkrebses. In den darauf folgenden Jahren traf sich die Kommission des UICC immer wieder, um die Methode der TNM-Klassifikation auf Tumore aller Lokalisationen auszudehnen und fasste ihre Ergebnisse in einem Buch, dem *Livre de Poche* zusammen. Überarbeitete neue Auflagen erschienen, in denen neue anatomische Bezirke miteinbezogen wurden. Da manche Benutzer Abwandlungen der Klassifikationsregeln einführten und dies die Standardisierung behinderte, vereinbarten verschiedene nationale TNM-Komitees 1982 eine einzig maßgebliche TNM-Klassifikation zu formulieren und die vierte Edition der *TNM Classification of Malignant Tumors* entstand. Die aktuelle sechste Auflage beinhaltet Regeln für die Klassifikation und Stadieneinteilung, die denen der sechsten Auflage des *American Joint Committee on Cancer Cancer Staging Manual* entsprechen, und die die Zustimmung aller nationalen TNM-Komitees haben (102;107). In der fünften Auflage wurden nur Lymphknoten-Metastasen berücksichtigt, die mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung nachweisbar waren (101). Die bedeutendste Änderung in der neuen sechsten Auflage besteht nun in der Berücksichtigung von Mikrometastasen und isolierte Tumorzellen in Lymphknoten, die mittels neuer Methoden nachgewiesen werden: pN0(i+) beschreibt nun, dass zwar

nicht histologisch, wohl aber immunhistochemisch Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. pN0(mol+) bedeutet nun, dass ein molekularer Nachweis mittels *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* vorliegt (102).

Beim Mamma-Karzinom ist die Einteilung nach der TNM-Klassifikation der stärkste prognostische Faktor. Eine Patientin mit einem Tumor im Stadium I hat nach Erstdiagnose eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 87%, bei einem Tumor im Stadium IIIB dagegen überleben nur 42% die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung (50). Dass auch Tumorausmaß und Nodalstatus jeweils alleine betrachtet direkt mit dem Überleben korrelieren, wurde in vielen Studien belegt (16;20;74). Dabei kann man die Tumorgöße als Indikator für die Dauer, die der Tumor bereits wächst, und den Nodalstatus als Indikator für die Metastasierungsfähigkeit des Tumors sehen (82).

In meine vorliegende Arbeit bezog ich das pT-Stadium sowie das Vorhandensein oder Fehlen von regionären Lymphknoten-Metastasen oder Fernmetastasen ein (102):

pT1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen histologisch nachweisbar
pN0(i+)	wie N0, aber immunhistologischer Nachweis von Lymphknotenmetastasen
pN0(mol+)	wie N0, aber molekularer Nachweis von Lymphknotenmetastasen
N1/N2/N3	Regionäre Lymphknotenmetastasen nachweisbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

1.3.3 Bestimmung des histologischen Malignitätsgrades

Zunächst hatte das TNM-System nur das anatomische Ausmaß eines Tumors berücksichtigt. 1998 traf sich ein Komitee des AJCC, um nicht-anatomische Prognosefaktoren zu identifizieren und zu prüfen. Für die Relevanz eines neuen biologischen Faktors war entscheidend, ob er einen prognostischen Wert unabhängig vom TNM-System hat und ob er mit allgemein zugänglichen Methoden reproduzierbar bestimmt werden kann. Da diese Bedingungen von der Bestimmung des histologischen Malignitätsgrades (Gradings) eines Mamma-Karzinoms erfüllt wurden, empfahl das Komitee, der Klassifizierung des Brustkrebses dieses hinzuzufügen. Bei der Bewertung des histologischen Malignitätsgrades wird die tubuläre Differenzierung (Einteilung von glandulär, über gemischt bis solide oder disseminiert), die Kernpleomorphie (gering, mittelgradig, hochgradig) und die Mitoserate (maximal 1, 2 oder 3 und mehr pro HPF) miteinbezogen (122). Eine Einteilung erfolgt dann in folgende Gruppen:

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert

Viele Studien konnten zeigen, dass ein höherer histologischer Malignitätsgrad unabhängig von Tumorgöße und Nodalstatus mit einer höheren Rezidivrate und so mit einem kürzeren Gesamt- und Krankheitsfreien Überleben korreliert (16;50;74;96).

1.3.4 Hormonrezeptorstatus

Die Bestimmung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren bei Brustkrebspatientinnen wurde nicht in die erweiterte TNM-Klassifikation

aufgenommen, wird jedoch häufig durchgeführt. Bei diesen Rezeptoren, die von etwa 60% der Mammakarzinome gebildet werden, handelt es sich um intrazelluläre Polypeptide, die Östrogen bzw. Progesteron binden und diese Hormone in den Zellkern transportieren, damit dort eine spezifische Genexpression induziert wird. Der prognostische Wert des Hormonrezeptorstatus ist nicht eindeutig geklärt. In einigen Studien konnte zwar ein längeres Überleben für Östrogenrezeptor-positive Tumore nachgewiesen werden, dies konnte allerdings in anderen Studien nicht immer bestätigt werden (74). Silvestrini et al. konnten z.B. in ihrer Studie an 1800 nodal-negativen Brustkrebspatientinnen zeigen, dass eine Östrogenrezeptor-Positivität signifikant mit einem längeren Überleben korreliert. Sie führten das längere Überleben allerdings auf die antihormonelle Therapie zurück, die nur Patientinnen mit Rezeptor-positiven Tumoren erhalten hatten. Der Hormonrezeptorstatus ist hauptsächlich ein prädiktiver Faktor. Östrogen- und Progesteronrezeptor-positive Tumore sprechen zu 60 – 70% auf eine antihormonelle Therapie an, wogegen Tumore, die für beide Faktoren negativ sind nur zu 10% auf eine solche Therapie ansprechen (16). Eine antihormonelle Therapie kann das Risiko für ein Rezidiv und den tumorbedingten Tod um bis zu 40% senken (50).

1.4 Neue Prognosefaktoren

1.4.1 Bedeutung neuer Prognosefaktoren

TNM-Klassifikation, histologischer Malignitätsgrad, Hormonrezeptorstatus, und Alter des Patienten werden zurzeit als Prognose- oder Prädiktionsfaktoren benutzt, um den individuellen Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom einzuschätzen und Therapieentscheidungen zu treffen (118).

Für die Auswahl der angemessenen Therapie wäre es hilfreich, Patienten mit hohem Rezidivrisiko von Patienten mit niedrigem Rezidivrisiko unterscheiden zu können. Entsprechend würde man die Hochrisikogruppe systemisch behandeln, Patienten mit niedrigem Risiko dagegen könnte man vor den negativen Effekten einer solchen Therapie bewahren (67). Doch die klassischen Prognosefaktoren wie TNM-Klassifikation und histologischer Grad reichen nicht aus, um Patienten in solche Hoch- bzw. Niedrigrisikogruppen einzuteilen.

So erleiden beispielsweise auch 30% der Patientinnen ohne Lymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Primärdiagnose und kompletter Resektion des Primärtumors zu einem späteren Zeitpunkt eine Metastasierung (37).

Um zu entscheiden, wer tatsächlich von einer adjuvanten Therapie profitiert, werden neue prognostische Parameter benötigt. Als eventuelle Prognosefaktoren werden die nachfolgenden Marker bzw. Befunde diskutiert und später einer Analyse unterzogen.

1.4.2 Disseminierte Zellen im Knochenmark

Erste Schritte für eine spätere Metastasierung stellen die Streuung von Tumorzellen über das Lymphsystem oder die Blutbahn dar. Zum Nachweis einer lymphogenen Metastasierung wird entweder eine axilläre Lymphknotenentfernung oder eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie durchgeführt. Bei letzterer können gezielt die ersten Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des

Tumors erkannt und untersucht werden (45). Das Lymphknotengewebe wird dann auf Tumorzellen untersucht: größere Ansammlungen von Mammakarzinomzellen können in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung erkannt werden. Einzelne Tumorzellen können mit immunhistochemischen oder molekularen Methoden nachgewiesen werden (102). Nachweis der hämatogenen Streuung erfolgt durch das Auffinden von Fernmetastasen zum Beispiel in Knochen oder Lunge. Einzelne hämatogen gestreute Tumorzellen lassen sich im Knochenmark nachweisen. Anders als einzelne Tumorzellen in Lymphknoten gehen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark bisher nicht in die TNM-Klassifikation ein.

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wurden verschiedene immunhistochemische Methoden angewandt: zuerst benutzte man Antikörper gegen Antigene der polymorphen epithelialen Mucin-Familie wie das *human-milk-fat-globule* oder das *Tumor-assoziierte Glykoprotein 12*. Doch es zeigte sich, dass auch andere Zellen als Tumorzellen mit diesen Antikörpern markiert wurden (12). Cote et al. berichteten 1991, dass Zytokeratin-spezifische Antikörper disseminierte epitheliale Tumorzellen im Knochenmark von Brustkrebspatienten nachweisen können (26). Da epitheliale Zellen weder Bestandteil von normalem Knochenmark sind, noch bei gesunden Menschen auftreten und außerdem tumorspezifische chromosomale Aberrationen aufweisen, hält man epitheliale Zytokeratin-positive Zellen für Mikrometastasen des Primärtumors. In einer prospektiven Studie von Braun et al. konnte diese Annahme bestätigt werden (12).

Unterschiedliche Nachweismethoden und die limitierte statistische Aussagekraft einzelner Studien mit kleiner Fallzahl könnten Ursache für die uneinheitlichen Studienergebnisse bezüglich der prognostischen Aussagekraft disseminierter Tumorzellen im Knochenmark sein. Dennoch gibt es Überlegungen, die Bewertung des Knochenmarkstatus in das aktuelle System zur Klassifizierung von Tumoren aufzunehmen (13;46). Denn in vielen Studien war das Auftreten von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom assoziiert mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf (12;41;43;67;78;118). Vier große Studien mit zusammen genommen 2246 Patientinnen zeigten, dass Patientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ein signifikant kürzeres Gesamt- sowie rezidivfreies Überleben

hatten verglichen mit Patientinnen, deren Knochenmarksaspirate frei von solchen Zellen waren (12;41;43;118). In einer Metaanalyse von Braun et al., die mehr als 4700 Patientinnen umfasst, konnte die prognostische Bedeutung bestätigt werden (14).

Wahrscheinlich repräsentieren disseminierte Tumorzellen im Knochenmark Zellen von hohem Malignitätsgrad, aus denen später Knochenmetastasen entstehen oder sind sogar Beginn einer Metastasierung in verschiedenste Gewebe (12;41). Schmidt-Kettler et al. widersprechen der These, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von dem am stärksten maligne transformierten Klon des Primärtumors abstammen. Sie führten eine genetische Analyse von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark durch und verglichen dabei disseminierte Tumorzellen von Patientinnen mit Metastasen mit denen von Patientinnen ohne Metastasen. Dabei konnten sie zeigen, dass disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von metastasenfremen Patientinnen keine tumorcharakteristischen Aberrationen aufweisen, dagegen die disseminierten Tumorzellen von Patientinnen mit Metastasen sehr wohl tumorcharakteristischen Aberrationen zeigten. Sie folgerten, dass die hämatogene Tumorzellaussaat nicht das Ende einer Sequenz von genetischen Veränderungen markiert, sondern in allen Stadien der Tumorgenese stattfindet (95). Die Charakterisierung der disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und ihr Potential, später manifeste Metastasen zu bilden, sind weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.4.3 Tumorsuppressorprotein p53

Tumore entstehen in Folge einer Störung der normalen Regulation der Proliferationsfähigkeit von Zellen. Für die Kontrolle der Zellvermehrung gibt es eine Reihe von Proteinen, die den Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die nächste entweder fördern oder hemmen. Zu letzteren gehört das Tumorsuppressorprotein p53. Es ist ein 53 Kilodalton (kDa) großes intranukleäres Phosphorprotein, das kodiert wird durch das TP53-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 in der Position 17p.13.1 (80). Die

physiologische Funktion von p53 besteht darin, Zellen mit Desoxyribonukleinsäure-Schäden (DNA-Schäden) an der Proliferation zu hindern bis diese repariert sind (49). Dazu detektiert p53 mit seinem COOH-Ende DNA-Schäden. Als Transkriptionsfaktor bindet es dann mit seiner zentralen Region an spezifische DNA und löst die Expression des Proteins p21 aus. Dieses Protein bindet Cyclin-abhängige Kinasen und hemmt die Phosphorylierung weiterer Proteine, sodass die DNA-geschädigte Zelle letztlich durch ein Zusammenspiel vieler Enzyme am Übergang von der postmitotischen Wachstumsphase (G1-Phase) in die DNA-Synthesephase (S-Phase) gehindert wird. Gelingt eine Wiederherstellung der korrekten Basensequenz nicht, sorgt p53 dafür, dass die Zelle apoptotisch wird. P53 trägt also dazu bei, die Integrität des Genoms zu bewahren (86;124).

Bereits in der Keimbahn kann eine Mutation des TP53-Gens auftreten und führt bei Trägern eines solchen Defekts zum Li-Fraumeni-Syndrom (LFS). Patienten mit LFS haben ein erhöhtes Risiko an verschiedenen Tumoren, besonders aber an Brustkrebs zu erkranken (72). So folgerte man, dass auch sporadische TP53-Mutationen ursächlich an der Entstehung verschiedener maligner Tumorerkrankungen wie Kolon-, Lungen-, Leber- und auch Brustkrebs beteiligt sein könnten (53).

Sporadische Mutationen, die bei 20-40% der Mammakarzinome gefunden werden (9), können an unterschiedlichen Stellen innerhalb des TP53-Gens auftreten. Am häufigsten ist beim Mammakarzinom ein Austausch eines Guanosins gegen ein Tyrosin, was die Veränderung von Aminosäuren in der zentralen Region des p53-Proteins zur Folge hat (53). Dieses Protein kann mit seiner veränderten zentralen Region nicht mehr an DNA binden, seine Funktion als Tumorsuppressorprotein ist gestört, und transformierte Zellen werden nicht an ihrer Proliferation gehindert (65).

TP53-Mutationen sind auf diese Weise an der Tumorgenese beteiligt. Zudem wirken sich Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 negativ auf den Krankheitsverlauf aus: Das Auftreten einer TP53-Mutation korreliert signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben sowie Gesamtüberleben (87).

Dieser Zusammenhang wurde in einer Metaanalyse über 11 Studien von Pharoah et al. bestätigt (84). Ursachen für den ungünstigeren Krankheitsverlauf p53-positiver Tumore sind neben der ungehemmten Proliferation eventuell ein schlechteres Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Doxorubicin (42) oder auf eine antrazyklinbasierte Therapie (87). Zudem enden DNA-Schäden, die aufgrund fehlenden intakten Tumorsuppressorproteins p53 nicht behoben wurden, in weiteren Mutationen, Deletionen oder Amplifikationen von anderen Genen. Dabei handelt es sich z.B. um das HER2-Onkogen, welches seinerseits wiederum mit einer schlechteren Prognose korreliert (9).

Die genaueste Methode, um eine Veränderung im TP53-Gen festzustellen, ist die DNA-Sequenzierung. Eine einfachere, wenn auch ungenauere Alternative ist die immunhistochemische Färbung des veränderten Genproduktes. TP-53-Mutation führt zu einer Proteinstabilisierung (65) sowie zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins, das im Zellkern akkumuliert. Diese Proteinanhäufung kann mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) bestimmt werden (84).

1.4.4 Proliferationsmarker Ki-67

Es gibt eine Reihe von Proliferationsmarkern, mit denen man die für Tumore charakteristische gesteigerte Zellteilung erkennen kann. Um genau diejenigen Zellen, die sich in der Teilungsphase befinden, detektieren zu können, muss ein solcher Marker zwei Voraussetzungen erfüllen: er sollte in allen sich teilenden Zellen präsent sein, und der Wechsel von einem proliferierenden in einen nicht-proliferierenden Zustand einer Zelle sollte von einem raschen Verschwinden des Markers begleitet sein. Diese Bedingungen werden von dem Antigen Ki-67 erfüllt, das von Gerdes et al. erstmals 1983 entdeckt wurde (97). Gerdes et al. beschrieben zunächst den monoklonalen Maus-Antikörper, der ein menschliches nukleäres Antigen bindet, das nur in proliferierenden Zellen vorhanden ist. Den Antikörper nannten sie „Antikörper Ki-67“, das Antigen „Antigen Ki-67“ - „Ki“ nach der Stadt Kiel, in der der Antikörper untersucht wurde und die Ziffer „67“ nach der Nummer des Originalklons in der 96-well-Platte. Ein

Jahr später untersuchten Gerdes et al. die Ki-67-Expression während des Zellzyklus: In ruhenden peripheren mononuklearen Leukozyten der Phase G0 (Ruhephase) konnten sie kein Ki-67 nachweisen. Wurden die Zellen mit Phytohemagglutinin zur Proliferation angeregt, zeigte sich Ki-67 in der Synthesephase, der postmitotischen Wachstumsphase, der Postsynthesephase und der Mitosephase (S-, G1-, G2- und M-Phase). In der Interphase (S-, G1- und G2-Phase) befindet sich Ki-67 im Nukleoplasma, doch während der Mitose legt sich das Protein in der Prophase als Netzwerk um das kondensierende Chromatin und in der Metaphase direkt an die Oberfläche der Chromosomen. Nachdem Ki-67 in allen an der Zellteilung beteiligten Phasen nachgewiesen werden kann, erweist es sich als ausgezeichneter Marker für die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation (44).

Die Primärstruktur des Gens, das Ki-67 auf Chromosom 10 kodiert, wurde von Schlüter et al. entschlüsselt. Sie klonierten und sequenzierten die gesamte komplementäre DNA (cDNA) und entdeckten zwei Isoformen, die durch unterschiedliches Splicen von Messenger-RNA (mRNA) eines einzigen Gens entstehen. Sie haben eine molekulare Masse von 320 kDA und 359 kDA und enthalten beide eine zentrale Region aus 16 repetitiven Elementen. Jeder dieser Abschnitte enthält ein Motiv aus 66 Basenpaaren, das „Ki-67-Motiv“, welches das Epitop für den Antikörper Ki-67 liefert. Die gesamte repetitive Region wird von einem einzigen Exon kodiert, das mit 6845 Basenpaaren eines der größten in Säugern bekannte Exon ist. Insgesamt weist das Ki-67-Gen keine Homologie zu anderen bekannten Gensequenzen auf (94).

Obwohl nun die genaue Genstruktur bekannt ist, bleibt die Funktion von Ki-67 immer noch unklar. Die Schwierigkeiten liegen in der fehlenden Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, der enormen Größe und der Anfälligkeit von Ki-67 gegenüber der Spaltung durch Proteasen (74;94). Doch man nimmt an, dass Ki-67 eine Rolle bei der Zellproliferation spielt. Hinweis darauf liefert ein Versuch von Schlüter et al., der zeigt, dass die Inkubation von Zellen mit Oligo-Deoxy-Nukleotiden komplementär zur Ki-67-mRNA die DNA-Synthese verhindert. Des Weiteren stellten Heyden et al. fest, dass eine Mikroinjektion

von Antikörpern gegen Ki-67 in die Kerne von Swiss-3T3-Zellen eine Abnahme der Zellteilungsrate bewirkt (97).

