

**Immunhistochemische Analyse des p16 Proteins bei Patientinnen
mit primärem Mammakarzinom und seine prognostische Relevanz**

**Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation**

vorgelegt von

Corinne Scozzai

aus

Ettelbrück/Luxemburg

**Berichter: Herr Professor
Dr. med. Stefan Biesterfeld**

**Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Christian Mittermayer**

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Februar 2006

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	5
1.1	EPIDEMIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS.....	5
1.2	ÄTIOLOGIE	5
1.3	PROGNOSEFAKTOREN.....	6
1.3.1	Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz	7
1.3.2	Potenzielle neue Prognosefaktoren.....	8
1.4	DAS p16-PROTEIN UND SEINE FUNKTION	10
1.5	PROBLEMSTELLUNG	11
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	MATERIAL	13
2.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG DES TUMORMARKERS p16	13
2.2.1	Präparategewinnung.....	13
2.2.2	Darstellung des humanen p16-Proteins.....	13
2.2.3	Entparaffinierung und Rehydratisierung.....	14
2.2.4	Hemmung der endogenen Peroxidase.....	14
2.2.5	Mikrowellenbehandlung der Präparate	15
2.2.6	Auftragen der Antikörper	15
2.2.7	Auftragen des Avidin-Biotin-Komplexes	15
2.2.8	Entwicklungsvorgang mit DAB.....	16
2.2.9	Gegenfärbung mit Hämalun	16
2.2.10	Entwässerung und Eindeckeln	16
2.3	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG UND INTERPRETATION	16
2.4	STAGING UND GRADING.....	18
2.4.1	Stadieneinteilung - Staging	18
2.4.2	Malignitätsgradierung (Grading).....	19
2.4.3	Steroidhormonrezeptoren.....	19
2.5	STATISTIK	20
3	ERGEBNISSE	22
3.1	ALLGEMEINE DATEN	22
3.2	UNIVARIATE ÜBERLEBENSANALYSE.....	22
3.2.1	Überleben aller Patientinnen	22
3.2.2	TNM-Stadium und seine Komponenten.....	24
3.2.3	Tumorgradierung und seine Komponenten	27
3.2.4	Biochemischer Hormonrezeptorenstatus.....	31
3.2.5	Das p16-Protein und seine Parameter.....	34
3.3	KORRELATION AUSGEWÄHLTER PARAMETER.....	38
3.3.1	Beziehung zwischen den einzelnen p16-Parametern untereinander	38
3.3.2	Beziehung zwischen der p16-Kernreaktion und den übrigen klinischen und morphologischen Parametern	40
3.3.3	Beziehung zwischen der p16-Zytoplasmareaktion und den übrigen klinischen und morphologischen Parametern.....	40
3.4	MULTIVARIATE ANALYSE: COX-MODELL	43
4	DISKUSSION	49
4.1	ANERKANNTE PROGNOSEFAKTOREN BEIM MAMMAKARZINOM.....	49
4.1.1	Tumorstaging	49
4.1.2	Tumorgradierung.....	50
4.1.3	Hormonrezeptoren.....	51
4.2	DAS p16-PROTEIN UND SEINE PARAMETER	52
4.3	MULTIVARIATE ÜBERLEBENSANALYSE	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	59

6	TECHNISCHER ANHANG.....	60
6.1	REAGENZIEN	60
6.2	SILANISIERUNG DER OBJEKTTRÄGER	61
7	DATENSAMMLUNG	62
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	74
9	DANKSAGUNG	84
10	LEBENS LAUF	85

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Maligne Erkrankungen stehen in der Todesursachenstatistik der Bundesrepublik Deutschland an zweiter Stelle hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen; dabei ist das Mammakarzinom der häufigste Tumor der Frau.

In den letzten Jahren hat die Häufigkeit des Mammakarzinoms stark zugenommen, bei etwa jeder 10. Frau in der westlichen Welt wird die Diagnose Brustkrebs gestellt und jede 4. neu diagnostizierte Krebserkrankung bei Frauen ist ein Mammakarzinom. Nach einem jüngsten Bericht der European Society For Medical Oncology (ESMO)¹ beträgt die jährliche Erkrankungsrate an Brustkrebs in den Ländern der Europäischen Union 105/100.000. Die Mortalität wird mit 40/100.000 pro Jahr angegeben. Auf Deutschland übertragen ergibt sich daraus eine Absolutzahl neu diagnostizierter Mammakarzinome von etwa 80.000 und Todesfälle von etwa 32.000 jährlich. Bisher waren für Deutschland, nach Schätzungen des Robert Koch Institutes² auf der Grundlage vom Saarländischen Krebsregister, 45.000 Neuerkrankungen pro Jahr angenommen worden. Mammakarzinome treten in Nordamerika und in Europa 5 mal häufiger auf als in Asien; bei ausgewanderten Asiatinnen gleicht sich die Inzidenz jedoch innerhalb weniger Generationen an die des Gastlandes an.

1.2 Ätiologie

Wie bei vielen anderen Tumorerkrankungen sind auch beim Brustkrebs der genaue Auslöser und etwaige Ursachen noch unbekannt. Allerdings gibt es eine Reihe von Risikofaktoren, die eine Karzinomentwicklung begünstigen.

Mit dem höchsten Risiko ist derzeit das Vorliegen einer Mutation des Tumorsuppressorgens BRCA1 (Breast cancer gene 1) behaftet³. An dem familiär bedingten Mammakarzinom erkranken mehrere Verwandte ersten Grades über Generationen hinweg. Die genetische Disposition hierfür liegt allerdings bei weniger als 0,5 % der weiblichen Bevölkerung vor.

Eine humangenetische Diagnostik ist daher nur bei positiver Familienanamnese^{4, 5} sinnvoll. Diese zählt ebenfalls zu den weiteren bekannten Risikofaktoren. Bei familiärer Belastung in der Verwandtschaft ersten Grades (Mutter, Schwester) beträgt das relative Risiko 1,4-13,6⁶. Hormonelle Faktoren spielen in der Pathogenese des Brustkrebses eine wichtige Rolle. Das Risiko der Brustkrebsentstehung korreliert mit der kumulativen Exposition gegenüber Östrogenen und möglicherweise auch Progesteronen während der gesamten Lebenszeit. Bei früher Menarche⁷ (12. Lebensjahr und früher) und später Menopause⁸ (>55 Jahre) ist das Brustkrebsrisiko erhöht. Frühe Schwangerschaften und eine größere Zahl von Kindern wirken sich dagegen risikomindernd aus⁹. Eine exogene Östrogensubstitution in der Hormonersatztherapie bei Frauen in der Postmenopause erhöht das Brustkrebsrisiko gering, wobei die Dauer der Einnahme eine entscheidende Rolle spielt. Nach aktueller Datenlage führt eine orale Kontrazeption nicht zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos¹⁰. Mit steigendem Alter steigt auch die Inzidenz des Mammakarzinoms. Das relative Risiko einer 50 bis 60-Jährigen, an einem Brusttumor zu erkranken, liegt schon bei 1,5. Benigne proliferative Brustläsionen und atypische duktale Hyperplasien gehen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einher, im Vergleich zur Normalbevölkerung besteht hier ein relatives Risiko von bis zu 3,0¹¹. Außerdem beeinflussen bestimmte Ernährungsgewohnheiten das Mammakarzinomrisiko. Übergewicht geht insbesondere in der Postmenopause mit einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit einher¹². Auch ein erhöhter Alkoholkonsum erhöht das Risiko. Die Hauptbedeutung der Ernährung liegt im Kaloriengehalt: ein gesteigerter Fettkonsum, der zu einem erhöhten Östrogenmetabolismus führt, wird als Ursache der höheren Mammakarzinomraten diskutiert¹³. Körperliche Aktivität senkt dagegen die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Weiterhin entwickeln Frauen nach Strahlentherapie maligner Erkrankungen (z.B. M. Hodgkin) signifikant häufiger Mammakarzinome.