Trotz der unbekannt Funktion wird Ki-67 als Proliferationsmarker ein prognostischer Wert bei Tumorerkrankungen zugeschrieben. Verschiedene Tumore haben unterschiedlich malignes Potential, was schwierig einzustufen ist, solange der Tumor noch lokalisiert ist. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von Ki-67 z.B. beim Multiplen Myelom oder beim Prostata- und Mammakarzinom mit einem schwerwiegenderen Krankheitsverlauf assoziiert ist (8;97). Bei Brustkrebs scheint Ki-67 ein unabhängiger Prognosefaktor bezüglich des krankheitsfreien und Gesamtüberleben zu sein, was in vielen Studien belegt wurde (47;74;77;97).

1.4.5 Topoisomerase II α

Ein Enzym, dessen Bedeutung man für die Mitose kennt, ist Topoisomerase II α . Sie ist eine von fünf verschiedene Typen von Topoisomerasen, die in Eukaryonten bisher gefunden wurden: Die zum Typ I gehörigen Topoisomerasen I, III α , III β und die zum Typ II gehörigen Topoisomerasen II α und II β (25). Topoisomerase II α ist ein im Zellkern lokalisiertes Enzym mit einer molekularen Masse von 169 bis 180 kDa (17) und wird kodiert durch das TOP2A-Gen auf dem Chromosom 17q12-q21, direkt neben dem HER 2 Onkogen (61).

Funktionen von Topoisomerasen betreffen DNA-Replikation, Transkription, Kondensation und Segregation (116). Bei der Replikation entsteht durch die lokale Entwindung der DNA-Doppelhelix eine übermäßige Verdrillung in der DNA oberhalb der Replikationsgabel. Um diese Verdrillung aufheben zu können, verursachen Topoisomerasen DNA-Doppelstrangbrüche. Dazu bindet Topoisomerase an die DNA, erzeugt einen Bruch in den beiden DNA-Strängen und bindet dann mit ihrem aktiven Tyrosylrest kovalent an das 5'Phosphatende der DNA. In einem nächsten Schritt ermöglicht eine Konformationsänderung der Topoisomerase die Passage eines zweiten intakten DNA-Stranges durch den

Bruch hindurch. Anschließend wird die Kontinuität des gebrochenen DNA-Stranges wiederhergestellt (17).

Während bei der Entwindung der DNA alle Typen der Topoisomerase zusammen wirken, ist bei der Kondensation und Segregation die Topoisomerase II α als einzige von essentieller Bedeutung. Zu diesem Ergebnis kamen Ishida et al. als sie mit dem Topoisomerase II α -Inhibitor ICRF-193 die katalytische Aktivität von Topoisomerase II α hemmten: Die Replikation bleibt unverändert, aber Kondensation und Segregation der Schwesterchromatiden bleiben aus. Die Zellzahl in der folgenden Interphase ist folglich nicht verdoppelt, doch das Genom der Zellen ist nun polyploid und letztlich verlieren die Zellen ihre Überlebensfähigkeit (56).

Im Zusammenhang mit Tumoren ist Topoisomerase II α aus zwei Gesichtspunkten von Bedeutung: Zum einen dient das Enzym als Proliferationsmarker und negativer Prognosefaktor, zum anderen ist es Angriffsziel von einer Gruppe von Medikamenten. Topoisomerase II α wird nur in sich teilenden Zellen exprimiert und eine Überexpression oder eine Amplifikation des TOP 2-Gens korrelieren positiv mit der Proliferationsrate von Mammakarzinomzellen und Tumorgröße. Wird jedoch Topoisomerase II α nicht verstärkt in den Tumorzellen nachgewiesen, korreliert dies mit einem längeren Gesamtüberleben und einem selteneren Auftreten von Metastasen (90). Zellen mit einer höheren Konzentration an Topoisomerase II α sprechen besser auf eine Therapie mit Topoisomerase II α –Inhibitoren an. Der Wirkmechanismus liegt nicht in einer Hemmung der katalytischen Funktion, sondern nutzt den potentiell letalen Charakter von Topoisomerase II α . Zunächst erhöhen diese Medikamente die Konzentration von kovalent an DNA gebundenen Topoisomerase-Komplexen. Dadurch sorgen sie für vermehrte Bildung von DNA-Doppelstrang-Brüchen und gleichzeitig hindern sie das Enzym daran, alle Brüchen auch wieder zu verschließen. So wird Topoisomerase II α in ein physiologisches Gift verwandelt, das dauerhafte, ungeschützte Doppelstrangbrüche verursacht und zu genetischer Instabilität führt: Aberrationen wie Austausch mit Schwesterchromatiden, Insertionen und Deletionen enden im programmierten Zelltod (17;24).

1.4.6 Human Epithelial Growth Factor Receptor 2 (HER2 oder cerbB2)

Um ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation, Ruhephase und Apoptose sowie ein korrektes Ausmaß an Differenzierung innerhalb eines Zellverbands zu ermöglichen, müssen die einzelnen Zellen miteinander kommunizieren. Signale müssen richtig aufgenommen, weitergeleitet und interpretiert werden, andernfalls kann unkontrolliertes Wachstum zur Tumorentstehung beitragen. Eine wichtige Rolle bei der Informationsverarbeitung spielt der *Human Epithelial Growth Factor Receptor 2* (HER2 oder cerbB2), ein 185 kDa großes Glykoprotein, bestehend aus 1255 Aminosäuren (47;123) und kodiert auf dem Chromosom 17q (87). Der Name der Rezeptortyrosinkinase HER2 beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit mit dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (89). HER2 ist neben HER1, HER3 und HER4 ein Mitglied der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren, denen der molekulare Aufbau aus einer extrazellulären ligandenbindenden Region, einer transmembranären Region und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase gemeinsam ist (52). Die Aktivierung der cerbB-Rezeptoren geschieht über extrazelluläre Bindung von Liganden, denen allen ein EGF-ähnliches Motiv von 50 bis 55 Aminosäuren gemeinsam ist (123). Neben anderen handelt es sich dabei um den Wachstumsfaktor *epidermal growth factor* (EGF) als Partner für HER1 und um *neu differentiation factors* und *Neurogline* als Partner für HER3 und HER4. Für HER2 wurde bisher kein spezieller Ligand gefunden und man nimmt an, dass er primär als Korezeptor fungiert. Seine Partner sind die restlichen Mitglieder der cerbB-Rezeptorfamilie (113). Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung der cerbB-Rezeptoren: Die vier verschiedenen Rezeptoren binden aneinander und bilden 10 verschiedene Rezeptordimere. Dies stimuliert die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität und es erfolgt eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der zytoplasmatischen Region. An die phosphorylierten Reste können nun unterschiedliche Proteine wie z.B. Phosphatidylinositol-3-Kinase binden und zur weiteren Signaltransduktion beitragen. In Anbetracht der vielen

Interaktionsmöglichkeiten ist der Signalweg über HER2 nicht linear, sondern stellt ein Signalnetzwerk (*signaling network*) dar (123). Am Ende dieses Signalnetzwerkes, an dem unzählige Proteine beteiligt sind, steht die Expression von Genen, die an Entwicklung, Differenzierung und Proliferation beteiligt sind (79).

Während der embryonalen Entwicklung ist HER2 wichtig für die Kontrolle der Entwicklung von Trabeculae im Herzen. Ein Beispiel für die Rolle von HER2 nach der Geburt ist seine Beteiligung an der Regulierung des normalen Brustwachstums (123).

In Tumorzellen wird HER2 durch Amplifikation zum Onkogen, denn die größere Anzahl von HER2-Molekülen begünstigt das Tumorwachstum: Die höheren Konzentrationen an HER2 erlauben eine spontane Dimerisierung und eine dauernde Signaltransduktion auch in Abwesenheit von Liganden. Nun kommt die Vielfalt des Signalnetzwerkes zum Tragen und verschiedene Wege tragen zum aggressiven Tumorverhalten bei:

Ein Signalweg greift fördernd in den Übergang von der G1- in die Synthesephase ein und sorgt für anhaltende Tumorzellproliferation. Ein weiterer Weg potenziert die Wirkung von HER1, welches über Wachstumsstimuli ebenfalls für eine höhere Zellteilungsrate sorgt (79).

Zudem verhindert ein dauerhaft aktivierter *cerbB2*-Rezeptor die Apoptose, indem er die Proteine *Akt* und *NF-kappaB* stimuliert. Diese verursachen eine Resistenz der Zelle gegenüber dem Tumornekrosefaktor (TNF) und der natürliche Zelltod tritt nicht ein (125).

Spencer et al. fanden heraus, dass die Überexpression von HER2 ein notwendiger Schritt für die Zellmigration ist. Die dauernde Aktivierung von HER2 ist wichtig, um ein Überschreiten der Basalmembran zu induzieren, invasives Tumorwachstum zu erlauben und Metastasierung zu fördern (109).

Slamon et al. beschrieben 1987 als erste die Bedeutung von HER2 im Zusammenhang mit Brustkrebs. Sie fanden heraus, dass in 30% der Fälle das

HER2-Gen amplifiziert ist. Statt der üblichen zwei Kopien fanden sie die doppelte bis 20-fache Anzahl an HER2-Genen. Dies korrelierte signifikant mit kürzerem Gesamt- sowie rezidivfreien Überleben (105). Ross et al. zeigten anhand der Untersuchung von 47 Studien, dass die Korrelation zwischen Amplifikation oder Überexpression von HER2 und schlechter Prognose nicht in jeder, aber in den meisten Studien bestätigt werden konnte (89). Außerdem gibt es Hinweise, dass die Überexpression von HER2 ein schlechteres Ansprechen eines Mammakarzinoms auf eine antihormonelle Therapie oder eine mit Cyclophosphamid-Methotrexat-Fluoruracil vorhersagen kann. Dagegen weist sie auf ein besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Antrazyklinen, Taxanen oder Trastuzumab hin (123).

Andererseits bietet HER2 auch ein Angriffsziel für Medikamente: der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) bindet an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, bewirkt eine Reduktion der Autophosphorylierung und inhibiert so die Signalkaskade (79). Wird ein Mammakarzinom mit HER2-Überexpression mit Trastuzumab behandelt, kann das Fortschreiten der Krankheit verzögert werden (89). Um die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens einzuschätzen, wird vor Therapiebeginn der HER2-Status mittels immunhistochemischer Färbung oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt (5;89).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die prognostische Relevanz der eben beschriebenen Faktoren bei Patienten mit Mammakarzinom zu evaluieren. Hierfür soll die Korrelation dieser Faktoren untereinander und deren Einfluss auf die Überlebensrate untersucht werden. Dabei sollte insbesondere der Zusammenhang zwischen den biologischen Faktoren des Primärtumors und disseminierten Tumorzellen im Knochenmark untersucht werden. Gleichzeitig sollte die Relevanz der untersuchten Faktoren getestet werden. Dabei erschien es von Bedeutung festzustellen, ob ein Faktor jeweils als Prognosefaktor oder

aber als prädiktiver Faktor im Hinblick auf eine Ansprechbarkeit einer Therapie ist.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

Allen Patientinnen der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Innenstadt - der Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU) München, die wegen eines Mammakarzinoms operiert werden, wird die Durchführung einer Knochenmarksbiopsie vor Beginn der Operation in Vollnarkose angeboten. Die Knochenmarkaspirate werden untersucht auf hämatogen gestreute Tumorzellen. Auch Patientinnen mit Mammakarzinom, die bereits in einem anderen Krankenhaus operativ versorgt wurden und zur weiteren Chemo- oder Radiotherapie an die Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt - der LMU kommen, wird eine Knochenmarksbiopsie in Lokalanästhesie vorgeschlagen. Um den Knochenmarkstatus im weiteren Verlauf der Krankheit zu kontrollieren, werden weitere Biopsien bei den Nachsorgeuntersuchungen angeboten. Den Patientinnen werden der experimenteller Charakter und mögliche Nebenwirkungen der Methode erklärt. Anschließend müssen sie ihr Einverständnis mit dem Eingriff entsprechend den Richtlinien der lokalen Ethikkommission schriftlich bestätigen.

Erfolgte die Primäroperation in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt der LMU, so wurde die histologische Untersuchung des Knochenmarks im histopathologischen Labor derselben Klinik durchgeführt.

In diese Studie wurden Patientinnen eingeschlossen, die eine Knochenmarksbiopsie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines Mammakarzinoms erhalten hatten. Weiteres Einschlusskriterium war das Vorhandensein paraffinierter Gewebeproben des Mammakarzinoms. Unter diesen Bedingungen konnten 265 Patientinnen, deren Erstdiagnose eines Mammakarzinoms zwischen Juli 1987 und Dezember 1999 gestellt worden war, in die Studie einbezogen werden.

2.2 Knochenmarksaspiration und immunzytochemische Untersuchung des Knochenmarks

Die Gewinnung und Bearbeitung des Knochenmarks erfolgt anhand eines standardisierten Protokolls(12):

Die Entnahme der Knochenmarksproben wurde entweder in Vollnarkose während der primären Operation des Mammakarzinoms oder in Lokalanästhesie durchgeführt. Aus beiden Cristae iliaca anteriorae wurden je 2-8 ml Knochenmark entnommen, in heparinisierten Spritzen aufbewahrt und innerhalb von Stunden weiter bearbeitet. Die mononuklearen Zellen wurden durch *Dichtegradient* Zentrifugation (1,077 g/mol) mit *Ficoll-Hypaque* (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) bei 900g für 30 Minuten von den restlichen Knochenmarkszellen getrennt. Anschließend wurden sie gewaschen und bei 150xg für 5 Minuten zentrifugiert, gezählt, und 2×10^6 Zellen auf Objektträger aufgebracht. Diese wurden über Nacht getrocknet und immunzytochemisch gefärbt oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wurden mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers A45-B/B3 (Micomet, München, Deutschland) identifiziert. Dieser Antikörper bindet an Epitope von Zytokeratin wie z.B. die Zytokeratin-Heterodimere 8/18 und 8/19. Um Zytokeratin-positive Zellen in Knochenmark zu erkennen, wird eine Konzentration von $2,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die spezifische Reaktion des Primärantikörpers wird durch die *Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase Technik* (APAAP) kombiniert mit einer Neufuchsin-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abbildung 1). Pro Patientin wurden 2×10^6 Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Es wurde keine Hintergrundfärbung durchgeführt. Die Zytokeratin-positiven Knochenmarksproben wurden von einem zweiten Untersucher nochmals begutachtet. So konnten Artefakte, die durch unspezifische Anfärbung mononuklearer Zellen oder durch Zellcluster entstanden waren, ausgeschlossen werden.

Als positive Kontrolle für die Zytokeratinfärbung dienten Mammakarzinomzellen der Zelllinie BT-20A. Die Spezifität der Antikörperreaktion wurde an den Knochenmarksproben der Patientinnen mit einem Maus-Myelom-Antikörper (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für die Isotopen-Kontrolle untersucht. Bei den über 200 getesteten Knochenmarksproben von Patientinnen ohne maligne Erkrankung betrug die falsch-positive Rate 1% (12).



Abbildung 1: Zytokeratinpositive Zelle im Knochenmark

2.3 Tumorgewebe-Proben

2.3.1 Tissue Micro Arrays

Der Einsatz von *Tissue Micro Arrays* (TMA) ermöglicht es, verschiedene repräsentative Tumoreareale auf einem einzigen Objektträger zu färben und zu begutachten, wodurch eine enorme Zeit- und Materialersparnis entsteht. Für diese Technik werden aus archivierten paraffinierten Tumorgewebeblöcken mehrere ausgesuchte repräsentative Gewebebiopsien entnommen. Die Gewebeproben haben die Form eines Zylinders von 1,0 mm Durchmesser. Mehrere solcher Gewebezylinder werden dann in einen neuen Paraffinblock

gegossen. Stellt man aus diesen neuen Paraffinblöcken mikroskopische Schnitte her, erhält man auf einem einzigen Objektträger bis zu 72 runde Tumorscheiben von 1mm Durchmesser, angeordnet in Reihen und Spalten (siehe Abbildung 2). Die einzelnen Punkte können über ein Koordinatensystem aus Ziffern und Buchstaben und einer entsprechenden Datenliste den Patienten zugeordnet werden.

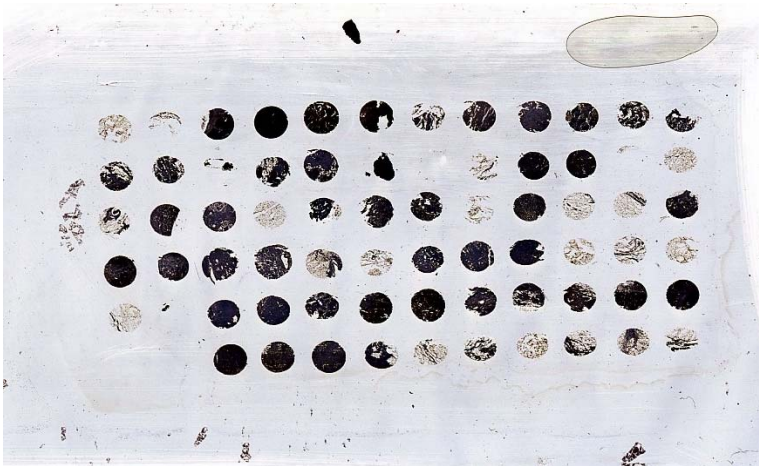


Abbildung 2: Objektträger eines Tissue Micro Arrays

Zur Herstellung der Tissue Micro Arrays wurden die paraffinierten Tumorgewebeblöcke der Patientinnen herausgesucht, die bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms eine Knochenmarkspunktion erhalten hatte. Für den Tumor repräsentative Stellen wurden entweder am Gewebeblock markiert oder mit den ursprünglichen Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten verglichen. Die TMAs wurden am Burnham Institute, LaJolla, CA, USA hergestellt. Dort wurden spezielle *Tissue Arrayer* der Firma Beecher Instruments, Silver Springs, USA benutzt. Aus den TMA-Blöcken wurden 5µm dünne Schnitte angefertigt, die dann in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt der LMU für die immunhistochemische Färbung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendet wurden.

Alle TMAs wurden zunächst von einem unabhängigen Pathologen in Hämatoxylin-Eosin-Färbung befundet.

Alle Tissue Micro Arrays wurden untersucht ohne die klinischen Daten der jeweiligen Patientin zu kennen.

2.3.2 Vorbehandlung der Gewebeproben zur immunhistochemische Färbung

Zum immunhistochemischen Nachweis von HER2, Topoisomerase II α , Ki-67 und p53 wurden die Gewebeproben jeweils auf gleiche Weise vorbehandelt. Diese gemeinsamen Schritte möchte ich in diesem Kapitel beschreiben, in den weiteren Kapiteln werde ich auf die jeweiligen Färbungen durch die verschiedenen Antikörper im Einzelnen eingehen.

Zuerst wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten in Xylol entparaffiniert und zweimal in 100% Alkohol dehydriert. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte durch 20-minütiges Einlegen der Schnitte in 3%-igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte (= 3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol). Danach wurden die Gewebeproben jeweils zweimal kurz in 96%igem und 70%igem Alkohol, dann in destilliertem Wasser geschwenkt. Zur Demaskierung wurden die Schnitte mit Natrium-Citrat-Puffer bei PH 6 erhitzt. Der Citrat-Puffer bestand aus 18 ml der Lösung A, 82ml der Lösung B und 900ml destilliertem Wasser, wobei sich Lösung A aus 21,01g 0,1-molarer Zitronensäure (Merck #244) und 1 Liter destilliertem Wasser zusammensetzte und Lösung B aus 29,41g 0,1-molarem Natrium-Citrat (Merck #6448) und ebenfalls einem Liter destilliertem Wasser bestand. Nachdem die Schnitte fünf Minuten im Schnellkochtopf mit dem Puffer gekocht hatten, wurde der Deckel geöffnet und vorsichtig Leitungswasser zum Puffer dazu gegossen. Nun wurden die Gewebeproben zuerst mit destilliertem Wasser, dann zweimal zwei Minuten mit PBS (*phosphate-buffered saline*) gewaschen. Um eine unspezifische Anfärbung durch hydrophobe Bindung von Immunglobulinen an Membrane oder Fettgewebe zu verhindern, wurden die Schnitte für 20 Minuten in ein Blockierungsserum gegeben. Dieses bestand aus drei Tropfen Normalserum aus dem *Vectastain Elite mouse-IgG-Kit* auf 10ml steriles PBS. Nun erfolgte die Zugabe des jeweiligen Antikörpers.

2.3.3 Immunhistochemischer Nachweis einer HER2-Überexpression

Die HER2-Färbung erfolgte mit dem Detektionssystem *Vectastain Elite mouse-IgG*-Kit und dem primären, monoklonalen Maus-Antikörper *NCL-CB 11* der Firma *Novocastra Laboratories Ltd UK*. Es handelt sich um einen Antikörper der Immunglobulinklasse IgG1, der vom Klon *CB11* abstammt und der spezifisch an die zentrale Domäne des menschlichen Onkoproteins *c-erbB-2* bindet. Die Spezifität der Bindung wurde gezeigt durch Immunopräzipitation mit *c-erbB-2* Onkoprotein von *SKBr3*-Zellen. Man kann ihn sowohl an gefrorenen als auch an paraffinierten Geweben anwenden.

Nachdem die Objektträger mit den Gewebeproben wie im Kapitel 2.3.3 beschrieben vorbehandelt worden waren, wurde für 60 Minuten der Primärantikörper *NCL-CB 11* (Novocastra) in der Verdünnung von 1:40 in DAKO-Verdünnungsmedium zugegeben. Nach zweimaligem zweiminütigem Waschen in PBS wurde für 30 Minuten der biotinylierte anti-Maus Sekundärantikörper (= drei Tropfen Normalserum, ein Tropfen Anti-mouse IgG und 10ml DAKO-Verdünnungsmedium) zugefügt und ein weiterer Waschvorgang in PBS folgte. Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten lang mit einem ABC-Komplex behandelt. ABC-Komplex besteht aus vier Tropfen Reagenz A, vier Tropfen Reagenz B und 10ml sterilem PBS und muss vor Gebrauch 30 Minuten ruhen. Wieder erfolgte ein Waschvorgang mit PBS bevor die Substratfärbung mit DAB (3,3 Diaminobenzidin) stattfand. Dazu wurden zwei Tropfen Pufferkonzentrat mit zwei Tropfen DAB Chromogen und 2ml destilliertem Wasser gemischt, und diese Lösung für 8-10 Minuten auf die Objektträger getropft. Danach wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen, zwei Minuten mit saurem Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und fünf Minuten in Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden sie in eine bis Xylol aufsteigende Alkoholreihe getaucht und mit *Eukitt* eingedeckt.

Die fixierten TMA-Schnitte wurden mit dem Mikroskop Zeiss Axioscope angeschaut, mit der Zeiss AxioCam digital aufgenommen und mit der AxioVision software archiviert. Die Expression von HER-2 wurde semiquantitativ entsprechend üblicher Kriterien (83) bewertet: Die Intensität der Membranfärbung wurde beurteilt nach einer vier-Punkte-Skala. Dabei wurde eine Tumorprobe mit 0 bewertet, wenn sich keine Anfärbung der Tumorzellmembranen zeigte (siehe Abbildung 3), mit 1+, wenn sich der geringste Grad einer Anfärbung präsentierte. Dieser geringste Grad war definiert durch eine schwache Membranfärbung von weniger als 10% der Tumorzellen und/oder einer inhomogenen schwachen Anfärbung aller Zellen. Eine 2+ erhielt eine Gewebeprobe, wenn sich alle Zellmembranen inhomogen moderat färbten und eine 3+, wenn sich alle Tumorzellmembranen intensiv homogen färbten (siehe Abbildung 4). Von den einzelnen Patientinnen existieren zwischen ein und fünf Tumorgewebeproben in Form von TMAs. Jeder dieser bis zu fünf Proben wurde einzeln mikroskopiert und bewertet und aus den so vergebenen Werten von 0 bis 3+ wurde der Mittelwert bestimmt. Ein Tumor wurde für HER-2 positiv erachtet, wenn er insgesamt eine 2+ oder 3+ erhielt. Ergab der Mittelwert den Grenzfall von 1,5, wurden die Proben nochmals mikroskopiert und in die Richtung bewertet, in die die Proben stärker tendierten.

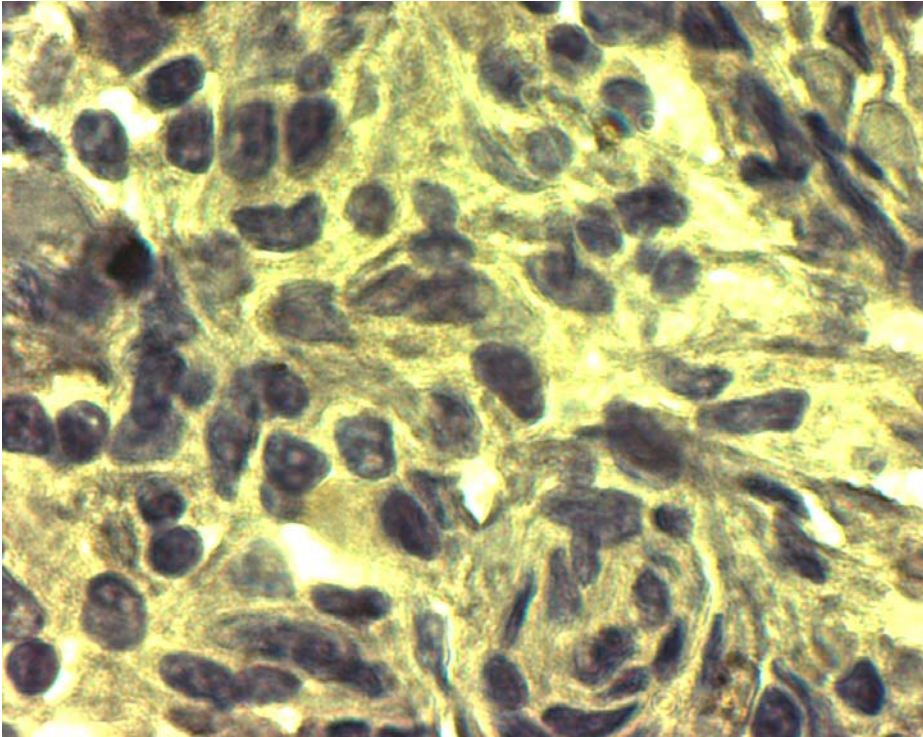


Abbildung 3: HER2-negative Gewebeprobe in der IHC (HER2 0): keine Anfärbung der Zellmembranen

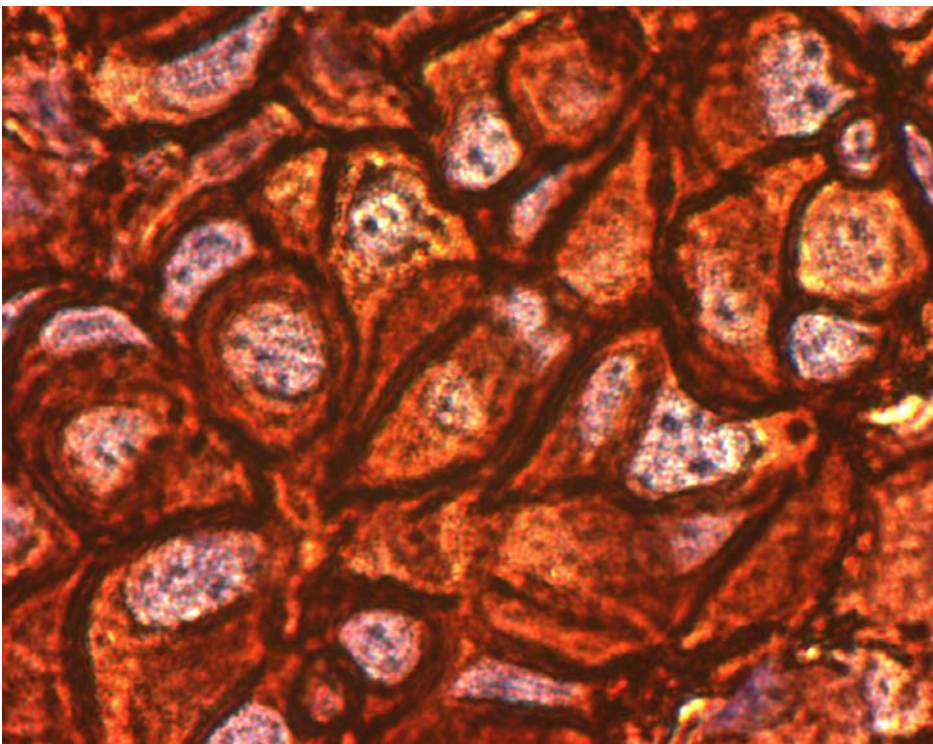


Abbildung 4: HER 2-positive Gewebeprobe in der IHC (HER2 3+): braune Anfärbung der Zellmembranen

2.3.4 Immunhistochemischer Nachweis einer Topoisomerase II α -Überexpression

Die immunhistochemische Färbung von Topoisomerase II α erfolgte mit dem Detektionssystem *Vectastain Elite mouse-IgG*-Kit und dem primären monoklonalen Antikörper *Ab-1*, Klon *SWT3D1* der Firma *Oncogene Research Products*. Der Klon *SWT3D1* ist ein monoklonaler Antikörper, der durch die Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit dem rekombinanten humanen Topoisomerase II α -Peptid und durch Fusion mit *P3X63Ag8,653* Myelomzellen hergestellt wird. Er gehört der Immunglobulinklasse IgG₁ κ an und bindet an ein Epitop innerhalb des C-terminalen Drittels des Topoisomerase II α -Peptids. *Ab-1* besitzt eine hohe Affinität zu Topoisomerase II α und eine moderate Affinität zu Topoisomerase II β .

Zunächst wurden die TMAs entparaffiniert und dehydriert, die endogene Peroxidase geblockt und die Schnitte mit Zitronensäure und PBS behandelt wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Dann wurde für 90 Minuten der Primärantikörper *Ab-1* (*Oncogene Research Products*) in der Verdünnung von 1:40 in DAKO-Verdünnungsmedium zugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde für 30 Minuten der biotinylierte anti-Maus Sekundärantikörper, der den ABC-Komplex bindet, (in gleicher Zusammensetzung wie bei HER-2-Färbung, siehe Kapitel 2.3.3) zugefügt und ein weiterer Waschvorgang in PBS folgte.

Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten lang mit ABC-Komplex (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.3.3) behandelt. Wieder erfolgte ein Waschvorgang mit PBS bevor die Substratfärbung mit DAB (3,3-Diaminobenzidin) stattfand. Dazu wurden zwei Tropfen Pufferkonzentrat mit zwei Tropfen DAB Chromogen und 2 ml destilliertem Wasser gemischt, und diese Lösung für 8-10 Minuten auf die Objektträger getropft. Danach wurden die Proben zweimal zwei Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen, zwei Minuten mit saurem Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und fünf Minuten in Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden sie in eine bis Xylol aufsteigende Alkoholreihe getaucht und mit *Eukitt* eingedeckt. Die TMAs wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die gefärbten Tumorschnitte wurden mit dem Zeiss Axioscope untersucht. Mindestens 100 Zellen pro Gesichtsfeld wurden gezählt. Bei der Topoisomerase II α -Immunhistochemie färben sich die Zellkerne, wenn sie sich färben, relativ homogen (siehe Abbildung 5). Bei der Auswertung wurde also nicht die Intensität, sondern der Prozentsatz der angefärbten Zellkerne berücksichtigt. Die bis zu fünf Tumorgewebeproben jeweils einer Patientin wurden wieder einzeln mikroskopiert und aus den einzelnen Prozentzahlen wurde der Mittelwert gebildet. Für die statistische Evaluation wurde der Median aller Ergebnisse in Prozentangabe ermittelt und die Dichotomisierung wurde entsprechend dieses Wertes vorgenommen.

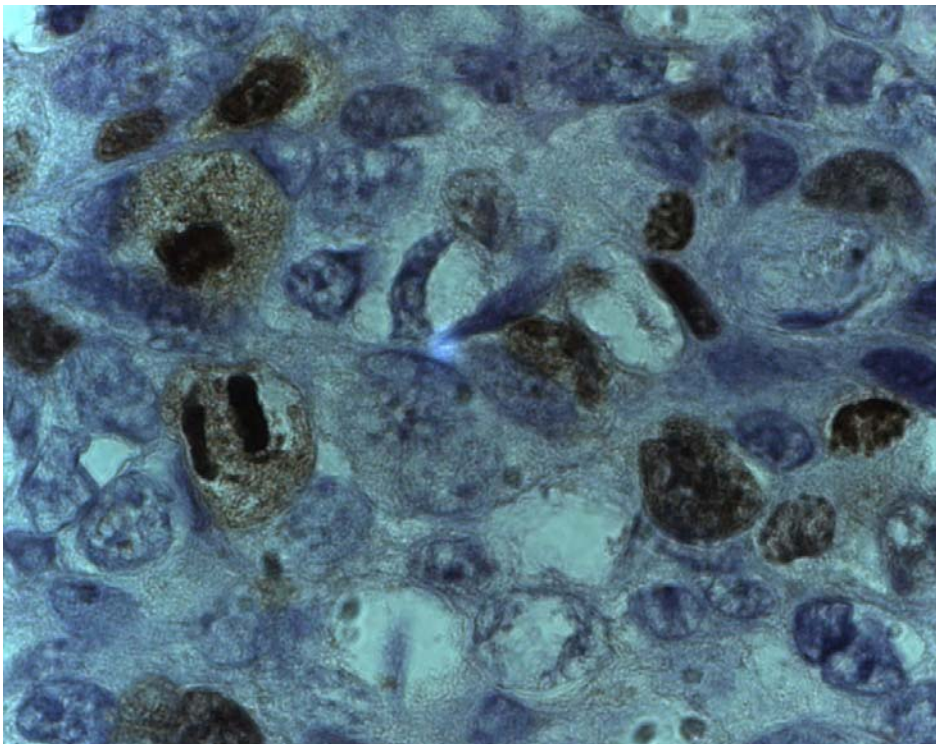


Abbildung 5: Topoisomerase II α -positive Gewebeprobe in der IHC: Schwarz-braune Anfärbung der Zellkerne

2.3.5 Immunhistochemischer Nachweis einer Ki-67-Überexpression

Für die immunhistochemische Färbung von Ki-67 wurden ebenfalls das Detektionssystem *Vectastain Elite mouse-IgG-Kit* sowie der primäre monoklonale Antikörper Ki-67 des Klons *MIB-1* der Firma *DAKO*, UK verwendet. *MIB-1* gehört der IgG₁-Klasse an und bindet spezifisch an das nukleare Antigen des Ki-67-Proteins.

Nach der Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurde der Primärantikörper *MIB-1* in der Verdünnung von 1:100 in DAKO-Verdünnungsmedium zugegeben. Die weitere Behandlung der TMAs verlief wie bei der HER-2- und Topoisomerase II α -Färbung: Waschen mit PBS, Zugabe des Sekundärantikörpers, Behandlung mit ABC-Komplex, Waschen mit PBS, Substratfärbung mit DAB, Waschen in destilliertem Wasser, Gegenfärbung mit Hämalaun, Bläuen mit Leitungswasser, Tauchen in aufsteigender Alkoholreihe und Eindecken mit *Eukitt*.

Die Tumorschnitte wurden mit dem Zeiss Axioscope untersucht (siehe Abbildung 6). Nachdem es sich bei der Ki-67-Immunhistochemie ebenfalls um eine Kernfärbung handelt, wurde die mikroskopische Auswertung auf dieselbe Weise durchgeführt wie bei Topoisomerase II α .

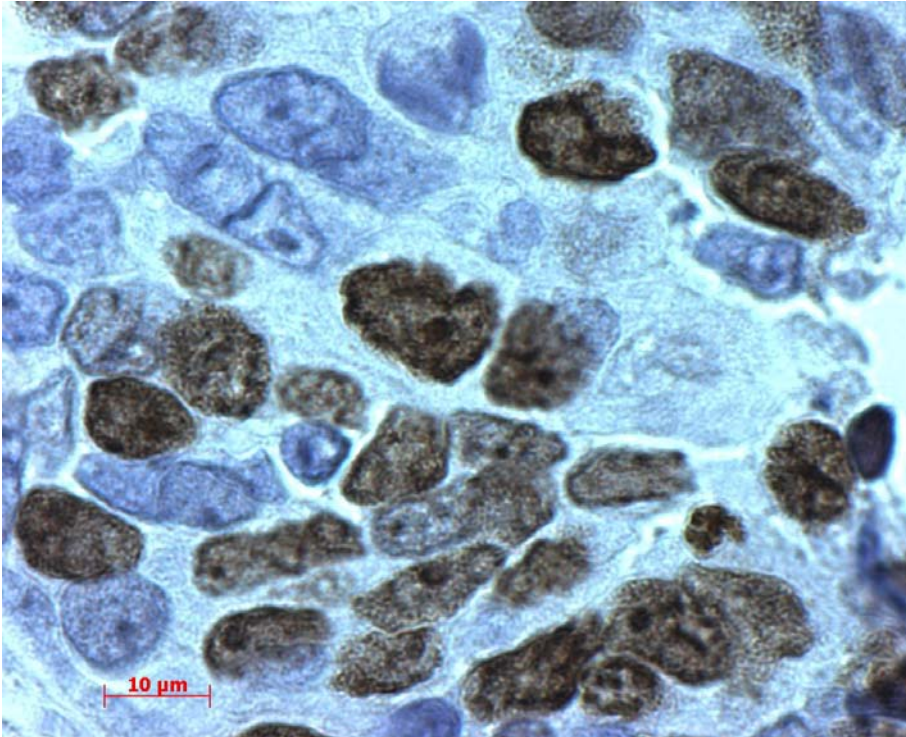


Abbildung 6: Ki-67-positive Gewebeprobe in der IHC: schwarz-braune Anfärbung der Zellkerne

2.3.6 Immunhistochemischer Nachweis von p53

Die p53 Färbung wurde durchgeführt mit dem Detektionssystem *Vectastain Elite mouse-IgG-Kit* und dem primären Antikörper p35, Klon *DO-1* der Firma *Oncogene Reserach Products*. Der Klon *DO-1* ist ein monoklonaler Mausantikörper, der durch Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit rekombinatem humanem Wildtyp-p53 und durch Fusion von Splenozyten mit *Maus-Myelom-X63Ag8.635-Zellen* hergestellt wird. Er gehört dem Isotyp IgG_{2aK} an und bindet an die Aminosäurereste 21-25 von humanem p53.