1.3 Prognosefaktoren

Die Bestimmung von Prognosefaktoren beim Mammakarzinom hat das Ziel, den zukünftigen Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin möglichst genau abzuschätzen. Hiervon unterschieden werden müssen die sogenannten prädiktiven Faktoren, die Therapieerfolg und Therapieansprechen vorhersagen.

Die Liste der Faktoren, die eine prognostische oder prädiktive Aussage ermöglichen, ist lang. Allerdings gibt es nur wenige tatsächlich brauchbare, unabhängige Prognosefaktoren. Hieran hat sich trotz der Erprobung vieler Faktoren in den vergangenen zehn Jahren nur wenig geändert.

1.3.1 Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz

Folgt man der aktuellen Übersicht der Arbeitsgruppe Prognosefaktoren der Projektgruppe Mammakarzinom des Tumorzentrums München, so können die folgenden Größen als Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz gelten :

TNM-Status:	Tumorgröße
	Axillärer Lymphknotenbefall
	Fernmetastasierung
Morphologie:	Grading (G1-G3)
	Histologischer Typ
	Peritumorale Lymphangiosis carcinomatosa/
	Gefäßinvasion
Steroidhormonrezeptoren:	Östrogenrezeptor
	Progesteronrezeptor

Bis heute ist der *axilläre Lymphknotenstatus* beim Mammakarzinom der stärkste Prognosefaktor für Rezidiv und Überleben. Hierbei korreliert die Anzahl der befallenen Lymphknoten direkt mit dem Risiko des Rezidivs und des Todes.

Es besteht außerdem eine positive Korrelation zwischen der *Größe des Primärtumors* und dem axillären Lymphknotenbefall. Für nodal-negative Karzinome ist die Tumorgröße ein wichtiger prognostischer Indikator, während bei nodal-positiven Patientinnen die Tumorgröße vom Lymphknotenbefall „überdeckt“ wird.

Eine *Fernmetastasierung* bereits bei Diagnosestellung des Tumors zeigt à priori eine schlechte Prognose an.

Auch *morphologische Kriterien* sind von hoher prognostischer Bedeutung. Definierte Sonderformen, wie z.B. tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome, haben eine signifikant bessere Prognose als duktile oder lobuläre. Ein *Tumoreinbruch in die Lymph- oder Blutgefäße* weist auf eine schlechte Prognose und eine verminderte Lebenserwartung infolge einer erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit hin. Der Nachweis einer Lymphangiosis bei N0-Pat. verfünffacht das Risiko, an dem Mammakarzinom zu versterben. Nach dem St.Gallen-Konsensus 2001 soll der histologisch nachgewiesene Gefäßeinbruch nicht als prognostischer Faktor für eine Entscheidung zur adjuvanten Therapie herangezogen werden¹⁴.

Weiterhin besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen dem *histologischen Grading* und dem rezidivfreien Überleben.

Der *Steroidhormonrezeptorstatus* zeigt eine eigenständige Relevanz für das Gesamtüberleben. Die Patientinnen mit positivem Rezeptorstatus leben signifikant länger als diejenigen mit negativem Befund. Außerdem sind sowohl der Östrogen- als auch der Progesteronrezeptor als prädiktive Faktoren von Bedeutung, denn sie lassen bei Positivität eine gute Wirksamkeit einer hormonellen Therapie erwarten^{15, 16, 17, 18}.

Auch *Alter und Menopausenstatus* spielen im klinischen Alltag als Prognosefaktoren eine Rolle. Prämenopausale Patientinnen haben eine ungünstigere Prognose als postmenopausale Frauen. Nach der St.Gallen-Konsensus-Konferenz 1998 wird ein Alter < 35 Jahre als Hochrisikofaktor angesehen.

1.3.2 Potenzielle neue Prognosefaktoren

Die Anforderungen an einen neuen Prognosefaktor, der sinnvoll Eingang in die Routinediagnostik finden soll, sind hoch, da die Berücksichtigung nicht oder nur bedingt relevanter Faktoren nur zu einer Verunsicherung der betroffenen Patientin und ihrer behandelnden Ärzte führt. Voraussetzung für die Anerkennung eines neuen Prognoseparameters ist, dass seine Relevanz statistisch einwandfrei und reproduzierbar in unabhängigen Studien belegt werden kann. Dies beinhaltet auch, dass für den entsprechenden Faktor eine unabhängige Relevanz in einer multivariaten Analyse gezeigt werden muß, d.h. er muß eine prognostische Aussagekraft haben, die unter alleiniger Berücksichtigung der bislang gesicherten Faktoren nicht erreicht wird.

Tumorassoziierte Proteolysefaktoren wie der Plaminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plaminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ 1) sind die einzigen neuen Faktoren, für die alle Kriterien der Evaluierung erfüllt sind¹⁹. Sie ermöglichen die gerichtete Invasion der Tumorzellen und spielen eine wichtige Rolle bei ihrer Adhäsion und Migration²⁰. Hohe Konzentrationen von uPA und PAI-1 im Primärtumor gehen mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko und mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben einher²¹. Nodal-negative Patientinnen mit niedrigem uPA und PAI-1 im Tumor haben eine sehr gute Prognose, so dass eine adjuvante Chemotherapie bei diesen Patientinnen nicht indiziert scheint^{22, 23}. Das Problem bei der Anwendung dieser Faktoren ist, dass sie nur an frischem, am besten auf einer Kühlkette asservierten Tumormaterial erhoben werden können und keine Analyseverfahren etabliert werden konnten, die ihre Bestimmung an fixiertem Tumorgewebe ermöglicht. Vor allem immunhistochemische Verfahren konnten bislang auch nicht ansatzweise reproduzierbar etabliert werden.