Nach der oben beschriebenen Vorbehandlung wurde der Primärantikörper p53, Klon *Do-1*, in einer Verdünnung von 1:200 in DAKO-Verdünnungsmedium den TMA's für 90 Minuten zugefügt. Die folgenden Schritte vom Waschen in PBC bis zum Eindecken in *Eukitt* sind dieselben wie bei der immunhistochemischen Färbung von HER-2, Topoisomerase II α und Ki-67.

Die Schnitte wurden ebenfalls mit Zeiss Axioscope untersucht (siehe Abbildung 7) und die Evaluation der p53-Expression erfolgte auf dieselbe Weise wie bei Topoisomerase II α .

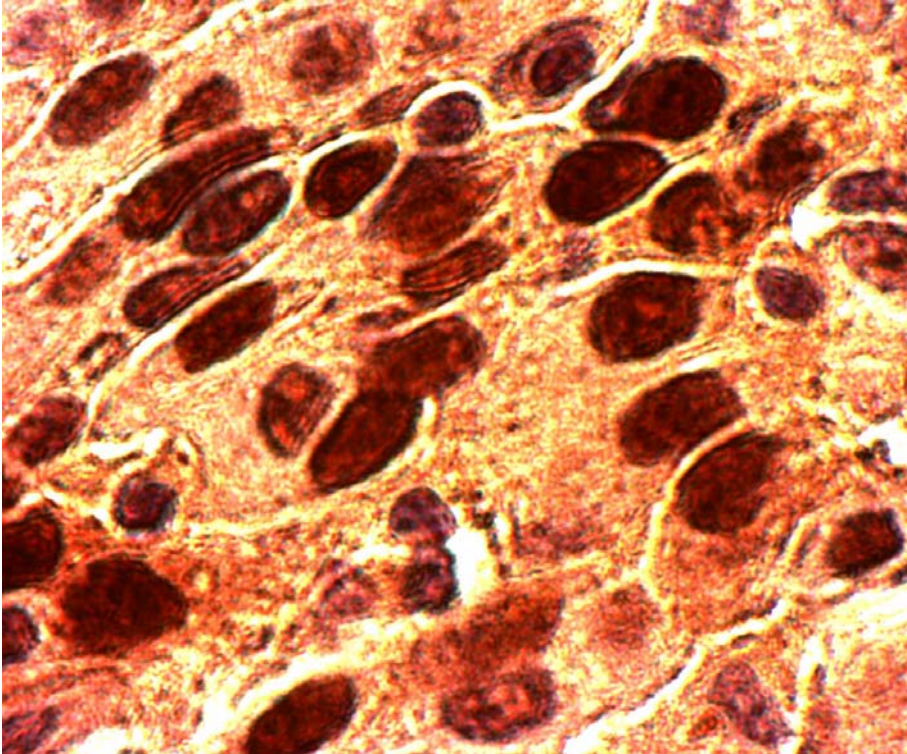


Abbildung 7: p53-positive Gewebeprobe in der IHC: braune Anfärbung der Zellkerne

2.3.7 Nachweis einer HER2- und Topoisomerase II α -Amplifikation durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde durchgeführt mit der *Locus Specific Identifier DNA Probe (LSI[®]) TopIIA/HER2/CEP17 Multicolour Probe* und dem *Paraffin Pretreatment Reagent Kit* der Firma *Vysis inc., Downers Grove, Il., USA*. LSI[®] enthält drei verschiedene DNA-Sonden, die spezifischen DNA-Regionen, Gensequenzen oder Genloci homolog sind und die direkt markiert sind mit einem der *Vysis[™] Fluorophore*: Zur Markierung des HER-2-Gens wurde die mit *SpectrumGreen fluorophores* gekennzeichnete DNA-Sequenz eingesetzt (siehe Abbildung 8), zur Markierung des Topoisomerase II α -Gens die mit *SpectrumOrange fluorophores* gekennzeichnete Sonde (siehe Abbildung 9). Diese beiden Sonden hybridisieren mit der Bandenregion 17q11.2-12. Zusätzlich wurde mit einer mit *SpectrumAqua* gekennzeichneten

Sonde, homolog zur Alpha-Satelliten-DNA des Chromosoms 17 (Bandenregion 17p11.1-q11.1, locus D17/Z1), das Zentromer des Chromosoms 17 markiert (siehe Abbildung 10).

Die Sonden fluoreszieren laut Hersteller mit moderater Intensität sowohl in Interphasekernen als auch an Metaphasechromosomen. Um die paraffinierten Präparate für die Gensonden zugänglich zu machen, wurden folgende Lösungen aus dem *Paraffin Pretreatment Reagent Kit* benutzt:

Pretreatment Solution (Natrium thiocyanate)

Protease Buffer (NaCl, pH 2.0)

Wash Buffer (2xSSC, pH 7,0)

Protease (2500-3000 U/mg protease, lyophilized).

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers:

Zuerst wurden die Tumorschnitte dreimal 10 Minuten lang in Xylol entparaffiniert, dann zweimal fünf Minuten in 100%igem Alkohol dehydriert und an der Luft getrocknet.

Zum Auflockern des Gewebes wurden die Präparate 15 Minuten lang bei Raum-Temperatur in 1,2 molares HCl, dann drei Minuten in steriles Aqua dest. und anschließend drei Minuten lang in Waschpuffer (*Wash Buffer*) getaucht. Dann erfolgte das 30-minütige Eintauchen in die auf 80°C erhitzte Vorbehandlungslösung (*Pretreatment Solution*) gefolgt von einem weiteren einminütigen Bad in destilliertem Wasser und weiteren Waschschrift in Waschpuffer wie oben beschrieben.

Nun erfolgte die Proteasebehandlung: Nachdem der Waschpuffer vorsichtig abgetupft worden war, wurden die Präparate für 10 Minuten in die 37 °C warme, frisch angesetzte Proteaselösung (*Protease Buffer + Protease*) gegeben. Wieder folgte ein zweimal fünfminütiger Waschvorgang in Waschpuffer und ein Trocknen bei Raumtemperatur.

Zur Fixierung der Präparate wurden diese für 20 Minuten in 4%iges Formalin und zweimal für fünf Minuten in Waschpuffer getaucht und getrocknet.

Die Denaturierung der Präparate-DNA erfolgte für fünf Minuten in einer Denaturierungslösung (70ml Formamid + 30ml 2xSSC, pH 7.4) bei 72°C. Anschließend wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%iges, 96%iges und 100%iges Ethanol) getaucht und dann bei Raumtemperatur getrocknet.

Ab dem nun folgenden Hybridisierungsschritt wurde im Dunkeln gearbeitet. 10µl der Sondenmischung aus oben genannten Gensonden wurden je auf die Objektträger pipettiert und diese sofort mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und mit Fixogum verschlossen. In der vorgewärmten Hybridisierungskammer wurden die Schnitte fünf Minuten lang bei 73 °C und 20 Stunden lang bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das *Fixogum* gelöst und die Objektträger für zwei Minuten in die 72 °C warme Waschlösung gestellt. Zur Herstellung dieser Waschlösung mischte ich 100ml 20xSSC (der Firma Vysis), 850ml destilliertes Wasser und 3ml NP-40 (der Firma Vysis) und stellte den pH von 7.0 mit NaOH ein. Dann füllte ich mit Aqua dest. auf einen Liter auf und erwärmte die Lösung für 30 Minuten auf 73 °C. Nach diesem Hybridisierungswaschvorgang trockneten die Schnitte an der Luft. Zur Gegenfärbung wurden pro Objektträger 10µl 4'-6'-diamidino-2'-phenylindole (*DAPI / Counterstain, Vysis*) benutzt (siehe Abbildung 11). Bedeckt mit einem Deckglas und mit *Fixogum* verschlossen wurden die Präparate bei -20 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde durchgeführt mit der *Zeiss AxioScope / Zeiss AxioCam* und *AxioVision software* (Carl Zeiss, Deutschland). Zum Erkennen der Gegenfärbung mit DAPI zusammen mit den Topoisomerase II α -Signalen wurde der Filter *DAPI/Orange*, mit den HER2-Signalen der Filter *DAPI/Green* und mit den CEP17-Signale kombiniert mit den beiden ersteren der Filter *DAPI/Aqua/Green/Orange* (der Firma *Vysis. Inc.*) benutzt. Signale von mindestens 60 Zellen in drei verschiedenen Tumorregionen wurden ausgewertet. Pro Zelle wurden jeweils die HER-2- und Topoisomerase II α -Signale sowie die CEP17-Signale gezählt. Aus den einzelnen Werten wurden

die Quotienten (Ratio) HER-2-Signale / CEP17-Signale bzw. Topoisomerase II α -Signale / CEP17-Signale gebildet. Aus den einzelnen Quotienten wurde der Mittelwert berechnet, und ein Tumor galt als positiv bezüglich einer HER-2- bzw.- Topoisomerase II α -Amplifikation, wenn dieser ≥ 2 war (siehe Abbildung 12). Da die Gene für HER-2 und Topoisomerase II α beide auf Chromosom 17 liegen, erhält man durch die Ratio eine Aussage über eine Amplifikation der einzelnen Gene, nicht über eine Vervielfältigung des Chromosomensatzes. Gelegentlich geht die physikalische Verbindung zwischen den amplifizierten Genen und dem Zentromer des Chromosoms17 jedoch verloren. In diesen Fällen wurde die Ratio nicht gewertet (83).

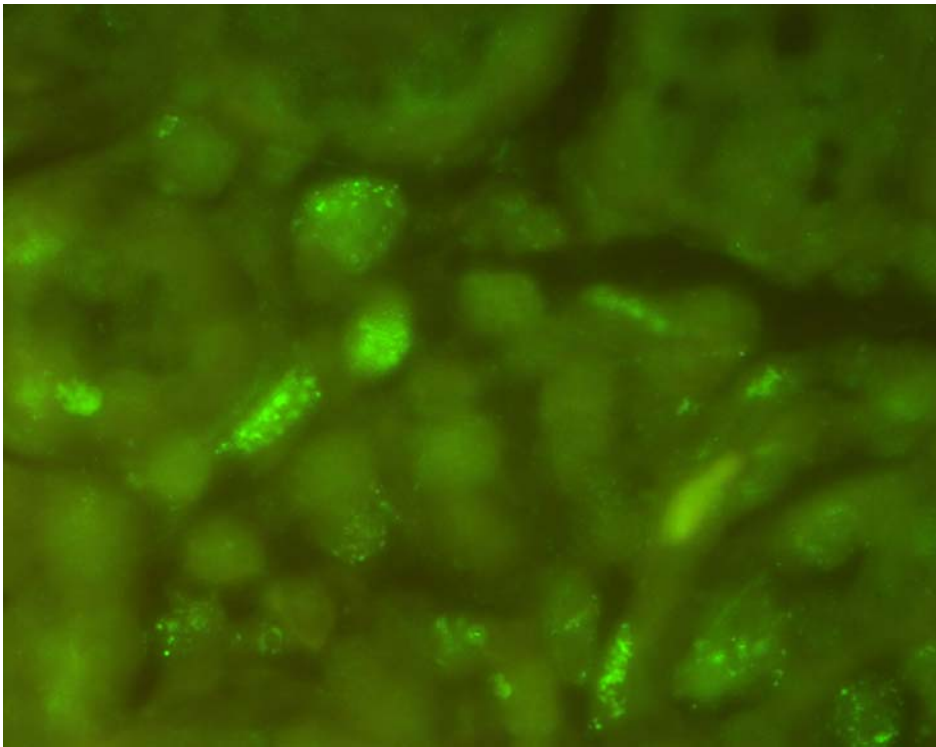


Abbildung 8: Kennzeichnung des HER-2-Gens durch Markierung der entsprechenden DNA-Sequenz mit SpectrumGreen fluorophores (Vergrößerung x1000)

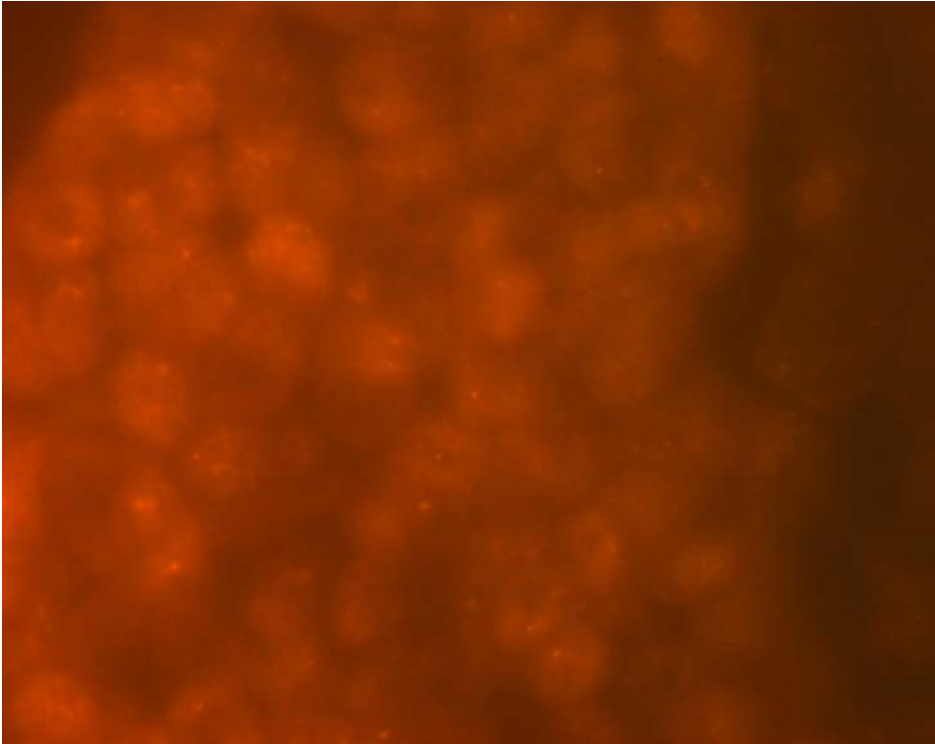


Abbildung 9: Kennzeichnung des Topoisomerase II α -Gens durch Markierung der entsprechenden DNA-Sequenz mit SpectrumOrange fluorophores (Vergrößerung x1000)

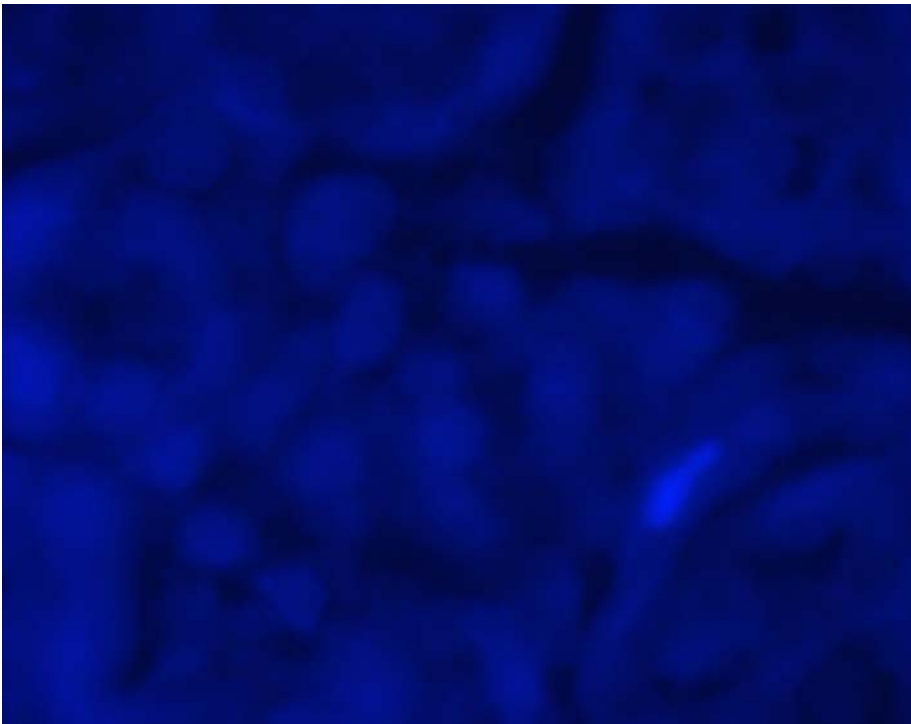


Abbildung 10: Kennzeichnung des Zentromers des Chromosoms 17 durch Markierung der Alpha-Satelliten-DNA des Chromosoms 17 mit SpectrumAqua (Vergrößerung x1000)

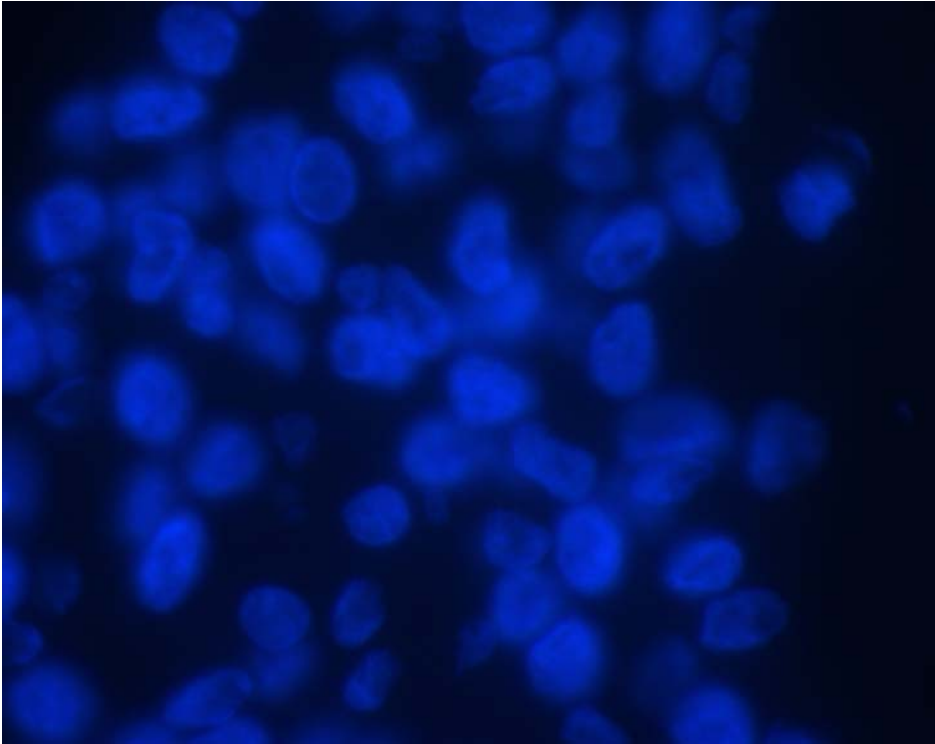


Abbildung 11: Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (Vergrößerung x1000)