Das *Onkoprotein HER2-neu (Human epidermal growth factor receptor, type 2)*, ist ein wichtiger Mediator für das Zellwachstum, die Differenzierung und für die metabolischen Abläufe in der Zelle. Eine Überexpression dieses Onkogens tritt bei 20-30% aller Patientinnen mit Mammakarzinom auf und ist mit einer Verminderung der Lebenserwartung behaftet, wenn gleich die HER2-neu Überexpression bisher nicht als unabhängiger Prognoseparameter für alle Patientinnengruppen betrachtet werden kann. Derzeit wird eine HER2-neu-Überexpression²⁴ bei hämatogen metastasierten Mammakarzinomen als Indikation zu einer Immuntherapie mit dem gentechnisch hergestellten monoklonalen Antikörper Herceptin²⁵ (Trastuzumab) angesehen. Herceptin ist gegen das HER-2/neu-Onkoprotein gerichtet. Die klinischen Daten über Trastuzumab belegen eindeutig seine Wirksamkeit: das mediane Überleben, das Gesamtüberleben, die mediane Zeit zur Progression, und die mediane Dauer des Ansprechens waren sowohl durch Kombination von Chemotherapie²⁶ als auch in der Monotherapie²⁷ bei vorbehandelten Patientinnen signifikant verlängert.

Der *immunzytochemische Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen* im Knochenmark (Knochenmarkstatus) hat als fakultativer Faktor bereits Eingang in die TNM-Klassifikation gefunden²⁸. Jedoch sollte er, solange eine Standardisierung der Methodik noch nicht erreicht ist, noch spezialisierten Zentren vorbehalten werden. Seine eigentliche prognostische Relevanz ist umstritten, eine generelle Therapieempfehlung lässt sich aus dem Knochenmarkbefund derzeit noch nicht ableiten²⁹.

Als einer der neuesten prognostischen Markern, der noch auf dem großen Gebiet der Forschung zu erwähnen ist und auf jeden Fall in zukünftige Validierungsstudien aufgenommen werden sollte, ist die *Telomerase*. Rezente Brustkrebsstudien³⁰ haben erwiesen, dass Tumoren, die mit einer verstärkten Aktivität dieses Enzyms einhergehen, ein aggressiveres Verhalten zeigen und mit einer niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert sind. Methodische Probleme bei der Analyse, z.B. fehlende Standardisierung, schränken die verbreitete Anwendung bislang noch ein.

Alle weiteren neuen Prognosefaktoren wie andere tumorassoziierte Proteolysefaktoren (z.B. *Kathepsin D*) oder zellkinetische Parameter (*MIB-1*, *p53*, *S-Phase-Bestimmung*, *PCNA*) sind derzeit noch Gegenstand der Forschung. Aus ihrer Bestimmung leiten sich derzeit keine klinischen Konsequenzen ab, auch wenn in manchen Zentren eine MIB-1- oder p53-Bestimmung in der Routinebefundung mit erhoben wird.

Ob das p16-Tumorsuppressorprotein, ein von weit über 100 in der Literatur beschriebenen Prognosefaktoren, eine zuverlässige Vorhersage über den Krankheitsverlauf (Gesamtüberleben) erlaubt und somit Therapieentscheidungen beeinflussen kann, soll in dieser Arbeit diskutiert werden:

1.4 Das p16-Protein und seine Funktion

Die Regulierung des Zellzyklus der menschlichen Zellen ist ein komplexes System, das dem Einfluß einer Vielzahl hemmender und stimulierender Faktoren unterliegt. In Tumoren verschiedener Arten gerät dieses System aus dem Lot, und es kommt zur abnormen Expression der Zellzyklusregulatoren.

Beim Mammakarzinom liegt der kritische Punkt der Zellzyklusregulation am Übergang der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus. Bei der Tumorentstehung sind hier Defekte praktisch obligatorisch. Die klinische Ausprägung des Tumors ist dabei abhängig vom spezifischen Typ des Zellzyklusdefektes³¹.

Eine der möglichen Veränderungen an diesem G₁-Kontrollpunkt betrifft das p16-Protein, welches sich als das häufigste Ziel dieser Zellzyklusderegulation erwiesen hat³².

p16, ein Protein aus 156 Aminosäuren und mit einem Molekulargewicht von 16 kDa, ist ein Zyklin-abhängiger Kinase-4-Inhibitor, der die im G₁-Zyklus vorkommenden Zyklin D-abhängigen Kinasen, Cdk4 und Cdk6, hemmt. So wird das Retinoblastomprotein nicht phosphoryliert und damit der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus verhindert^{33, 34}. Dies ist ein kritischer Schritt in der Zellzykluskaskade. Die Tatsache, dass p16^{INK4a} einen Stopp der Zellzyklus-Passage in der späten G₁-Phase bewirken kann und dass Mutationen von p16 einen Funktionsverlust bedeuten, zeigt, dass p16 eine Schlüsselfunktion in der negativen Wachstumskontrolle spielt^{35, 36}. Es wurde vermutet, dass es sich bei dem INK4a-Gen, das sich auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 befindet, um ein Tumorsuppressorgen handelt, da es in Tumorzelllinien oft deletiert ist^{37, 38}. Dieses konnte in einem Versuch mit Knockout-Mäusen bestätigt werden³⁹, in dem gezeigt wurde, dass der p16^{INK4a}-Verlust die Tumorentstehung erleichtert. Das Gen ist in spontanen Tumoren nicht nur durch Deletionen, sondern auch durch Punktmutationen oder aber infolge Methylierung des Promotors inaktiviert⁴⁰. Diese p16^{INK4a}-Inaktivierung geht üblicherweise einher mit einem aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose, so wie es Studien an Neoplasmen der Bauchspeicheldrüse, an malignen Melanomen, Gliomen, Leukämien, Non-Hodgkin Lymphomen, und an nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen gezeigt haben^{41, 42, 43, 44, 45, 46}.

Beim Mammakarzinom hingegen ist die Bedeutung von p16 bei weitem noch nicht so gut verstanden, und das Untersuchen seiner ursächlichen Rolle in Bezug auf die Prognose von Brustkrebspatientinnen ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten.