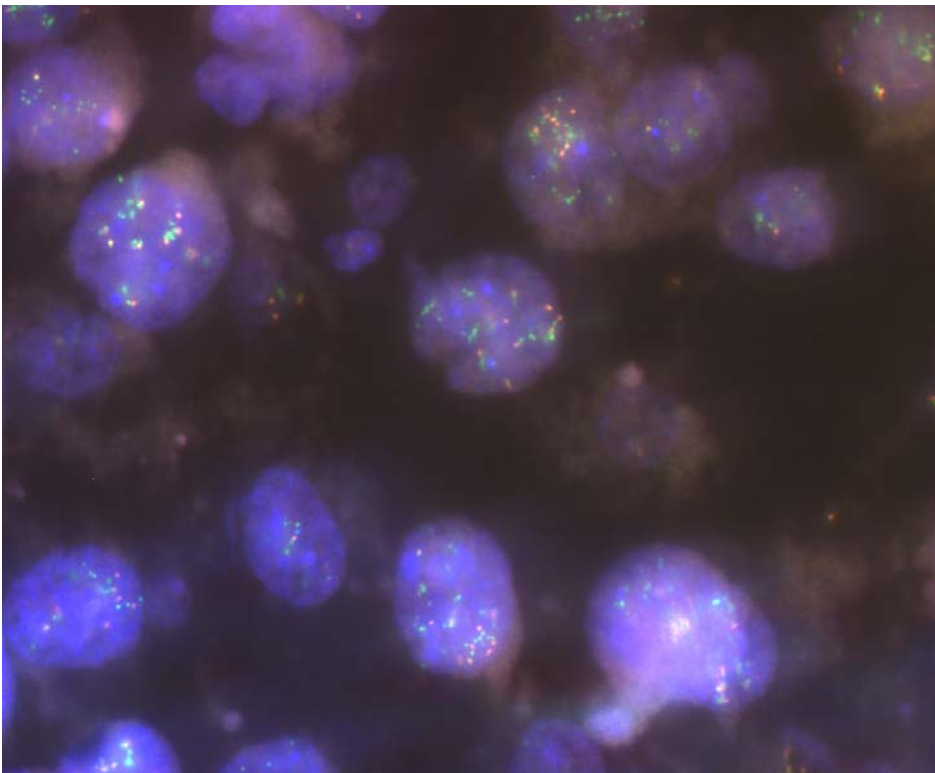


Abbildung 12: HER2-positive Gewebeprobe in der FISH (Vergrößerung x1000)

2.4 Statistische Methoden

Alle Patientendaten bezüglich Geburtsdatum, Histologienummer, Geburten, Menopausenstatus, Zeitpunkte der Knochenmarkspunktionen, Zeitpunkt der Erstdiagnose, TNM-Status, Tumorhistologie, Grading, Resektionsgrenzen, Art der Primäroperation, Therapie, evt. Zeitpunkt und Art von Rezidiven und Metastasen, evt. Todeszeitpunkt und -ursache sowie die Ergebnisse von Knochenmarks-Immunzytochemie, Tumor-Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle eingegeben. Die statistische Auswertung wurde durchgeführt mit Hilfe der Software SPSS 12.0 (SPSS Inc. Chicago. Il., USA). Für den Vergleich von Knochenmarksstatus, den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen sowie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und der Charakteristika der Patientinnen wurden der χ^2 -Test zur Bestimmung der Korrelation benutzt. Krankheitsfreies Überleben, metastasenfreies Überleben und Gesamtüberleben jeweils in Abhängigkeit der Untersuchten Faktoren wurden mit der Kaplan-Meier-Analyse („Log-rank-Test, Univariat“) und der Cox Regressionsanalyse („multivariate, Einschluss vorwärts bedingt“) untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika und histologische Parameter

In dieser Studie wurden Knochenmarksproben und *Tissue Micro Arrays* von 265 Patientinnen untersucht. Der Median des Patientenalters betrug 57 Jahre (Spannweite 31 - 88 Jahre). Von den Patientinnen waren 82 (31%) prämenopausal und 183 (69%) postmenopausal. Bei Anwendung der TNM-Klassifikation zeigten 153 Patientinnen (58%) einen Tumor im Stadium pT1, 81 Patientinnen (30,5%) einen Tumor im Stadium pT2, 5 Patientinnen (2%) einen Tumor im Stadium pT3 und 12 Patientinnen (4,5%) einen Tumor im Stadium pT4. Bei 14 Patientinnen (5%) war das pT-Stadium nicht angegeben. Bei 122 Patientinnen (46%) wurden zum Zeitpunkt der Primäroperation Lymphknotenmetastasen festgestellt, bei 136 Patientinnen (51%) wurden dort keine Metastasen gefunden und von 7 Patientinnen fehlten Angaben dazu. Bei Tumoren von 232 Patientinnen wurde ein histologisches Grading durchgeführt, wobei 21 Tumore (9%) als G1-, 128 Tumore (55%) als G2- und 83 Tumore (36%) als G3-Tumore eingestuft wurden. Mammakarzinome von 94 Patientinnen (40%) waren Östrogenrezeptor-negativ, die von 141 Patientinnen (60%) Östrogenrezeptor-positiv. Eine Lymphangiosis carcinomatosa wurde bei 64 von 260 Patientinnen (24,6%) beschrieben, eine Hämangiosis nur in 12 von 257 Fällen (5%).

Vergleicht man die histologischen Parameter miteinander, so stellt man fest, dass die Tumorgöße signifikant mit dem Befall von Lymphknoten ($p < .001$), mit dem histologischen Grading ($p < .001$) und mit Lymphangiosis ($p < .001$) korreliert. Außerdem zeigte sich eine signifikante Korrelation von Lymphknotenmetastasen zum histologischen Grading ($p < .001$), zum Östrogenrezeptorstatus ($p < .001$), zu Lymphangiosis ($p < .001$) und zu Hämangiosis ($p < .001$). Ein negativer Östrogenrezeptorstatus korrelierte mit

Lymph- und Hämangiosis (p jeweils $<.001$), und Lymphangiosis korrelierte mit Hämangiosis ($p<.001$).

Diese Studie wurde retrospektiv an Fällen der Jahre 1994 bis 1999 durchgeführt, und so wurden die Patientinnen entsprechend den damaligen Leitlinien adjuvant behandelt. Von den insgesamt 265 Patientinnen erhielten 139 keinerlei adjuvante Therapien. Diese Gruppe war besonders interessant, da an ihr der „natürliche Krankheitsverlauf“ untersucht werden konnte. 70 Patientinnen wurden mit einer adjuvante Chemotherapie nach unterschiedlichen Protokollen behandelt: 31 Patientinnen erhielten eine Therapie mit Cyclophosphamide-Methotrexat-Fluorouracil (CMF), 21 Patientinnen eine mit anthrazyklinhaltigen Kombinationen, 10 Patientinnen eine mit Anthrazyklin/Taxankombinationen und 3 Patientinnen eine Therapie mit anderen Kombinationen. Bei 5 Patientinnen ist nicht bekannt, mit welcher Art von Chemotherapie sie behandelt wurden. Eine antihormonelle Therapie bekamen 48 Patientinnen und bei 8 Patientinnen existieren keine Daten zu einer adjuvanten Therapie.

Anzahl der Patienten (265)		Therapieform
139		Keine adjuvante Therapie
70		Adjuvante Chemotherapie
	31	Cyclophosphamid-Methotrexat-Fluoruracil
	21	Anthracyclinhaltige Kombination
	10	Anthrazyklin/Taxan-Kombination
	3	Andere Kombinationen
	5	Chemotherapie nicht bekannt
48		Antihormonelle Therapie
8		Keine Daten zu Therapie

Tabelle 1: Auflistung der verschiedenen Therapieformen in der Kohorte der untersuchten Patientinnen

3.2 Immunzytochemische Analyse des Knochenmarkes

Bei 68 von 265 Patientinnen (25,7%) konnten disseminierte Tumorzellen im Knochenmark (DTZ) zum Zeitpunkt der Primärdiagnose gefunden werden. Der Median lag bei 2 Tumorzellen pro 2×10^6 untersuchter Knochenmarkszellen mit einer Spannweite von 1-1500 Zellen. Der Knochenmarkstatus korrelierte nicht signifikant mit einem der untersuchten histologischen Faktoren (siehe Tabelle 2). Dennoch bestand der Trend, dass Patientinnen mit einer TumorgroÙe von über 2cm ($p=.06$) und mit HER2-FISH-positivem Tumor ($p=.06$) ein höheres Risiko einer hämatogenen Tumorzell dissemination aufwiesen.

Immunhistochemische Positivität für HER2, Topoisomerase II α , Ki-67 oder p53 konnten den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark nicht vorhersagen.

χ^2, p	pT (>2cm)	LK Pos	G3	ER pos	HER2 IHC	Topo	Ki-67	P53
DTZ	.063	.29	.65	.85	.82	.47	.86	.67

Tabelle 2: statistische Korrelation disseminierter Tumorzellen im Knochenmark mit den übrigen untersuchten Faktoren

pT = TumorgroÙe; LK pos = Lymphknotenmetastasen; G3 = histologischer Malignitätsgrad G3; ER pos = Östrogenrezeptorstatus positiv

3.3 HER2 - Immunhistochemie und FISH

Insgesamt konnten 167 Tumore mittels Immunhistochemie auf eine HER2-Überexpression untersucht werden. Dabei wurden 81 Tumore (48,5%) mit 0, 52 Tumore (31,1%) mit 1+, 19 Tumore (11,4%) mit 2+ und 15 Tumore (9,0%) mit 3+ bewertet. Da mit 0 oder 1+ bewertete Tumore als HER2-negativ und mit 2+ oder 3+ bewertete Tumore als HER2-positiv angesehen wurden, waren 132 Tumore (71%) HER2-negativ und 35 Tumore (21%) HER2-positiv. Die HER2-

Immunhistochemie korrelierte nicht mit den üblichen histologischen Faktoren oder mit dem Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zu Hämangiosis ($p=.01$) sowie zur Expression von Ki-67 ($p=.031$) und von p53 ($p=.001$) (siehe Tabelle 3).

χ^2, p	pT (>2cm)	LK Pos	G3	Topo	Ki-67	P53	Hämangiosis
HER2 IHC	.50	.47	.11	.06	.031	<.001	.01

Tabelle 3: statistische Korrelation von HER2-Positivität in der IHC mit den übrigen untersuchten Faktoren

pT = Tumorgröße; LK pos = Lymphknotenmetastasen; G3 = histologischer Malignitätsgrad G3;

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigten 121 Tumore (75,7%) keine Amplifikation des HER2-Gens. Bei 39 Tumoren (24,3%) war die Ratio HER2 / CEP 17 > 2, das HER2-Gen also amplifiziert. Vergleicht man die Ergebnisse der FISH mit denen der Immunhistochemie, so stellt man fest, dass von 72 der in der IHC mit 0 bewerteten Tumore 10 Tumore (13,9%) ein amplifiziertes HER2-Gen zeigten, von 46 mit 1+ bewerteten 9 (19,5%) ein amplifiziertes HER2-Gen zeigten, von 16 mit 2+ bewerteten 7 (43,7%) ein amplifiziertes HER2-Gen zeigten und dass von 15 mit 3+ bewerteten 10 Tumore (66,7%) eine Amplifikation aufwiesen. Die Korrelation zwischen IHC und FISH war <.001. Eine Amplifikation des HER2-Gens korrelierte zwar nicht statistisch mit einem der anderen Faktoren, aber ein Trend zur Korrelation zum Auffinden von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ($p=.063$) fiel auf.

HER2 IHC	HER2 Amplifikation	Anzahl der Fälle	% FISH positiv

0	Negativ	62	
	Positiv	10	13.9
1+	Negativ	37	
	Positiv	9	19.5
2+	Negativ	9	
	Positiv	7	43.7
3+	Negativ	5	
	Positiv	10	66.7

Tabelle 4: Verteilung von HER2 in IHC und FISH (Korrelation $p < .001$)

3.4 Topoisomerase II α - Immunhistochemie und FISH

Die Expression von Topoisomerase II α konnte bei 187 Mammakarzinomen bewertet werden. Der Median der Expressionsrate betrug 10% bei einer Spannweite von 0 – 90%. 87 Tumore (46%) zeigten eine Expressionsrate von über 10% und wurden als Topoisomerase II α -positiv gewertet. Eine Topoisomerase II α -Positivität korrelierte signifikant mit Östrogenrezeptor-Negativität ($p = .026$), mit einer Ki-67-Expression ($p = .002$) und einer p53-Expression ($p = .001$). Ein Trend zur Positivität von Topoisomerase II α fiel bei HER2-IHC-positiven Tumoren auf ($p = .06$). Knochenmarksstatus oder andere Faktoren waren nicht mit der Expression von Topoisomerase II α verbunden (siehe Tabelle 5).

χ^2, p	pT ()	LK Pos	G3	ER neg	Ki-67	P53	HER2 IHC
-------------	-----------	-----------	----	-----------	-------	-----	-------------

Topo	.02cm9	.16	.71	.026	.002	<.001	.06
------	--------	-----	-----	------	------	-------	-----

Tabelle 5: statistische Korrelation von Topoisomerase II α -Positivität in der IHC mit den übrigen untersuchten Faktoren

pT = Tumorgröße; LK pos = Lymphknotenmetastasen; G3 = histologischer Malignitätsgrad G3; ER neg = Östrogenrezeptorstatus negativ

Bei der FISH-Analyse konnten nur 154 Fälle ausgewertet werden. In den übrigen Fällen waren die Gewebeschnitte bzw. die Fluoreszenzmikroskopiebefunde nicht aussagekräftig genug. 47 von 154 Fällen (30,5 %) zeigten eine Topoisomerase II α -Amplifikation, es wurde kein Fall von Deletion gefunden. Bei Vergleich mit der HER2-Amplifikation waren von den HER2 negativen Fällen 93 (80 %) auch Top IIa negativ, 23 (20 %) waren amplifiziert. Von den HER2 positiven Fällen waren 14 Top IIa negativ (37 %) und 24 positiv (63 % Ko-Amplifikation). Somit lagen in 117 von 154 Fällen (76 %) kongruente HER2 und Top IIa Fälle vor. Die Korrelation zwischen HER2 und Top IIa war statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Bei Vergleich mit den immunhistochemischen Auswertungen bestand keine signifikante Korrelation von Top IIa FISH mit Top IIa IHC, HER2-ICH, Ki 67, sowie den histologischen Parametern oder der Präsenz von DTZ-KM. Lediglich zur p53-Positivität bestand ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,030$).

3.5 Ki67 – Immunhistochemie

Die Expression von Ki-67 konnte bei 184 Tumoren untersucht werden, wovon 52 Tumore (28,3%) eine Anfärbung mittels IHC aufwiesen. Die Rate der gefärbten Zellkerne lag zwischen 0 und 15%. Aufgrund der schwachen Expression wurde jede Anfärbung (> 0 %) als Positivität für Ki-67 gewertet. Die Expression von Ki-67 korrelierte mit Östrogenrezeptor-Negativität ($p = .034$): 27,3% (36/132) der Ki-67-negativen Tumore, aber 43,6% (24/55) der Ki-67-positiven Tumore waren Östrogenrezeptor-negativ. Außerdem bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Ki-67 und p53 ($p = .004$) (siehe Tabelle 6).

χ^2, p	pT (>2cm)	LK Pos	G3	ER-neg	P53
Ki-67	.61	.17	.80	.034	.004

Tabelle 6: statistische Korrelation von Ki-67-Positivität mit den übrigen untersuchten Faktoren
pT = Tumorgroße; LK pos = Lymphknotenmetastasen; G3 = histologischer Malignitätsgrad G3;
ER neg = Östrogenrezeptorstatus negativ

3.6 P53 – Immunhistochemie

181 Tumore konnten bezüglich der Expression von p53 bewertet werden. Davon zeigten 114 (63%) eine Zellkernfärbung. Der Median der Färberate betrug 5% bei einer Spannweite von 100% bis 0%. Waren mehr als 5% der Zellkerne gefärbt, wurde eine Positivität für p53 angenommen. Dies war bei 61 Tumoren (33,7%) der Fall. Neben einer Korrelation zu HER2, Topoisomerase II α und zu Ki-67, konnte nur eine Korrelation zu Östrogenrezeptor-Negativität (p=.03), aber nicht zu anderen histologischen Faktoren oder zum Knochenmarkstatus festgestellt werden (siehe Tabelle 7).

χ^2, p	pT (>2cm)	LK Pos	G3	ER neg	Lymph-angiosis	Häm-angiosis
P53	.44	.45	.17	.03	.098	.39

Tabelle 7: statistische Korrelation von p53-Positivität mit den übrigen untersuchten Faktoren
pT = Tumorgroße; LK pos = Lymphknotenmetastasen; G3 = histologischer Malignitätsgrad G3;
ER neg = Östrogenrezeptorstatus negativ

Die Korrelationen zwischen allen Faktoren sind in Tabelle 8 dargestellt:

χ^2, p	T	LN pos	G3	ER	LA	HA	KM	HER2 IHC	HER2 FISH	Topo	Ki-67	P53
T	/	<.001	<.001	.50	<.001	.053	.063	.50	.31	.09	.61	.44
LN pos	<.001	/	.001	<.001	<.001	<.001	.29	.47	.17	.16	.17	.45
G3	<.001	.001	/	.10	.001	.90	.65	.11	.8	.71	.80	.17
ER	.50	<.001	.10	/	<.001	<.001	.85	.29	.12	.026	.034	.03
LA	<.001	<.001	.001	<.001	/	<.001	.38	.64	.57	.441	.36	.98
HA	.053	<.001	.90	<.001	<.001	/	.58	.01	.66	.89	.87	.39
KM	.063	.29	.65	.85	.38	.58	/	.82	.063	.47	.86	.67
HER2 IHC	.50	.47	.11	.29	.64	.01	.82	/	<.001	.06	.031	<.001
HER2 FISH	.31	.17	.80	.12	.57	.66	.063	<.001	/	.45	.55	.35
Topo	.09	.16	.71	.026	.441	.89	.47	.06	.45	/	.002	<.001
Ki-67	.61	.17	.80	.034	.36	.87	.86	.031	.55	.002	/	.004
P53	.44	.45	.17	.03	.98	.39	.67	<.001	.35	<.001	.004	/

Tabelle 8: Statistische Korrelation der untersuchten Faktoren untereinander.

Abkürzungen: T = Tumorgröße; LN pos = Lymphknotenmetastasen; G3 = histologischer Malignitätsgrad 3; ER = Östrogenrezeptorstatus; LA = Lymphangiosis carcinomatosa; HA = Hämangiosis carcinomatosa; KM = disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar; Topo = Topoisomerase II α

3.7 Prognosefaktoren und krankheitsfreies Überleben

Der Median der Beobachtungszeit aller Patientinnen betrug 60,5 Monate mit einer Spannweite von 7 bis 255 Monaten. Patientinnen, bei denen ein Tumorrezidiv, Metastasen oder tumorassoziierter Tod in den ersten 6 Monaten nach Knochenmarksaspiration auftraten, wurden aus der Analyse des Krankheitsverlaufs ausgeschlossen (n=8). Von den verbleibenden 257

Patientinnen erlitten 88 (34%) ein Tumorrezidiv, 70 (27%) entwickelten Fernmetastasen, 18 Patientinnen bekamen ein Lokalrezidiv und 26 sowohl ein Lokalrezidiv als auch Fernmetastasen. Wie erwartet waren Tumorgröße >2cm ($p<.001$), Befall von Lymphknoten ($p<.001$), Grading (G3, $p=.006$), Lymphangiosis ($p<.001$) und Hämangiosis ($p<.001$) signifikante Indikatoren eines kürzeren krankheitsfreien Überlebens. Dies trifft nicht zu für Östrogenrezeptorstatus ($p<.52$) oder disseminierte Tumorzellen im Knochenmark ($p<.36$).