1.5 Problemstellung

Aus dem bisher Dargestellten geht hervor, dass man weiterhin nach prognostisch validen Parameter für das Mammakarzinom sucht, mit deren Hilfe man die etablierte Stadieneinteilung sinnvoll ergänzen kann.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, die immunhistochemisch bestimmbare Expression von p16 in Mammakarzinomen unter Zugrundelegung der üblichen klinischen und morphologischen Daten an einem bis zu 12 Jahre nachbeobachteten Patientenkollektiv prognostisch auszuwerten. Sie ist Teil einer Multiparameter-Analyse, die darüber hinaus unter anderem Aspekte der immunhistochemischen Expression von Proliferationsmarkern (Klüppel 1999⁴⁷, Schneider 2000⁴⁸), Hormonrezeptoren (Steinhagen 2001⁴⁹, Koch 2004⁵⁰), PSA (Zitzelsberger

2004⁵¹), bcl-2 (Doetkotte 2004⁵²), p53 (Abu-Nasir 2001⁵³) und des Rb-Antigens (Fischer 2004⁵⁴) einschließt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Untersucht wurden 103 konsekutiv gesammelte Fälle von Mammakarzinomen aus dem täglichen Eingang des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikum Aachen aus den Jahren 1988-1990. In die Studie aufgenommen wurden lediglich Patientinnen mit primärem unilateralem Mammakarzinom ohne vorherige maligne Erkrankung. Bekannt waren die postoperative TNM-Klassifikation, die primäre Therapie und der biochemische Hormonrezeptorstatus. Die Routinepräparate lagen in H.E.-Färbung vor.

2.2 Immunhistochemische Darstellung des Tumormarkers p16

Die verwendeten Reagenzien und Erläuterungen zu den Methoden sind im Technischen Anhang (Kapitel 5) zusammengefasst wiedergegeben.

2.2.1 Präparategewinnung

Das zu untersuchende Gewebe aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der RWTH Aachen lag formalin-fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet vor. Pro Fall wurde der Paraffinblock mit dem repräsentativsten intakten invasiven Tumoranteil ausgewählt. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden von den Blöcken Schnittserien von 2 µm Dicke hergestellt, wobei die Schnitte auf zur besseren Haftung silanisierte und mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen wurden.

2.2.2 Darstellung des humanen p16-Proteins

Die p16-Expression im Gewebe wurde mit Hilfe eines immunhistochemischen Analyseverfahrens untersucht. Hierzu wurde eine indirekte Immunperoxidasefärbung eingesetzt.

Bei dieser Anwendung wurde ein unmarkierter Primärantikörper verwendet, der gegen das zelluläre Antigen des p16 gerichtet ist. Danach wurde gegen diesen ein Sekundärantikörper eingesetzt, der den gebundenen Primärantikörper als Antigen erkennt. Hierzu wurde die Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode (ABC-Methode) angewandt, die zu den sensitivsten, indirekten Nachweismethoden gezählt wird. Bei der ABC-Methode wird ein biotinylierter Sekundärantikörper eingesetzt. Avidin, ein Hühnereiweiß-Glykoprotein, besitzt eine starke Bindungsaffinität zum Vitamin H (=Biotin) und hat 4 Bindungsstellen für Biotin.

Der ABC-Komplex besteht aus Avidin und dem biotinyliertem Enzym Peroxidase. Dieser Komplex wird dann an den biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Da mehrere ABC-Komplexe an nur einen Sekundärantikörper binden können, werden indirekt mehrere Marker-Enzymmoleküle an nur einen Primärantikörper gebunden. Diese Methode erhöht wiederum die Sensitivität und ist besonders bei geringen Antigenmengen geeignet.

2.2.3 Entparaffinierung und Rehydratisierung

Da die anzufärbenden Schnitte in Paraffin eingebettet vorlagen, mussten sie für den folgenden Färbevorgang erst entparaffiniert werden. Zuvor wurden die Präparate erneut für eine Stunde bei 60 °C im Brutschrank getrocknet, um Probleme mit der Haftung der Präparate auf dem Objektträger zu vermeiden.

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate für 2x5 Minuten in eine Xylol-Küvette gestellt. Danach wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten rehydratisiert (2x 100% Ethanol, 2x 96% Ethanol, 1x 70% Ethanol und 1x 50% Ethanol). Anschließend erfolgte eine kurze Spülung mit Aqua dest.

2.2.4 Hemmung der endogenen Peroxidase

Da im folgenden Peroxidase sichtbar gemacht werden sollte, mußte die gewebeeigene Peroxidase gehemmt werden, um eine diffuse Anfärbung des Gewebes zu verhindern. Hierzu wählte man ein Zwischenschritt, bei dem die Präparate für 30 Minuten in einem 1%igen Methanol-Wasserstoffperoxidgemisch, im Verhältnis 58:2, eingestellt wurden. Man wählt Peroxidase häufig als Nachweisenzym, weil es relativ klein ist und somit nicht die Bindung des

Antikörpers behindert und weil es mit einer Vielzahl von Chromogenen ein braunes Farbprodukt bildet, über das man später das Antigen lokalisiert.

2.2.5 Mikrowellenbehandlung der Präparate

Um die Zellmembranen zu zerstören und das p16 Antigen freizulegen („antigen retrieval“), wurden die Präparate in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) vorbehandelt und 3x5 Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt gekocht. Nach 15minütigem Abkühlen wurden die Schnitte in TBS gespült. TBS wurde aus der vorher angefertigten konzentrierten Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt und der pH mit 2N HCl auf 7,4-7,6 titriert. Nun wurden die Schnitte auf Deckplatten aufgespannt und in den Immunhistokasten mit PBS gehängt.

2.2.6 Auftragen der Antikörper

Als primärer Antikörper diente der monoklonale Mausantikörper p16 der Firma Biermann (DCS-50.1/H). Dieser wurde mit Pferdenormalserum (verdünnt 1:10 in 2% Milchpulver/PBS über 15 Minuten) in entsprechender Verdünnung auf das Präparat aufgetragen, für 1 Stunde bei 37 °C dort belassen und anschließend 5 Minuten lang mit 2% Milchpulver/PBS-Lösung abgespült. Um sicher zu gehen, dass die später zu untersuchende Anfärbung auch wirklich spezifisch die durch die Primärantikörper markierten Antigene lokalisiert, färbte man bei jedem Färbegang eine Negativkontrolle mit an. Es handelte sich hierbei um gesundes Mammagewebe, wo man zur Qualitätssicherung die Behandlung mit dem primären Antikörper unterlassen hat. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Pferde-Anti-Maus-Antikörper, welcher an den primären Antikörper bindet. Pro Schnitt wurde dieser im Verhältnis 1:100 in 2% Milchpulver/PBS-Lösung aufgetragen und wiederum für 30 Minuten dort belassen. Danach wurden die Präparate mit TBS-Pufferlösung abgespült.

2.2.7 Auftragen des Avidin-Biotin-Komplexes

Der Avidin-Biotin-Komplex wurde mindestens 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt, damit ausreichend Zeit für die Bindung der Biotinperoxidase durch Avidin blieb. Es wurden Avidin und Biotinperoxidase laut Vorschrift im Verhältnis 1:50 verdünnt. Die Einwirkzeit betrug

30 Minuten. Dann erfolgte wieder ein Spülvorgang mit TBS, und danach wurden die Präparate zurück in die Küvetten gestellt.

2.2.8 Entwicklungsvorgang mit DAB

Um den mit Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplex nun sichtbar zu machen, führte man eine Substrat-Chromogen-Reaktion herbei. Hierbei handelt es sich um eine enzymatische Reaktion, bei der die Meerrettichperoxidase (HRP) die Oxidation von 3,3 Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB) mit Wasserstoffperoxid katalysiert. Dabei bildet sich ein brauner, in Alkohol und Wasser unlöslicher Farbstoff. Zur Durchführung der Reaktion wurden in 50 ml 0,05m Tris/HCl-Puffer 50 µg DAB gelöst und 50 µl 10% H₂O₂ hinzugefügt; die Inkubationszeit betrug 5 Minuten.

2.2.9 Gegenfärbung mit Hämalan

Nach dem Entwicklungsvorgang mit DAB wurden die Präparate mit Leitungswasser und Aqua dest. mehrmals gespült, mit Hämalan kurz gegengefärbt und mit Leitungswasser gebläut. Dadurch kommt es zu einer besseren Kontrastierung im Gewebe, da auf diese Weise alle Zellkerne und auch Teile des Zytoplasmas und des interstitiellen Gewebes mit angefärbt wurden.

2.2.10 Entwässerung und Eindeckeln

Nun benutzte man eine aufsteigende Alkoholreihe, um die angefärbten Schnitte wieder zu entwässern. Danach wurden die Präparate kurz in Xylol gespült und schließlich in einem konventionellen Medium eingedeckelt.

2.3 Mikroskopische Auswertung und Interpretation

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe eines Leitz Orthoplan-Mikroskops (Objektiv: 40x/0,65, Okular 10x GK Periplan 18; Gesichtsfeldfläche

0,159 mm²). An den vorliegenden Präparaten wurden durch semiquantitative Schätzung die Kriterien des 1986 ursprünglich für die Bestimmung des Östrogenrezeptor-Status entwickelten Remmele-Scores bestimmt (Remmele und Stegner 1987)⁵⁵. Er stellt seitdem eine allgemein anerkannte Bewertungsgrundlage da, wurde auf viele andere immunhistochemische Färbeverfahren übertragen^{56, 57} und auch in dieser Arbeit modifiziert angewandt. Er besteht aus zwei semiquantitativ erhobenen, geschätzten Komponenten, nämlich der mittleren Färbintensität („staining intensity“, SI) und dem Prozentsatz immunreaktiver Zellen („percentage of positivity“, PP). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Unterteilungen gewählt:

3-stufige Unterteilung der Färbintensität (SI) im Zellkern

SI = 1: keine bzw. schwache Färbereaktion

SI = 2: mäßige Färbereaktion

SI = 3: starke Färbereaktion

3-stufige Unterteilung des Prozentsatzes immunreaktiver Zellkerne (PP)

PP = 1: < 10% positive Zellen

PP = 2: 10-50% positive Zellen

PP = 3: > 50% positive Zellen

Der immunreaktive Score (IRS) wird aus dem Produkt von SI und PP errechnet, so dass als Ergebnisse des IRS Werte von 1, 2, 3, 4, 6 und 9 möglich sind. Zusätzlich wurde die Färbereaktion des Zytoplasmas (PL) mit aufgenommen und als positiv oder negativ beurteilt:

2-stufige Unterteilung der Färbintensität des Zytoplasmas (PL)

PL = 0 = negativ = keine Färbereaktion

PL = 1 = positiv = Färbereaktion vorhanden

Vor der eigentlichen Auswertung wurden die Negativkontrollen der Schnittserien analysiert, um sicherzustellen, dass der Färbvorgang richtig durchgeführt worden war. War bei Negativkontrolle keine spezifische Braunfärbung zu erkennen, konnte man die anderen Präparate der Schnittserie auswerten.

Zur Abschätzung der interpersonellen Reproduzierbarkeit der ermittelten Daten fand eine unabhängige Schätzung aller Präparate durch zwei geschulte Personen statt, weiterhin wurden die ermittelten Wertungen stichprobenartig an 40 Fällen noch von einer dritten unabhängigen Person überprüft.

2.4 Staging und Grading

2.4.1 Stadieneinteilung - Staging

Die Zuordnung der in dieser Arbeit untersuchten Mammakarzinome zu den Krankheitsstadien erfolgte nach der gebräuchlichen Einteilung der Union internationale contre le cancer (UICC, 1987⁵⁸):

Postoperative Tumorgroße (pT)

pT1 : Tumorgroße bis 2 cm.

pT2 : Tumorgroße von 2-5 cm.

pT3 : Tumorgroße > 5 cm.

pT4 : Tumorgroße mit Haut- oder Thoraxwandinfiltration.

Postoperativer Lymphknotenstatus (pN)

pN0 : kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten.

pN1 : Befall homolateraler axillärer Lymphknoten (noch verschieblich).

pN2 : Befall homolateraler axillärer Lymphknoten (fixiert).

pN3 : Befall homolateraler supra- oder infraklavikulärer Lymphknoten.

Fernmetastasierung

M0 : Kein Anhalt für Fernmetastasen.

M1 : Fernmetastasen vorhanden.

Postoperatives TNM Stadium (pTNM)

pTNM1 : pT1 pN0 M0.

pTNM2 : pT2-3 pN0 M0 und pT1-2 pN1 M0.

pTNM3 : pT4 pN0 M0, pT3-4 pN1 M0 und pT1-4 pN2-3 M0.

pTNM4 : pT1-4 pN0-3 M1.

2.4.2 Malignitätsgradierung (Grading)

Die histomorphologische Gradierung nach Bloom und Richardson (1957)⁵⁹ wurde von einem Pathologen an HE-gefärbten Routinepräparaten des jeweiligen Mammakarzinoms vorgenommen. Dabei wurden das histologische Erscheinungsbild (tubuläre Differenzierung, TD), das zytologische Erscheinungsbild (Kernpolymorphie, KP) sowie die mitotische Aktivität (Häufigkeit der Mitosen, MIT) subjektiv beurteilt.

Für das jeweilige Merkmal wurden ein bis drei Punkte gewählt (drei bei schlechter Differenzierung), wodurch sich ein Minimalwert von drei und ein Maximalwert von neun ergibt. Bei der Mischdifferenzierung eines Tumors wurde die schlechteste Differenzierung gewertet. Gemäß der Gradierung nach Bloom und Richardson gilt:

G1 : drei bis fünf Punkte.

G2 : sechs bis sieben Punkte.

G3 : acht bis neun Punkte.