Von allen untersuchten Färbungen zeigte eine HER2-Positivität sowohl in der IHC- ($p<=.04$) als auch in der FISH-Analyse ($p=.03$) signifikant ein kürzeres krankheitsfreies Überleben an. Dies ist in Abbildung 13 dargestellt:

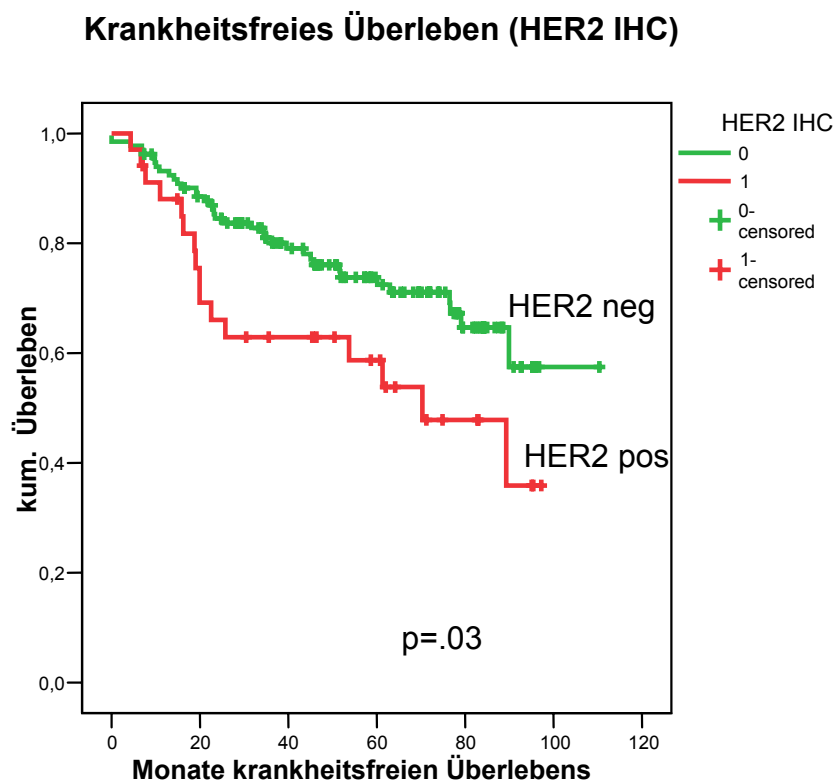


Abbildung 13: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit von HER2 IHC

Auch die Expression von Ki-67 war signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben ($p=.04$) verbunden.

Weder der Nachweis einer Topoisomerase II α -Überexpression ($p=.58$)

/Amplifikation noch eine p53-Positivität ($p=.23$) waren signifikante Indikatoren eines kürzeren krankheitsfreien Überlebens.

Die Patientinnen konnten bezüglich der erhaltenen adjuvanten Therapie in Untergruppen eingeteilt werden. Weder bei denjenigen, welche eine Chemotherapie erhalten hatten, noch bei denen, die antihormonell behandelt worden waren, konnte einer der untersuchten Faktoren eine kürzeres krankheitsfreies Überleben signifikant vorhersagen. Anders war es bei der Gruppe von Patientinnen, die überhaupt keine adjuvante Therapie erhalten hatten ($n=138$): Wieder waren eine HER2-Positivität sowohl in der IHC ($p<.001$) als auch in der FISH-Färbung ($p=.003$) und eine Ki-67-Positivität ($p=.008$) signifikante prognostische Faktoren für ein kürzeres krankheitsfreies Überleben.

Bei multivariater Analyse (Cox-Regression) waren nur Tumorgröße ($p=.001$) und Lymphangiosis ($p=.003$) unabhängige prognostische Faktoren für ein kürzeres krankheitsfreies Überleben mit einem relativen Risiko für ein Tumorrezidiv von 2,2 und 2,1.

3.8 Prognosefaktoren und metastasenfreie Überlebenszeit

70 der 257 Patientinnen entwickelten während der Beobachtungszeit Fernmetastasen. Wieder konnten Tumorgröße ($p<.001$), Befall von Lymphknoten ($p<.001$), histologisches Grading 3 ($p<.003$), Lymphangiosis ($p<.001$) und Hämangiosis ($p<.001$) die spätere Entwicklung von Fernmetastasen signifikant vorhersagen. Der Östrogenrezeptorstatus zeigt sich in dieser Hinsicht nicht als prognostischer Faktor ($p<.57$). Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wies einen Trend zu einer kürzeren metastasenfreien Überlebenszeit auf ($p<.09$), allerdings ohne Signifikanz in dieser Patientenpopulation. Von den untersuchten biologischen Faktoren lag der Nachweis einer HER2-Überexpression in IHC- ($p<.06$) und in FISH-Färbung ($p<.05$) an der Grenze zur Signifikanz. Der

immunohistochemische Nachweis einer Ki-67-Expression zeigte wiederum einen Trend zu einer kürzeren metastasenfreien Überlebenszeit ($p < .09$).

Betrachtete man die Untergruppe der Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten hatten, stellte man fest, dass keiner der untersuchten Faktoren eine signifikante Aussage bezüglich der Dauer des metastasenfreien Überlebens machen konnte. Bei Patientinnen, die mit einer antihormonellen Therapie behandelt worden waren, konnte die Überexpression von p53 ein kürzeres metastasenfreies Überleben vorhersagen ($p < .023$).

In der Gruppe von Patientinnen ohne adjuvante Therapie konnten wieder eine Positivität von HER2 in der IHC- ($p < .003$) und in der FISH-Analyse ($p < .001$) sowie ein Expressionsnachweis von Ki-67 ($p < .02$) ein kürzeres metastasenfreies Überleben signifikant vorhersagen.

In der multivariaten Analyse sagten nur Tumorgröße ($p < .003$) und Lymphangiosis ($p < .001$) ein kürzeres metastasenfreies Überleben unabhängig voraus. Das relative Risiko für die Entwicklung von Fernmetastasen betrug dabei 2,2 und 2,7.

3.9 Prognosefaktoren und Gesamtüberleben

Während der Beobachtungszeit starben 55 Patientinnen (21,4%) an den Folgen ihres Mammakarzinoms. Wie erwartet sagten die Tumorgröße ($>2\text{cm}$), der Befall von Lymphknoten, das Grading von 3, eine Lymphangiosis und eine Hämangiosis ein kürzeres Gesamtüberleben voraus (p jeweils $< .001$). Auch der Nachweis disseminierte Tumorzellen im Knochenmark war diesmal ein signifikanter Faktor zur Vorhersage eines kürzeren Gesamtüberlebens ($p = .03$). Dies ist in folgender Abbildung 14 dargestellt:

Gesamtüberleben (Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark)

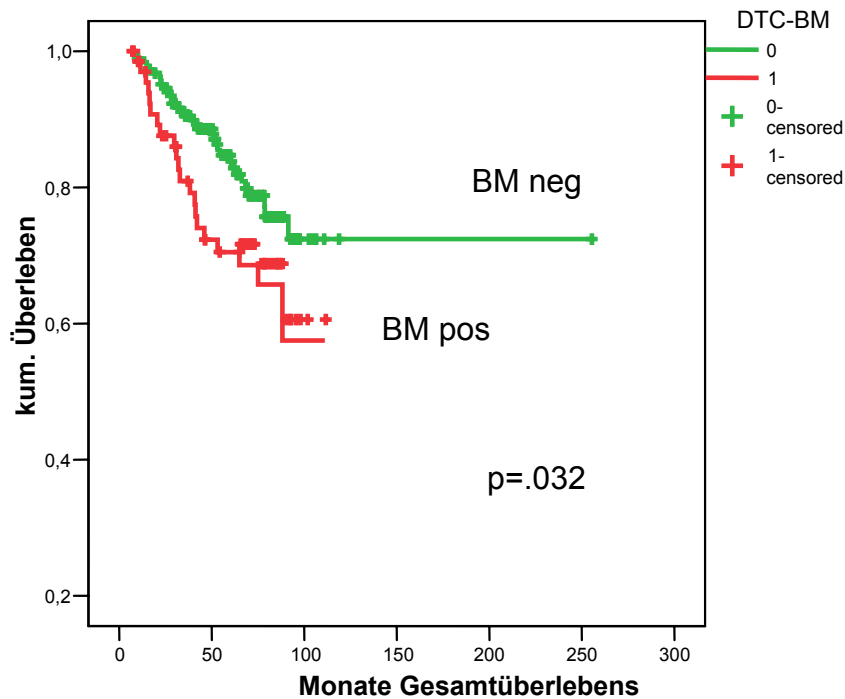


Abbildung 14: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus (Kaplan-Meier Analyse, log-rank-Test)

34 von 188 (18 %) Patientinnen ohne Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark starben Tumor bedingt, während es 21 von 69 Patienten (30,4 %) mit positiven Knochenmarkstatus waren. Von den 55 verstorbenen Patienten wiesen 21 (38 %) disseminierte Tumorzellen im Knochenmark auf, aber nur 48 von den 202 (24 %) lebenden Patientinnen.

HER2, Topoisomerase II α , Ki-67 oder p53 konnten bezüglich der Dauer des Gesamtüberlebens keine signifikante Aussage machen.

Betrachtet man die Untergruppen der Patientinnen, war der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark bei denen, die antihormonell behandelt worden waren, von Signifikanz ($p=.04$). Eine Positivität von HER2 in der IHC- ($p=.04$) und FISH-Färbung ($p=.01$) dagegen konnte Patientinnen ohne adjuvante Therapie ein kürzeres Gesamtüberleben ($n=138$) vorhersagen. Bei

Patientinnen, die eine Chemotherapie erhalten hatten, erreichte keiner der Faktoren das Signifikanzniveau. Die prognostische Signifikanz aller untersuchten Faktoren bezüglich des Gesamtüberlebens, krankheitsfreien Überlebens und metastasenfremen Überlebens sind in Tabelle 9 aufgelistet:

	KM	HER2 (IHC)	HER2 (FISH)	Top II α (IHC)	Top II α (FISH)	Ki-67	P53
Gesamtüberleben	.03	n. s.*	n. s.*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Krankheitsfreies Überleben	n. s.	.03	.04	n. s.	n. s.	.07*	n. s.
Metastasenfremes Überleben	.09	.06*	.05*	n. s.	n. s.	.09*	n. s.

Tabelle 9: Prognostische Signifikanz der untersuchten Faktoren für Gesamtüberleben, krankheitsfreies Überleben und metastasenfremes Überleben (univariate Analyse, log-rank-Test)

* Signifikanz in der Untergruppe von Patienten ohne adjuvante Therapie (n=138)

In der multivariaten Analyse stellten wieder Tumorgröße und Lymphangiosis unabhängige prognostische Faktoren bezüglich des Gesamtüberlebens (p jeweils $<.001$) dar mit einem relativen Risiko eines tumorassoziierten Todes von 3,8 und 2,9.

4 Diskussion

Systemische zytotoxische oder antihormonelle Therapien werden inzwischen in allen Stadien einer Brustkrebserkrankung eingesetzt (13). Dabei ist es von großer Wichtigkeit, zu entscheiden, welche Patienten wann und mit welchen Medikamenten am meisten von einer systemischen Therapie profitieren. Die erheblichen Nebenwirkungen einer systemischen Therapie sind gegen ihren Nutzen im Sinne einer Verhinderung eines Tumorrezidivs abzuwägen. Deshalb gibt es Bemühungen, Faktoren zu definieren, mit deren Hilfe diese Entscheidungen erleichtert werden, und mit denen es möglich sein könnte, für jeden Patienten einen individuellen Therapieplan zu erstellen. Für derartige potentielle individuelle Therapiepläne wurden 5 biologische Faktoren bei 265 Mammakarzinomen von 265 Patientinnen analysiert.

4.1 Methodenkritik

Limitationen dieser Analyse und deren Ergebnissen sind durch einige methodische Faktoren bedingt, die hier kritisch aufgeführt werden sollen:

1. Die Gewebeproben konnten nicht von allen 265 Mammakarzinomen für alle untersuchten Faktoren berücksichtigt werden. Die differierende Anzahl von Untersuchungen bei unterschiedlichen Faktoren erklärt sich durch die jeweils erzielbare Anzahl auswertbarer Anfärbungen.

Ein Problem bei der Färbung war vor allem die relativ schlechtere Qualität einiger älterer Gewebeproben, sodass sich die Anzahl der evaluierbaren Fälle um bis zu 30% reduzierte. In vielen vergleichbaren Studien wurden die Gewebeproben ebenfalls über Jahre konserviert (3;5;28;35;57;70;76;77).

Dennoch schlossen wir die älteren Gewebeproben in unsere Untersuchung ein, weil wir dadurch längere Krankheitsverläufe beobachten und bewerten konnten.

2. Die Gewebeproben der Tumoren könnten potentiell nicht genügend repräsentativ sein. Die Färbung und Hybridisierung wurde an *tissue micro arrays* (TMAs) der Primärtumore durchgeführt. Zur Kontrolle des Tumorgewebes wurden die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten TMAs von einem Pathologen jeweils bestätigt. Wie bei jeder Stanzbiopsie könnte die Aussagekraft der TMAs dadurch limitiert sein, dass die relativ kleinen Gewebeproben nicht für den gesamten Tumor repräsentativ sein könnten. Wir gingen für die Auswertung dennoch davon aus, dass die Expressionsrate der untersuchten Faktoren mit der von konventionellen Gewebeproben verglichen werden kann.

3. Die Methodik der Immunhistochemie ist bei der gegebenen Fragestellung nicht genau standardisiert. Jede Immunhistochemie birgt grundsätzliche Probleme durch verschiedene Färbeprotokolle, verwendete Antikörper und potentiell verschiedene Interpretationsmöglichkeiten. Grundsätzlich bleibt bei jeder Auswertung einer Immunhistochemie trotz definierter Kriterien eine gewisse Subjektivität, die von Untersucher zu Untersucher variieren kann (19;23;68).

Für den immunhistochemischen Nachweis von HER2 zum Beispiel existieren verschiedene mono- und polyklonale Antikörper (74). Lebeau et al. untersuchten Brustkrebsgewebe auf eine HER2-Überexprimierung mit fünf verschiedenen monoklonalen und zwei polyklonalen Antikörpern. Unter den monoklonalen Antikörpern befand sich auch der von uns verwendete Antikörper CB11. Der Prozentsatz der HER2-positiven Tumoren war unter Verwendung der verschiedenen monoklonalen Antikörper nahezu derselbe (26%-27%). Dagegen lag der Prozentsatz unter Verwendung der polyklonalen Antikörper zwischen 33% und 42%. Diese unterschiedlichen Ergebnisse eines einzigen Labors zeigen, wie wichtig es ist, die technischen Details der Immunhistochemie in Zukunft genauer zu definieren (68).

Bei jeder immunhistochemischen Färbung spielt der so genannte *cut-off-point* eine große Rolle. Für die meisten Marker gibt es keine einheitliche Definition eines solchen Punktes, also eines bestimmten Prozentsatzes gefärbter Zellen oder einer bestimmten Farbintensität, ab der ein Tumor als positiv für den Marker angesehen wird. Für die Bewertung von p53 zum Beispiel werden in

verschiedenen Studien unterschiedliche *cut-off-points* angenommen: ab einer Färbung von mindestens 5% der Zellkerne nehmen Silvestrini et al. eine Positivität für p53 an (100). Isola et al. oder Railo et al. bestimmen dagegen eine Färbung von >20% zu ihrem *cut-off-point* (57;88). Weitere Kriterien zur Bestimmung eines *cut-off-points* können die Intensität der Färbung wie bei Allred et al. (3) oder die Analyse der Daten als kontinuierliche Variable, wie von Ferrero et al. durchgeführt (36), sein. MacGrogan et al. oder Degeorges et al. ermitteln den Median aller Ergebnisse in Prozent und nehmen eine Dichotomisierung entsprechend dieses Wertes vor (27;70).

Wir entschieden uns ebenfalls dazu, den *cut-off-point* nach dem Median zu bestimmen. Diese Methode ermöglicht nach unserer Beobachtung einen präziser definierten *cut-off-point*.

Grundsätzlich bleibt die Problematik, dass die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Festlegung des *cut-off-points* die Vergleichbarkeit von sonst ähnlichen Studien erschwert.

4. Präziser als die Immunhistochemie wird die direkte DNA-basierte Technologie angesehen, wie die DNA-Sequenzierung oder die Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Mit der FISH kann eine Genamplifikation mit einer Sensitivität von 95,5% und einer Spezifität von 100% nachgewiesen werden (19). Nachteile der FISH sind der größere technische Aufwand und die höheren Kosten verglichen mit der Immunhistochemie (68). Dennoch hat die FISH inhärente Probleme, die eine Aussagekräftigkeit beeinträchtigen oder verhindern kann: Es gibt Patientinnen, deren Karzinome bestimmte Proteine wie HER2 überexprimieren ohne dass eine Genamplifikation vorliegt. Es ist unklar, ob FISH solche Patientinnen identifizieren kann (21;106). Dennoch wurde für diese Analyse die FISH-Technologie angewandt, weil hierdurch zusätzliche Informationen erhalten werden konnten.

5. Möglicherweise ist eine neue, bessere Methode, den Tumor eines jeden individuellen Patienten zu charakterisieren, die Genanalyse. Serienanalyse von tausenden Genen sowie *DNA microarrays* könnten in Zukunft die Eigenschaften eines Tumors genauer bestimmen und so die Prognose und ein Ansprechen

auf bestimmte Therapien abschätzen (1;108;117). Dieses Verfahren wurde bewusst aus dieser Analyse ausgeklammert.

Unter Berücksichtigung dieser Methodenkritik der vorliegenden Untersuchungen sollen im Folgenden die einzelnen Ergebnisse diskutiert werden:

4.2 Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark

Die Prävalenz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark variiert in verschiedenen Studien zwischen 12% und 42% (13;14;41;43;78;85;118). Bei einer Zusammenfassung mehrerer Studien, bei der 4703 Patientinnen eingeschlossen werden konnten, lag die Prävalenz bei 30,6% (14). Somit liegt die Prävalenz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark in unserer Studie mit 25,5% etwas niedriger.

Oft wurde versucht, die prognostische Bedeutung von disseminierten Zellen im Knochenmark zu evaluieren. Nach bisherigen publizierten Daten stellt der Knochenmarksstatus keinen so starken Prognosefaktor wie etwa der Lymphknotenstatus oder die Tumorgröße dar. Die Ergebnisse verschiedener Studien sind uneinheitlich: Gebhauer et al. konnten zum Beispiel signifikante Unterschiede bezüglich eines krankheitsfreien oder Gesamtüberlebens zwischen Knochenmark-negativen und Knochenmark-positiven Patientinnen nur bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen feststellen (41). Braun et al. dagegen zeigten, dass ein Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark unabhängig vom Lymphknotenstatus mit einem geringeren Gesamtüberleben signifikant assoziiert ist (13). Wir können in unserer Studie den Knochenmarkstatus nicht als unabhängigen Prognosefaktor bewerten. Es zeigt sich in unserer Studie lediglich ein Trend, dass Patientinnen mit einer Tumorgröße von über 2cm und mit HER2-FISH-positivem Tumor ein höheres Risiko disseminierter Tumorzellen im Knochenmark aufweisen. Naume et al. konnten in ihrer Studie ebenfalls keine prognostische Aussage machen, wohl aber eine Korrelation von disseminierten Zellen im Knochenmark mit dem

Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus, dem Hormonrezeptorstatus und dem HER2-Status feststellen (78). Insgesamt sind also die Ergebnisse einzelner Studien unterschiedlich (10;11;41;43;78;85;118). Dennoch konnte die prognostische Signifikanz von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in einer großen gepoolten Analyse bestätigt werden (14;41;43;118).