2.4.3 Steroidhormonrezeptoren

Der Hormonrezeptornachweis von Östrogen und Progesteron erfolgte biochemisch mittels Radioimmunoassay. Bei diesem Verfahren werden die Tumorzellen zerstört und die Hormonrezeptoren biochemisch über die Menge an angelagerten Tritium-markierten Östradiol/ Progesteron mit dem Zytosol indirekt bestimmt. Die biochemische Maßeinheit ist das Femtomol (1 fmol gebundenes Tritium-markiertes Östradiol/ Progesteron pro Milligramm Gewebsprotein). Die maximale Bindungskapazität wurde bestimmt anhand eines Scatchard-Plots und ist

positiv ab 10 fmol/mg für den Östrogen- und ab 20 fmol/mg für den Progesteronrezeptor, Konsensus-Konferenz EORTC 1980⁶⁰.

2.5 Statistik

Die statistischen Untersuchungen wurden mit dem Programmpaket BMDP (Unterprogramme 1D, 1L, 2D, 2L, 4F) des Department of Biomathematics (BMDP) der University of California, Statistical Software Inc., Los Angeles, USA (Dixon 1981⁶¹), vorgenommen.

An biometrischen Grunddaten standen zunächst alle Parameter der deskriptiven Statistik, d.h. Modalwert, Median, Mittelwert, Minimal- und Maximalwert, Varianz, Standardabweichung und Variationskoeffizient sowie Angaben zu allen gewünschten Perzentilen zur Verfügung (BMDP 1D, BMDP 2D).

Beziehungen zwischen den allesamt kategorisierten, d.h. gestuft erhobenen oder sekundär gestuften Parametern wurden in Mehr-Felder-Tafeln dargestellt und im Pearson χ^2 -Test auf statistische Signifikanz getestet (BMDP 4F).

Univariate Überlebensanalysen erfolgten unter Berechnung von Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Kaplan und Meier 1958⁶²), die mit dem Wilcoxon-Breslow-Test auf statistische Signifikanz überprüft wurden (BMDP 1L) (Breslow 1970⁶³). Zur Gruppenbildung der Patienten wurden die Grenzen vorwiegend durch Quantilisierung der Parameterverteilung im Verhältnis 1: 2: 1 ermittelt.

Zur multivariaten Analyse wurde das Cox Proportional Hazard Regression Model (Cox 1972) herangezogen, welches Beziehungen zwischen der Überlebenszeit und diversen Einflußgrößen darstellen kann. So konnte die prognostische Relevanz der einzelnen Parameter verglichen und deren wechselseitigen Beziehungen untersucht werden. Hierbei wurde durch schrittweise Aufnahme aus allen univariat signifikant korrelierenden Parametern diejenigen isoliert, die einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hatten. Aufgrund des Modellcharakters, der auf einigen allgemeinen mathematisch-statistischen Voraussetzungen basiert, die

auf den Datensatz selber nicht unbedingt vollständig zutreffen müssen, wurden die Ergebnisse der Cox-Modelle im Abschluß noch einmal mittels Wilcoxon-Breslow-Test bzw. durch Darstellung in Überlebenskurven nach Kaplan und Meier validiert.

Statistische Signifikanz wurde jeweils für ein α -Niveau von 0,05 (Cox-Modell: 0,10) angenommen, entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von = 5% (Cox-Modell: = 10%), die Null-Hypothese fälschlich zu verwerfen.

Wegen der in dieser Arbeit vorliegenden multiplen Testproblematik, welche immer dann vorliegt, wenn anhand eines Kollektivs mehrere statistische Tests bzgl. verschiedener Zielparameter durchgeführt werden, wurde die statistische Auswertung explorativ angesetzt. Um als signifikant nachgewiesene Thesen von dem hier untersuchten Patientenkollektiv auf die Grundgesamtheit zu verallgemeinern, sind daher weitere Studien notwendig.

.

3 ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Daten

- ♦ Alter

Das Durchschnittsalter der 103 Patientinnen betrug im Mittel 59,1 Jahre $\pm$ 14,3 (SD) Jahre. Bei Erstdiagnose war die jüngste Frau 32 Jahre und die älteste 95 Jahre alt.

- ♦ Menopausenstatus

Der Menopausenstatus wurde eingeteilt in normal (n = 18), prämenopausal (n = 8), postmenopausal (n = 28) und Senium (n = 48).

- ♦ Histologischer Tumortyp

Die zu untersuchenden Fälle wurden nach der WHO-Klassifikation typisiert. 64 Fälle wurden als invasiv-duktral eingestuft, 15 Fälle als invasiv-lobulär und 24 Fälle als Sonderformen, darunter papilläre, muzinöse oder medulläre Karzinome.

3.2 Univariate Überlebensanalyse

Die Durchführung der Überlebensanalyse erfolgte in Form von Mehrfeldertafeln und in Kaplan-Meier-Kurven. Diese stellen das Gesamtüberleben der nach den einzelnen Parametern untersuchten Patientinnen in Form von Absterbekurven dar.

3.2.1 Überleben aller Patientinnen

Von den 103 Patientinnen, von denen Überlebensdaten vorliegen, lebten nach am Ende des bis zu 12 Jahre langen Beobachtungszeitraumes noch 53 (= 51%) nach 10.6 $\pm$ 1.0 Jahren Beobachtungsdauer. Die im Beobachtungszeitraum gestorbenen 47 Patientinnen (= 46%)

hatten eine mittlere Überlebensdauer von $3,9 \pm 2,8$ Jahren. Für die übrigen drei Patientinnen (= 3%) konnten nach durchschnittlich $6,2 \pm 1,0$ Jahren keine weiteren Überlebensdauern ermittelt werden.

Die Überlebensrate der 100 vollständig erfassten Patientinnen betrug somit nach bis zu 12 Jahren genau 53%. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit aller 103 Patientinnen lag bei 66,0%, die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit nach 10 Jahren bei 49,9%. Die Gesamtüberlebenskurve wird in Abbildung 1 dargestellt.