Gründe für variierende Zahlen bezüglich der Prävalenz und der Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark als Prognosefaktor sind unklar. Womöglich spielen aber Unterschiede bezüglich der Patientencharakteristika und der Immunoassays, mit denen die Mikrometastasen detektiert werden, auch eine Rolle (14). Zudem können bei einer Knochenmarkspunktion natürlich nur geringe Mengen gewonnen werden. Der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark wird in der Routinediagnostik daher aus gutem Grund bisher nicht durchgeführt (59). Wohl aber könnte er in Zukunft eine Rolle bei der Stadieneinteilung des Karzinoms, bei der Therapieauswahl oder bei der langfristigen Therapieüberwachung spielen (58).

In den bisher genannten Studien wurde der Knochenmarkstatus zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bestimmt. Neuere Studien untersuchen die Bedeutung der Persistenz von Tumorzellen im Knochenmark einige Jahre nach der Erstdiagnose und zeigen bei Nachweise von Tumorzellen zu diesem Zeitpunkt ein erhöhtes Rezidivrisiko. Der Nutzen einer zusätzlichen adjuvanten Therapie bei persistierenden Tumorzellen im Knochenmark muss aber in weiteren Studien evaluiert werden (59;119).

4.3 Bedeutung von p53

Bei Mammakarzinomen liegt in der Regel bei 20% bis 40% eine Mutation des p53-Gens vor (3;9;15). In unserem Kollektiv zeigen 63% eine Expression des mutierten p53-Proteins.

Ein Grund für diese Diskrepanz könnte die vorher erwähnte methodische Problematik der Immunhistochemie darstellen: Nach unserer Untersuchungsmethodik nahmen wir das Vorliegen einer Mutation im p53-Gen

an, wenn sich mindestens 5% der Zellen anfärben. Es bestehen Auseinandersetzungen darüber, welches die beste Methode ist, um den p53-Status zu bestimmen. Gerade zur immunhistochemischen Auswertung gibt es keinen „Goldstandard“ der zu verwendenden Antikörper, der Färbung und der *Cut-offs* der erzielten Ergebnisse. Molekulare Methoden wie die DNA-Sequenzierung scheinen der Immunhistochemie überlegen zu sein (34;66;80;104) Sjögren et al. fanden heraus, dass die Immunhistochemie sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse eines p53-Status liefere. Falsch-negative Ergebnisse für das Vorliegen einer p53-Mutation könnten dadurch verursacht werden, dass verfrühte Stop-Codons oder starke Deletionen im p53-Gen dazu führen, dass das mutierte Genprodukt durch den Antikörper nicht mehr erkannt wird. Sie schlossen daraus, dass man bezüglich des p53-Status mit Hilfe der DNA-Analyse bessere prognostische Informationen erhalte als mit der Immunhistochemie (104).

Unser Ziel war jedoch nicht allein, die Prävalenz darzustellen, sondern das Verhältnis von Mutationen von p53 zu anderen Prognosefaktoren und zur Gesamtprognose zu untersuchen: Hier ergibt sich eine signifikante Korrelation von p53-Positivität zu Ki-67, HER2, Topoisomerase II α und Östrogenrezeptor-Negativität. Eine Korrelation zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark besteht nicht. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen überein (76;103). Dagegen kann eine Mutation im p53-Gen in unserer Untersuchung keine prognostische Aussage zum krankheitsfreien Überleben, zum metastasenfremen Überleben oder zum Gesamtüberleben machen. Die einzige Signifikanz besteht in einem kürzeren metastasenfremen Überleben bei Patienten, die eine antihormonelle Therapie erhielten. Dies widerspricht Ergebnissen anderer Autoren (39;76;87). Molina et al. zeigten anhand einer Untersuchung von 655 Patientinnen, dass eine p53-Mutation zwar signifikant mit einem verkürzten krankheitsfreien Überleben korreliert, aber dennoch keinen unabhängigen Prognosefaktor darstellt (75). Auch Frerrero et al. stellten in ihrer Untersuchung von 297 Lymphknoten-negativen Patientinnen eine prognostische Aussagekraft von p53 fest. Diese sei jedoch schwächer als die der klassischen Prognosefaktoren (36). Allred et al.

dagegen berichten, dass p53 ein unabhängiger Prognosefaktor sei, allerdings nur bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (3;75).

Aufgrund dieser uneinheitlichen Bedeutung von p53 spielt deren Nachweis derzeit in der Routinediagnostik begründet keine Rolle.

4.4 Bedeutung von Ki-67

Das Protein Ki-67 ist in allen sich teilenden Zellen zu finden und dient somit der Bestimmung der Wachstumsrate einer Zellpopulation. Wir untersuchten, inwieweit ein erhöhter Proliferationsindex mit anderen biologischen Tumorfaktoren und mit dem Krankheitsverlauf korreliert.

Die immunhistochemische Färbung für Ki-67 erwies sich in unserer Untersuchung in 28,3% Fällen als positiv. Damit liegen unsere Ergebnisse bezüglich der Prävalenz von Ki-67 im Bereich ähnlicher Studien (90;115;115).

Es zeigt sich eine signifikante Korrelation zu den anderen untersuchten biologischen Faktoren sowie zum Östrogenrezeptorstatus. Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark besteht nach unseren Untersuchungen kein Zusammenhang. Es gibt nur eine weitere Studie, die ebenfalls die Korrelation von Ki-67 und disseminierten Tumorzellen im Knochenmark untersucht: Im Gegensatz zu unseren Befunden konnten Fehm et al. zeigen, dass ein erhöhter Proliferationsindex von Ki-67 das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant vorhersagen kann (35).

Bezüglich der prognostischen Relevanz von Ki-67 existieren unterschiedliche Ergebnisse: Rudolph et al. untersuchten die prognostische Relevanz von Ki-67 anhand von 942 Mammakarzinomen. In seiner univariaten Analyse konnte Ki-67 ein kürzeres Gesamt- und metastasenfreies Überleben vorhersagen. Eine unabhängige prognostische Relevanz zeigte sich nur, wenn Ki-67 als kontinuierliche Variable betrachtet wurde. Harbeck et al. untersuchten nur Mammakarzinome nodal-negativer Patientinnen. Sie konnten in der univariaten, nicht aber in der multivariaten Analyse eine prognostische Aussagekraft von Ki-67 feststellen (47).

In unserer Untersuchung stellt sich Ki-67 in der multivariaten Analyse ebenfalls nicht als unabhängiger prognostischer Faktor heraus. Wohl aber zeigte sich ein Trend zu kürzerem krankheitsfreiem Überleben und kürzerem metastasenfreiem Überleben. Betrachtet man die Untergruppen der Patienten, so haben die Patienten mit Ki-67-positiven Tumoren, die keinerlei adjuvante Therapie erhielten, ein signifikant kürzeres krankheitsfreies und metastasenfreies Überleben. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse vieler anderer Studien (47;62;115). Seshadri et al. und Railo et al. konnten bei 411 bzw. 212 Patientinnen, die ebenfalls keinerlei systemische Therapie erhalten hatten, ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben bzw. krankheitsfreies Überleben sogar in der multivariaten Analyse bestätigen (88;99).

Es existieren weitere Studien, die eine signifikante und unabhängige Korrelation von Ki67 mit dem klinischen Verlauf in der multivariaten Analyse nachweisen konnten (22;30;60;63;110;111). Da diese aber nur einen Evidenzgrad III oder IV aufweisen, bleibt der prognostische Wert von Ki-67 weiterhin ungeklärt (23). Neben der Heterogenität der Patientenpopulationen könnte auch die fehlende Standardisierung der Immunhistochemie die Vergleichbarkeit der Studien erschweren. Es existieren verschiedene Antikörper, um mithilfe von Ki-67 die Proliferationsrate eines Tumors zu bestimmen: der häufig verwendete monoklonale Antikörper Ki-67 kann nur bei frischem oder gefrorenem Gewebe angewandt werden (23). Der von uns verwendete monoklonale Antikörper MIB1 ist auch für paraffinierte Gewebe geeignet. MIB1 scheint anderen Ki67-Antikörpern überlegen zu sein: er ist zum einen einfach in seiner Anwendung, zum anderen zeigt er eine gute Korrelation zur Expression von Ki-67 auf gefrorenen Gewebeproben (111;115). Ki-67 wird in der Routinediagnostik häufig bestimmt. Allerdings zählt Ki-67 wegen der fehlenden international standardisierten Nachweismethode und der nicht gesicherten Relevanz nicht zu den etablierten Prognosefaktoren (23). Insgesamt weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Ki-67 als potentieller Prognosefaktor weiter untersucht werden sollte, da er eventuell in Kombination mit anderen klinischen, pathologischen und biologischen Parametern in Zukunft in ein neues Klassifikations-System eingehen könnte (111), auch wenn seine Unabhängigkeit als Prognosefaktor derzeit noch nicht geklärt ist.

4.5 Bedeutung der Topoisomerase

Topoisomerase II α ist ein Schlüsselenzym der DNA-Replikation, das die Topologie der DNA-Stränge zu verändern vermag und in allen Zellen vorhanden ist. Ihre Konzentration ist in exponentiell wachsenden Zelllinien wesentlich höher und gilt somit auch als Kennzeichen einer Zellproliferation (54). Eine prognostische Relevanz erhöhter Konzentrationen von Topoisomerase II α konnte nur in wenigen Studien nachgewiesen werden: Depowski et al. konnten anhand einer Untersuchung von 184 Mammakarzinomen zeigen, dass eine Überexpression von Topoisomerase II α mit einem kürzeren Gesamtüberleben, einem höheren Tumorstadium und einem häufigeren Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert. Diese Korrelation konnten sie aber nur in der univariaten und nicht in der multivariaten Analyse feststellen (28). Auch Fritz et al. konnten nur Hinweise auf eine prognostische Relevanz von Topoisomerase II α liefern (40). In unserer Untersuchung stellte sich ebenfalls heraus, dass eine Überexpression von Topoisomerase II α keine prognostische Aussagekraft besitzt. Von prognostischem Wert auch in der multivariaten Analyse war Topoisomerase II α nur in zwei Studien von Rudolph et al. (90;91). Es müssten größere prospektive Studien mit standardisierten Methoden durchgeführt werden, um die klinische Relevanz von Topoisomerase II α als prognostischen Faktor zu bewerten. Wichtiger als der prognostische Wert von Topoisomerase II α scheint ihr prädiktiver Wert zu sein. Topoisomerase II α ist ein wichtiges Enzym für das *DNA-decoiling*, für die Chromosomen-Segregation während der Anaphase des Zellzyklus und für die DNA-Replikation (25). Diese Vorgänge werden durch Anthrazykline als Topoisomerase II α -Inhibitoren gehemmt. Daher nimmt man an, dass eine Überexpression von Topoisomerase II α eine prädiktive Aussage bezüglich der Effektivität einer Therapie mit Anthrazyklinen machen kann. (4).. Eine Korrelation zwischen Topoisomerase II α -Konzentration und Chemosensitivität konnte von Harris et al. in vitro gezeigt werden (48). In einigen klinischen Studien wurde diese Korrelation bestätigt (29;32;61;71;92). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Schindlbeck et al. zeigte, dass

Patienten, deren Mammakarzinome Topoisomerase II α positiv waren und die mit Anthrazyklinen behandelt waren, einen Trend zu einem längeren krankheitsfreien Überleben und zu einer Reduktion der disseminierten Zellen im Knochenmark aufweisen (92). Durbecq et al. und MacGrogan et al. fanden heraus, dass eine erhöhte Konzentration von Topoisomerase II α und ein Ansprechen der Therapie nicht für alle Arten von Anthrazyklin-basierten Therapien gelten: Wurden Topoisomerase II α -positive Patientinnen mit Doxorubicin bzw. Epirubicin behandelt, so war der Therapieerfolg erhöht. Erhielten solche Patientinnen Docetaxel, bestand kein Zusammenhang zwischen dem Therapieerfolg und einer Überexpression von Topoisomerase II α (32;71). In unserem relativ kleinen Patientenkollektiv konnte eine prädiktive Relevanz von Topoisomerase II α nicht gezeigt werden. Insgesamt hat der Nachweis einer Überexpression von Topoisomerase II α als potentieller Prognosefaktor keine klinische Bedeutung. Als prädiktiver Faktor jedoch scheint er nach den diskutierten Arbeiten trotz unserer negativen Ergebnisse hierzu viel versprechend zu sein und sollte weiter untersucht werden.

4.6 Bedeutung von HER2

Der mit Sicherheit bekannteste biologische Faktor beim Mammakarzinom ist HER2. Mit der hier gezeigten Positivitätsrate von 21% in der immunhistochemischen und 24,3% in der FISH-Färbung liegen wir im Bereich dessen, was bereits in früheren Studien herausgefunden wurde (5;68). Wie erwartet besteht eine starke Korrelation zwischen der Amplifikation des HER2-Gens und der Proteinexpression des HER2-Proteins. Allerdings zeigten nur 66,7% der Tumoren, die bei der immunhistochemischen Färbung mit 3+ beurteilt wurden, auch in der FISH-Färbung eine HER2-Amplifikation. Dies ist ein eher geringer Prozentsatz verglichen mit anderen Studien (33;68;81;81;81;81). Lebeau et al. und Dybdal et al. untersuchten, ob die FISH zusätzliche Informationen zur Immunhistochemie liefere. Sie konnten zeigen, dass eine sehr starke, gar keine oder nur geringe Positivität von HER2 in der

Immunhistochemie (0, 1+, 3+) immer mit einer Genamplifizierung in der FISH assoziiert ist, nicht jedoch eine mäßige Anfärbung, die mit 2+ bewertet wurde. Somit liefert die FISH keine zusätzliche Information bei Tumoren, die mit 0, 1+ oder 3+ gewertet wurden (68). Wohl aber könnte sie hilfreich sein, um bei den Tumoren, die sich in der Immunhistochemie nur schwach anfärben (2+), zwischen Gruppen hohen und niedrigen Risikos zu unterscheiden (19). Es besteht keine Korrelation zwischen der HER2-Positivität in der Immunhistochemie und dem Vorliegen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Dies bestätigt frühere Ergebnisse von Schindlbeck et al. (93). Eine Amplifikation des HER2-Gens in der Fluoreszenz in situ Hybridisierung zeigte allerdings doch einen Trend zu Knochenmarks-Positivität. Auch Naume et al konnten bei HER2-positiven Mammakarzinomen häufiger disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisen (78). Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet besteht eine rege Diskussion bezüglich der prognostischen Aussagekraft von HER2 (74;83). In unserem Kollektiv ist eine HER2-Positivität ein signifikanter prognostischer Faktor für ein kürzeres metastasenfreies und krankheitsfreies Überleben. Dies trifft besonders auf diejenigen Patienten zu, die keine adjuvante Therapie erhielten. In dieser Untergruppe konnte HER2 auch ein kürzeres Gesamtüberleben vorhersagen.

Ähnlich wie Topoisomerase II α ist HER2 eher ein prädiktiver Faktor bezüglich des Ansprechens auf verschiedene Chemotherapien. Dies gilt vor allem bei einer Therapie mit Trastuzumab, dem monoklonalen Antikörper gegen HER2, (6;123). Außerdem fanden Di Leo et al heraus, dass in der Untergruppe der HER2-positiven Tumoren eine Therapie mit Anthrazyklinen am besten wirke. Die Effektivität von Anthrazyklinen war sogar noch größer, wenn die Tumore zudem noch eine Amplifikation von Topoisomerase II α aufwiesen. So stellten sie die Hypothese auf, dass der scheinbar prädiktive Wert von HER2 auf einer gleichzeitigen Amplifikation von Topoisomerase II α begründet ist, da die beiden Gene auf demselben Arm des Chromosoms 17 lokalisiert sind (29). Auch in unserem Kollektiv betrug die Ko-Amplifikation von HER2 und Top IIA 63 %. Mit der Immunhistochemie oder der FISH kann nur der HER2-Status des Primärtumors bestimmt werden. Um auch nach der operativen Entfernung des Tumors ein Aussage über den HER2-Status machen zu können, wird zunehmend auch die Serumkonzentration von HER2 bestimmt (19;31). Einigen

Studien zeigen, dass auch die erhöhte Serumkonzentration von HER2 mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (2;7;19;75). Zudem kann die Serumkonzentration zur Überwachung einer Therapie mit Trastuzumab eingesetzt werden (19).

Der prädiktive Wert von HER2 wird in der Klinik bereits genutzt: die Diagnose einer HER2-Überexpression des Primärtumors sollte durch die FISH oder immunhistochemisch gestellt werden. Nach den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft sollte dann bei HER2-positiven Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom eine Therapie mit Trastuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie durchgeführt werden (64).

4.7 Schlussfolgerungen

Um die Ergebnisse der Untersuchungen zusammenzufassen, lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Das American Joint Committee on Cancer (AJCC) definiert einen Prognosefaktor als Marker, der unabhängig von anderen Faktoren eine Aussage über das Überleben oder das krankheitsfreie Überleben möglich macht (122). Somit entsprechen die untersuchten Faktoren p53, Topoisomerase II α , Ki67 und HER2 den oben beschriebenen Anforderungen nur zum Teil. In einigen Untergruppen von Patienten besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis bestimmter Faktoren und der Überlebenszeit: Betrachtet man alle Patienten, so zeigt nur HER2 eine signifikante Korrelation zu einem kürzeren krankheitsfreien und metastasenfrem Überleben. Sonst können Aussagen zum Überleben nur für Patientenuntergruppen gemacht werden: bei Patienten ohne adjuvante Therapie korrelierte HER2 mit einem kürzeren Gesamtüberleben und Ki67 mit einem kürzeren metastasen- und krankheitsfreien Überleben. In der Untergruppe der antihormonell behandelten Patienten stellte sich eine signifikante Korrelation von p53 zu einem kürzeren metastasenfrem Überleben heraus.

Der Nachweis einer signifikanten Korrelation ist kein ausreichendes Kriterium für das Vorliegen eines Prognosefaktors, da die Unabhängigkeit nicht gegeben ist. Die Unabhängigkeit sollte durch Multivarianzanalysen gesichert sein. In der multivariaten Analyse stellt sich keiner der von uns untersuchten Marker als unabhängiger prognostischer Faktor bezüglich eines kürzeren krankheitsfreien, metastasenfrieren oder Gesamtüberleben heraus.

Tumorgenese und Dissemination von Tumorzellen laufen in vielen kleinen Schritten ab, wobei viele Faktoren zusammenspielen. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass der prognostische Wert der untersuchten biologischen Faktoren eher in ihrer Kombination als einzeln betrachtet zum Tragen kommt. Dies konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (15;121).