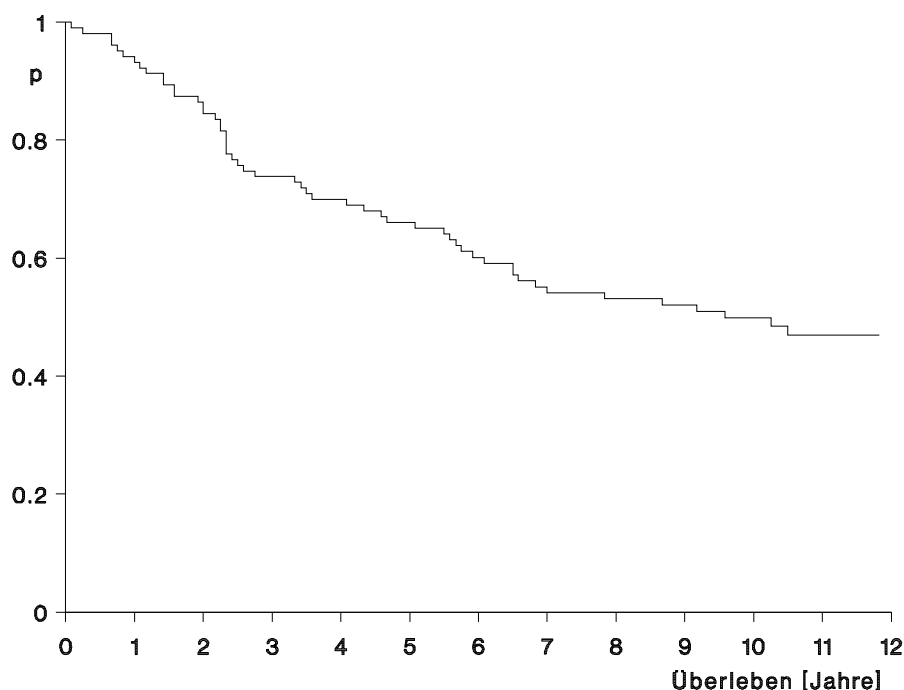


Abbildung 1: Überlebenskurve aller 103 Patientinnen

Um eine Aussage über die Prognose von Patientinnen, welche an einem Mammakarzinom erkrankt sind, treffen zu können, bedient man sich verschiedener Prognoseparameter. Diese charakterisieren das Tumorstadium und/oder die Biologie des Tumors und korrelieren mit dem Krankheitsverlauf. Durch sie kann ein Rezidiv- und Metastasenrisiko abgeschätzt werden, was für die Festlegung einer individuell abgestimmten Therapie unerlässlich ist.

3.2.2 TNM-Stadium und seine Komponenten

Sowohl das postoperative Tumorstadium pTNM als auch die einzelnen Komponenten Tumorgroße, Lymphknotenstatus und Metastasen korrelieren deutlich mit den Überlebensdaten. Mit fortschreitendem Stadium nimmt die Überlebenswahrscheinlichkeit der jeweiligen Patientengruppe ab. Die Tabellen 1 bis 4 zeigen den Einfluß der einzelnen Parameter auf das Überleben, die Abbildungen 2 bis 5 die entsprechenden Überlebenskurven.

Tabelle 1: Überleben in Beziehung zur Tumorgroße T1-T4 ($p = 0,0219$)

	pT1	pT2	pT3	pT4
Anzahl der Patienten	18	61	17	7
verstorbene Patienten	5	33	10	5
mittl.Überleben (Jahre)	9,9	7,7	6,2	4,4
5 J-Ü-W'keit (%)	83	62	47	29
10 J-Ü-W'keit (%)	72	48	41	29

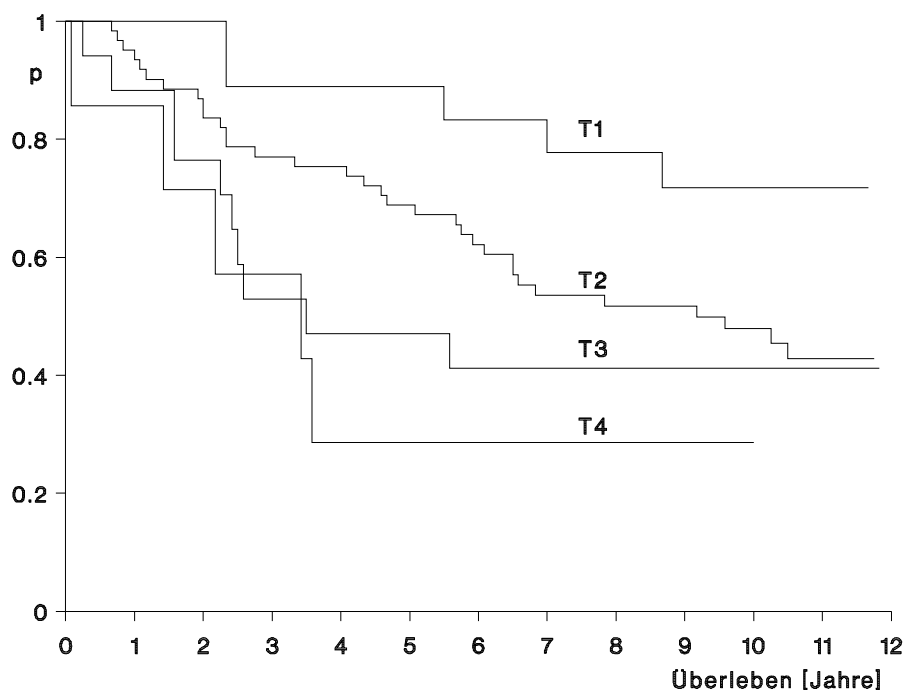


Abbildung 2: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die Tumorgroße pT

Tabelle 2: Überleben in Beziehung zum Lymphknotenstatus ($p = 0,0002$)

	pN0	pN1
Anzahl der Patienten	51	51
verstorbene Patienten	17	35
mittl.Überleben (Jahre)	9,3	6,0
5 J-Ü-W'keit (%)	80	51
10 J-Ü-W'keit (%)	70	31

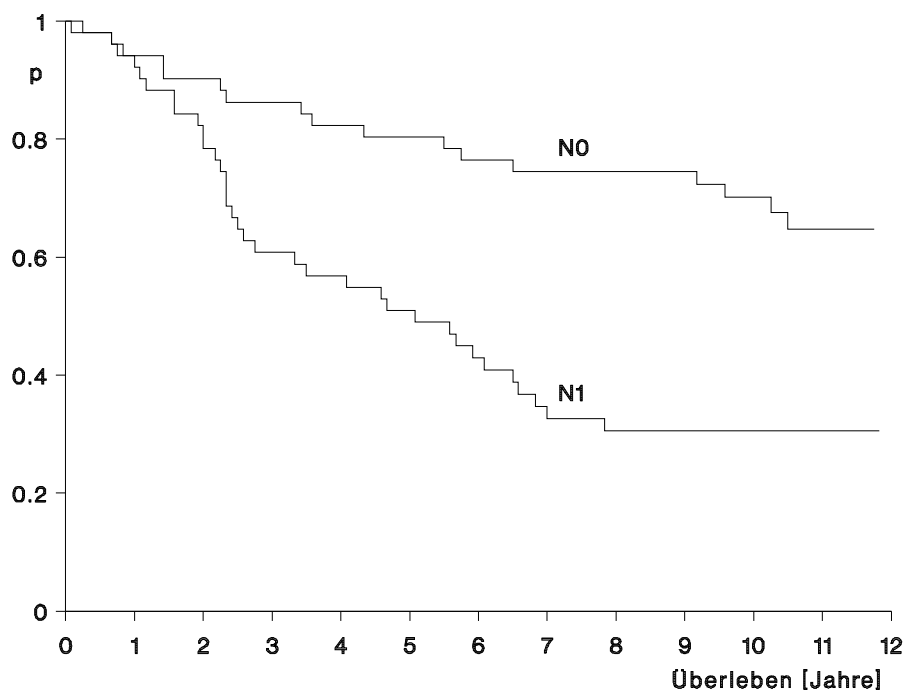


Abbildung 3: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für den Lymphknotenstatus