Die Übereinstimmung der Expressionsraten der untersuchten biologischen Faktoren untereinander deutet auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Proliferationsmarkern, Suppressionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren hin. Eine hämatogene Aussaat von Tumorzellen scheint ein Vorgang unabhängig von den untersuchten Markern zu sein. Ins Knochenmark disseminierte Tumorzellen auf diese biologischen Faktoren zu untersuchen, ist Gegenstand der momentanen Forschung. Diese ins Knochenmark disseminierten Zellen sind eine heterogene Zellgruppe (95), die sich aber von den Zellen des Primärtumors unterscheiden. Da sich die disseminierten Zellen in einem Ruhezustand befinden, zeigen antimitotische Chemotherapien wenig Effekt (11;92). Auf Antikörpern basierende Therapien sind Gegenstand der momentanen Forschung und zeigen viel versprechende Ergebnisse. Eine Therapie gegen das EPCAM Oberflächenantigen zeigte gute Ergebnisse bezüglich der Reduktion von disseminierten Zellen im Knochenmark (10). Meng et al (73) bestimmten den HER2-Status von zirkulierenden Tumorzellen und zeigten erstaunliche Effekte einer Therapie mit Trastuzumab. Alle diese Studien weisen auf das Potential disseminierter Tumorzellen hin: als Kriterium, Patienten in verschiedene Untergruppen einzuteilen und als Ziel für maßgeschneiderte Therapien zu dienen. Neuere Entwicklungen wie der Nachweis zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut, welches selbstverständlich weitaus einfacher zu gewinnen ist als Knochenmark, auch mittels automatisierter Systeme, oder molekularbiologische Verfahren zum

Nachweis zirkulierender Tumor spezifischer Gene, zeigen bereits viel versprechende Ergebnisse (85). Dies sollte die Basis bilden für die weitere Forschung an der Detektion, Anreicherung und Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen.

5 Zusammenfassung

Die prognostische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von Patientinnen mit Brustkrebs konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden. Dennoch ist unklar, welche Charakteristika des Primärtumors eine hämatogene Tumorzell dissemination vorhersagen können. Daher untersuchten wir Gewebeproben von 265 primären Mammakarzinomen mit bekanntem Knochenmarkstatus auf die biologischen Faktoren HER2, Topoisomerase II α , Ki67 und p53. Zudem wurde die prognostische Relevanz der untersuchten biologischen Faktoren getestet.

Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark wurden mit Hilfe eines Antikörpers, der an Epitope von Zytokeratin bindet, detektiert. Die Gewebeproben der primären Mammakarzinome wurden mit Hilfe der immunhistochemische Färbung auf die Faktoren HER2, Topoisomerase II α , Ki67 und p53 untersucht sowie mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung auf HER2 und Topoisomerase II α .

HER2 zeigte eine Positivität in 35/167 (21%) Fällen in der IHC und in 39/160 (24,3%) in der FISH. Topoisomerase II α zeigte sich in 87/187 (46%) immunhistochemisch positiv (FISH 47 / 154, 30,5 %), Ki67 in 52/184 (28%) und p53 in 61/176 (34%). Bei 68 von 265 Patientinnen (25,7%) waren disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachweisbar. Keiner der untersuchten Faktoren konnte das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark signifikant vorhersagen. Eine signifikante Korrelation wurde zwischen HER2-IHC und Topoisomerase II α ($p=0,06$), Ki67 ($p=0,031$) und p53 ($p<0,001$) nachgewiesen. Topoisomerase II α korrelierte mit Ki67 und p53. Ki67 korrelierte mit p53 ($p=0,004$). Nach einer mittleren follow-up-Zeit von 60,5 Monaten zeigte sich der Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark von

prognostischer Relevanz bezüglich des Gesamtüberlebens ($p=0,03$). HER2 (IHC, $p=0,04$; FISH, $p=0,03$) und Ki67 ($p=0,04$) korrelierten mit dem krankheitsfreien Überleben und HER2 korrelierte mit dem metastasenfremen Überleben (IHC, $p=0,06$; FISH, $p=0,05$).

Die Übereinstimmung der Expressionsraten der untersuchten biologischen Faktoren weist auf einen kausalen Zusammenhang von Tumorsuppressormolekülen, Proliferationsmarkern und Wachstumsfaktor-Rezeptoren hin. Die hämatogene Tumorzellaussaat scheint ein von den auf dem Primärtumor untersuchten Faktoren unabhängiger Prozess zu sein. Die Untersuchung dieser biologischen Faktoren auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark sowie die bessere Detektion, Anreicherung und weiter Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen sind Gegenstand der momentanen Forschung.

6 Literaturverzeichnis

- (1) 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415(6871):530-536.
- (2) Ali SM, Leitzel K, Chinchilli VM, Engle L, Demers L, Harvey HA et al. Relationship of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. *Clin Chem* 2002; 48(8):1314-1320.
- (3) Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(3):200-206.
- (4) Barrett-Lee PJ. Growth factor signalling in clinical breast cancer and its impact on response to conventional therapies: a review of chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 Suppl 1:S125-33.:S125-S133.
- (5) Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P et al. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J Pathol* 2001; 195(4):422-428.
- (6) Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19(6):1865-1878.
- (7) Bewick M, Chadderton T, Conlon M, Lafrenie R, Morris D, Stewart D et al. Expression of C-erbB-2/HER-2 in patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous blood stem cell support. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24(4):377-384.
- (8) Borre M, Bentzen SM, Nerstrom B, Overgaard J. Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *J Urol* 1998; 159(5):1609-1614.
- (9) Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 2003; 21(3):292-300.
- (10) Braun S, Hepp F, Kantenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G et al. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999; 5(12):3999-4004.
- (11) Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F et al. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2000; 18(1):80-86.

- (12) Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(8):525-533.
- (13) Braun S, Vogl FD, Janni W, Marth C, Schlimok G, Pantel K. Evaluation of bone marrow in breast cancer patients: prediction of clinical outcome and response to therapy. *Breast* 2003; 12(6):397-404.
- (14) Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(8):793-802.
- (15) Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwage D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(1):86-96.
- (16) Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2001; 27(3):137-142.
- (17) Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1400(1-3):139-154.
- (18) Cardoso F, Piccart MJ. The best use of chemotherapy in the adjuvant setting. *Breast* 2003; 12(6):522-528.
- (19) Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem* 2003; 49(10):1579-1598.
- (20) Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63(1):181-187.
- (21) Ciocca DR, Fujimura FK, Tandon AK, Clark GM, Mark C, Lee-Chen GJ et al. Correlation of HER-2/neu amplification with expression and with other prognostic factors in 1103 breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(16):1279-1282.
- (22) Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A et al. The utility of mitotic index, oestrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25(4):356-363.
- (23) Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005; 16(11):1723-1739.
- (24) Corbett AH, Osheroff N. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem Res Toxicol* 1993; 6(5):585-597.

- (25) Cortes F, Pastor N, Mateos S, Dominguez I. Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. *Mutat Res* 2003; 543(1):59-66.
- (26) Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol* 1991; 9(10):1749-1756.
- (27) Degeorges A, de Roquancourt A, Extra JM, Espie M, Bourstyn E, de Cremoux P et al. Is p53 a protein that predicts the response to chemotherapy in node negative breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 1998; 47(1):47-55.
- (28) Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Mod Pathol* 2000; 13(5):542-547.
- (29) Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jarvinen T, Rouas G et al. HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2002; 8(5):1107-1116.
- (30) Domagala W, Markiewski M, Harezga B, Dukowicz A, Osborn M. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin Cancer Res* 1996; 2(1):147-154.
- (31) Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem* 2006; 52(3):345-351.
- (32) Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, Desmedt C, Di Leo A, Chan S et al. Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(10):1207-1214.
- (33) Dybdal N, Leiberman G, Anderson S, McCune B, Bajamonde A, Cohen RL et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 93(1):3-11.
- (34) Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 26(3):225-235.
- (35) Fehm T, Becker S, Pergola-Becker G, Kramer B, Gruber I, Sotlar K et al. Influence of tumor biological factors on tumor cell dissemination in primary breast cancer. *Anticancer Res* 2004; 24(6):4211-4216.

- (36) Ferrero JM, Ramaioli A, Formento JL, Francoual M, Etienne MC, Peyrottes I et al. P53 determination alongside classical prognostic factors in node-negative breast cancer: an evaluation at more than 10-year follow-up. *Ann Oncol* 2000; 11(4):393-397.
- (37) Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med* 2002; 347(8):567-575.
- (38) Fourquet A, Campana F, Zafrani B, Mosseri V, Vielh P, Durand JC et al. Prognostic factors of breast recurrence in the conservative management of early breast cancer: a 25-year follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17(4):719-725.
- (39) Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993; 72(12):3641-3647.
- (40) Fritz P, Cabrera CM, Dippon J, Gerteis A, Simon W, Aulitzky WE et al. c-erbB2 and topoisomerase IIalpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study. *Breast Cancer Res* 2005; 7(3):R374-R384.
- (41) Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jager W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2001; 19(16):3669-3674.
- (42) Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF et 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; 61(6):2505-2512.
- (43) Gerber B, Krause A, Muller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J et al. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol* 2001; 19(4):960-971.
- (44) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4):1710-1715.
- (45) Giersiepen K, Heitmann C, Jahnsen K, Lange C. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 2005.
- (46) 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; 21(17):3357-3365.

- (47) Harbeck N, Dettmar P, Thomssen C, Henselmann B, Kuhn W, Ulm K et al. Prognostic impact of tumor biological factors on survival in node-negative breast cancer. *Anticancer Res* 1998; 18(3C):2187-2197.
- (48) Harris LN, Yang L, Liotcheva V, Pauli S, Iglehart JD, Colvin OM et al. Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1497-1504.
- (49) Hartmann A, Blaszyk H, Kovach JS, Sommer SS. The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet* 1997; 13(1):27-33.
- (50) Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6(4):375-392.
- (51) Hermanek P. Prognostic factor research in oncology. *J Clin Epidemiol* 1999; 52(4):371-374.
- (52) Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003; 284(1):99-110.
- (53) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015):49-53.
- (54) Hsiang YH, Wu HY, Liu LF. Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Res* 1988; 48(11):3230-3235.
- (55) Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 1995; 346(8979):883-887.
- (56) Ishida R, Sato M, Narita T, Utsumi KR, Nishimoto T, Morita T et al. Inhibition of DNA topoisomerase II by ICRF-193 induces polyploidization by uncoupling chromosome dynamics from other cell cycle events. *J Cell Biol* 1994; 126(6):1341-1351.
- (57) 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; 84(14):1109-1114.
- (58) Janni W, Hepp F, Rjosk D, Kentenich C, Strobl B, Schindlbeck C et al. The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence. *Cancer* 2001; 92(1):46-53.
- (59) Janni W, Rack B, Schindlbeck C, Strobl B, Rjosk D, Braun S et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* 2005; 103(5):884-891.

- (60) Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC et al. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 78(4):460-465.
- (61) Jarvinen TA, Liu ET. HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 78(3):299-311.
- (62) Jones S, Clark G, Koleszar S, Ethington G, Mennel R, Paulson S et al. Low proliferative rate of invasive node-negative breast cancer predicts for a favorable outcome: a prospective evaluation of 669 patients. *Clin Breast Cancer* 2001; 1(4):310-314.
- (63) Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995; 104(1):42-49.
- (64) Kreienberg R, Kopp I, Lorenz W, Budach W, Dunst J, Lebeau A et al. Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft und der beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau - Eine nationale S3-Leitlinie. [Version: Juni 2004]. 2007. Frankfurt/Main, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO).
- (65) Kucera E, Speiser P, Gnant M, Szabo L, Samonigg H, Hausmaninger H et al. Prognostic significance of mutations in the p53 gene, particularly in the zinc-binding domains, in lymph node- and steroid receptor positive breast cancer patients. Austrian Breast Cancer Study Group. *Eur J Cancer* 1999; 35(3):398-405.
- (66) Lai H, Ma F, Trapido E, Meng L, Lai S. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 83(1):57-66.
- (67) Landys K, Persson S, Kovarik J, Hultborn R, Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 49(1):27-33.
- (68) Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol* 2001; 19(2):354-363.
- (69) Low SC. The trend towards a conservative approach in the surgical management of breast cancer. *Singapore Med J* 2005; 46(12):662-664.
- (70) MacGrogan G, Bonichon F, de M, I, Trojani M, Durand M, Avril A et al. Prognostic value of p53 in breast invasive ductal carcinoma: an immunohistochemical study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36(1):71-81.

- (71) MacGrogan G, Rudolph P, Mascarel I, I, Mauriac L, Durand M, Avril A et al. DNA topoisomerase II α expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(4):666-671.
- (72) Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250(4985):1233-1238.
- (73) Meng S, Tripathy D, Shete S, Ashfaq R, Haley B, Perkins S et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(25):9393-9398.
- (74) 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; 235(1):10-26.
- (75) Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Munoz M et al. C-erbB-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Res* 1996; 16(4B):2295-2300.
- (76) Molina R, Segui MA, Climent MA, Bellmunt J, Albanell J, Fernandez M et al. p53 oncoprotein as a prognostic indicator in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 1998; 18(1B):507-511.
- (77) Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer* 1997; 74(4):433-437.
- (78) Naume B, Borgen E, Kvalheim G, Karesen R, Qvist H, Sauer T et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow in early-stage breast carcinoma patients: comparison with preoperative clinical parameters and primary tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001; 7(12):4122-4129.
- (79) Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19(13):3159-3167.
- (80) Overgaard J, Yilmaz M, Guldborg P, Hansen LL, Alsner J. TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta Oncol* 2000; 39(3):327-333.
- (81) Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004; 5(1):63-69.
- (82) Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51(3):195-208.

- (83) Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000; 18(21):3651-3664.
- (84) Pharoah PD, Day NE, Caldas C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999; 80(12):1968-1973.
- (85) Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N et al. Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10(4):1392-1400.
- (86) Powell B, Soong R, Iacopetta B, Seshadri R, Smith DR. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2):443-451.
- (87) Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A. A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2003; 39(4):447-453.
- (88) Railo M, Lundin J, Haglund C, von Smitten K, von Boguslawsky K, Nordling S. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol* 1997; 36(4):369-374.
- (89) Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 1998; 3(4):237-252.
- (90) Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm SO, de M, I, Trojani M et al. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 55(1):61-71.
- (91) Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol* 1999; 187(2):207-216.
- (92) Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Kornmeier A, Rack B, Rjosk D et al. Isolated tumor cells in the bone marrow (ITC-BM) of breast cancer patients before and after anthracyclin based therapy: influenced by the HER2- and Topoisomerase IIalpha-status of the primary tumor? *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; .
- (93) Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M et al. Comparative analysis between the HER2 status in primary breast cancer tissue and the detection of isolated tumor cells in the bone marrow. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 87(1):65-74.

- (94) Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123(3):513-522.
- (95) Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(13):7737-7742.
- (96) Schnitt SJ. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;(30):22-26.
- (97) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3):311-322.
- (98) Schon D, Bertz J, Gorsch B, Haberland J, Kurth BM. [Federal Cancer Reporting Unit. Surveillance program for cancer registration in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2004; 47(5):429-436.
- (99) Seshadri R, Leong AS, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ. Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *Int J Cancer* 1996; 69(2):135-141.
- (100) Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, Veneroni S, Boracchi P, Cappelletti V et al. p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(12):965-970.
- (101) Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17):3628-3636.
- (102) Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin* 2006; 56(1):37-47.
- (103) Sirvent JJ, Salvado MT, Santafe M, Martinez S, Brunet J, Alvaro T et al. p53 in breast cancer. Its relation to histological grade, lymph-node status, hormone receptors, cell-proliferation fraction (ki-67) and c-erbB-2. Immunohistochemical study of 153 cases. *Histol Histopathol* 1995; 10(3):531-539.
- (104) Sjogren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(3-4):173-182.
- (105) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with

- amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235(4785):177-182.
- (106) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905):707-712.
- (107) Sobin LH. TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors. *Cancer* 2001; 91(8 Suppl):1589-1592.
- (108) Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(18):10393-10398.
- (109) Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 2000; 148(2):385-397.
- (110) Thor AD, Liu S, Moore DH, Edgerton SM. Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(2):470-477.
- (111) Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker? *Cancer* 2003; 97(5):1321-1331.
- (112) Tyczynski JE, Plesko I, Aareleid T, Primic-Zakelj M, Dalmas M, Kurtinaitis J et al. Breast cancer mortality patterns and time trends in 10 new EU member states: mortality declining in young women, but still increasing in the elderly. *Int J Cancer* 2004; 112(6):1056-1064.
- (113) Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16(10):5276-5287.
- (114) van der Hage JA, Putter H, Bonnema J, Bartelink H, Therasse P, van de Velde CJ. Impact of locoregional treatment on the early-stage breast cancer patients: a retrospective analysis. *Eur J Cancer* 2003; 39(15):2192-2199.
- (115) Veronese SM, Maisano C, Scibilia J. Comparative prognostic value of Ki-67 and MIB-1 proliferation indices in breast cancer. *Anticancer Res* 1995; 15(6B):2717-2722.
- (116) Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(6):430-440.
- (117) West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene

- expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(20):11462-11467.
- (118) Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(18):3469-3478.
- (119) Wiedswang G, Borgen E, Karesen R, Qvist H, Janbu J, Kvalheim G et al. Isolated tumor cells in bone marrow three years after diagnosis in disease-free breast cancer patients predict unfavorable clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16):5342-5348.
- (120) Wynder EL, MacCornack FA, Stellman SD. The epidemiology of breast cancer in 785 United States Caucasian women. *Cancer* 1978; 41(6):2341-2354.
- (121) Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S et al. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004; 6(1):R24-R30.
- (122) Yarbro JW, Page DL, Fielding LP, Partridge EE, Murphy GP. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer* 1999; 86(11):2436-2446.
- (123) Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001; 61 Suppl 2:1-13.:1-13.
- (124) Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(3):851-858.
- (125) Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY et al. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 2000; 275(11):8027-8031.

Publikationen und Kongressbeiträge, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

1. Schindlbeck, C., **Kampik T.**, Janni W., Rack B., Krajewski S., Sommer H., Friese F. 2005. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. Breast Cancer Research 2005, 7:R1174-R1185 (DOI 10.1186/bcr1360)
2. Schindlbeck, C., **Kampik T.**, Janni W., Rack B., Krajewski S., Sommer H., Friese F. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark (DTZ-KM) und tumorbiologische Faktoren an Primärtumoren von 265 Mammakarzinompatientinnen. Poster. Gemeinsame Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe und der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde Salzburg, 25. – 28. Mai 2005

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Professor Sommer gebührt herzlicher Dank für die Überlassung des interessanten Themas, für die hilfreiche Betreuung und nicht zuletzt für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge bei der Korrektur.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Christian Schindlbeck für die engagierte, sachkundige und geduldige Dissertationsbetreuung. Er nahm sich stets Zeit, mir bei inhaltlichen oder strukturellen Problemen eine tatkräftige Hilfe zu sein.

Schließlich möchte ich noch Frau Sandra Schulze für ihre geduldige Einführung in die histologischen Färbetechniken meinen Dank aussprechen.

Meinen Eltern bin ich dankbar für die Unterstützung jeglicher Art, die weit über das Korrekturlesen des Manuskriptes hinausging.

8 Lebenslauf

Name Theresa Kampik
Geboren 26.12.1980 in München
römisch-katholisch
Eltern Ursula Kampik und Prof. Dr. med. Anselm Kampik
Geschwister Dr. med. Daniel Kampik
Dr. jur. Felicitas Maunz

Schulische Ausbildung

9/1991-10/1995 Wirsberg-Gymnasium Würzburg
10/1995-7/2000 Gymnasium Pullach, München
7/2000 Abitur in München

Studium

10/2000 – 4/2007 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München
19.4.2007 Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr

4/2006-7/2006 Medizinische Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-
Universität München
8/2006-10/2006 Chirurgie, Mount Sinai Hospital, New York, USA
10/2006-12/2006 Chirurgie, Krankenhaus München-Schwabing
12/2006-4/2007 Klinik und Poliklinik für Dermatologie und
Allergologie, LMU, München

Derzeitige Tätigkeit

Seit 7/2007 Assistenzärztin, Medizinische Klinik Innenstadt,
Ludwig-Maximilians-Universität München