Tabelle 3: Überleben in Beziehung zur Fernmetastasierung ($p = 0,0009$)

	M0	M1
Anzahl der Patienten	94	8
verstorbene Patienten	45	8
mittl. Überleben (Jahre)	8,0	3,6
5 J-Ü-W'keit (%)	69	25
10 J-Ü-W'keit (%)	54	0

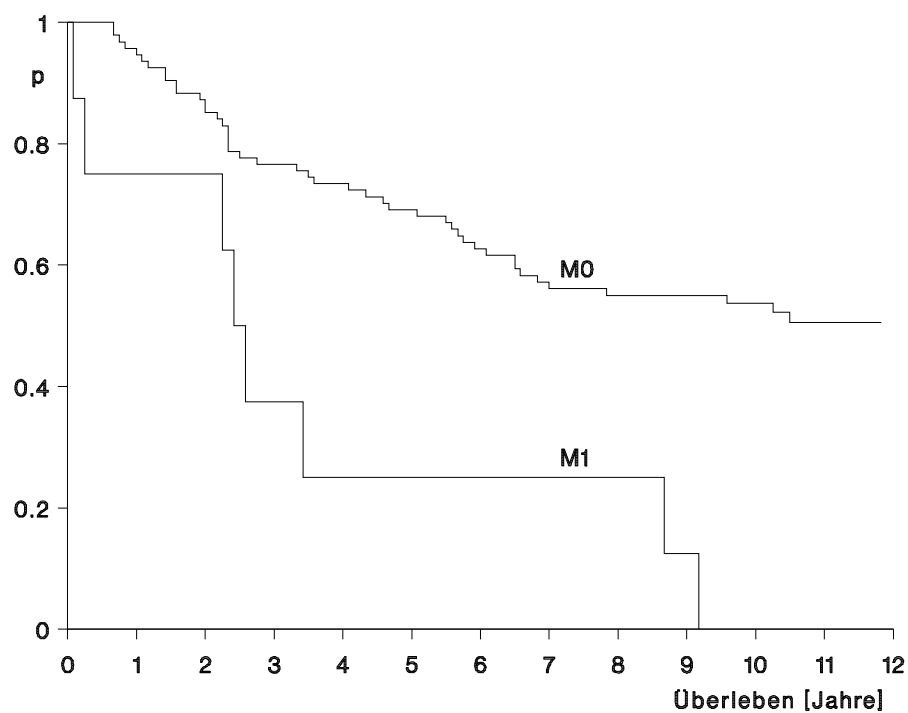


Abbildung 4: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für den Metastasenstatus M

Tabelle 4: Überleben in Beziehung zum Tumorstadium ($p = 0,0001$)

	pTNM 1	pTNM 2	pTNM 3	pTNM 4
Anzahl der Patienten	13	68	13	8
verstorbene Patienten	1	35	9	8
mittl.Überleben (Jahre)	11,2	7,8	5,4	3,6
5 J-Ü-W'keit (%)	100	69	38	25
10 J-Ü-W'keit (%)	92	51	31	0

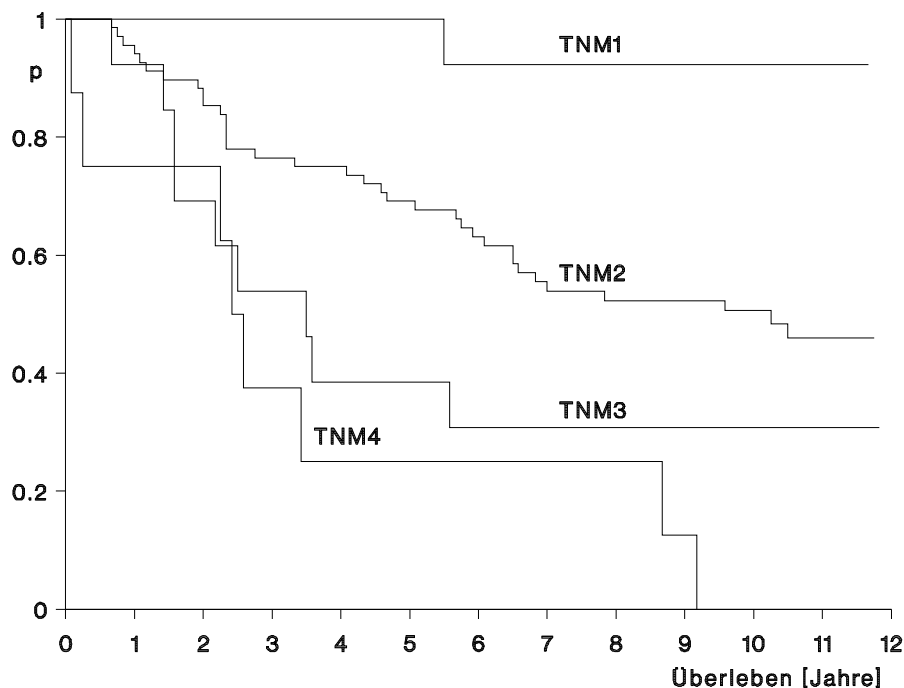


Abbildung 5: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für das Tumorstadium pTNM

3.2.3 Tumorgradierung und seine Komponenten

Die Gradierung in Beziehung zum Überleben ist in Tabelle 5 dargestellt. Die Einzelkomponenten Mitoseaktivität, Kernpleomorphie und tubuläre Differenzierung werden in den

Tabellen 6-8 berücksichtigt, die entsprechenden Überlebenskurven in den Abbildungen 6-9. Es konnte eine deutliche Korrelation der Überlebenszeiten mit dem postoperativen Tumorstadium der Patientinnen nachgewiesen werden ($p = 0,0001$). Auch die Einzelfaktoren haben signifikanten Einfluß auf das Überleben. Sowohl der Lymphknotenstatus ($p = 0,0002$) als auch die Tumorgröße ($p = 0,0219$) und der Metastasenstatus ($p = 0,0009$) bestätigen sich als nützliche Prognosefaktoren.

Tabelle 5: Überleben in Beziehung zur Gradierung ($p = 0,0018$)

	G1	G2	G3
Anzahl der Patienten	17	48	37
Verstorbene Patienten	5	21	26
mittl.Überleben (Jahre)	9,2	8,6	5,8
5 J-Ü-W'keit (%)	76	75	49
10 J-Ü-W'keit (%)	71	58	32

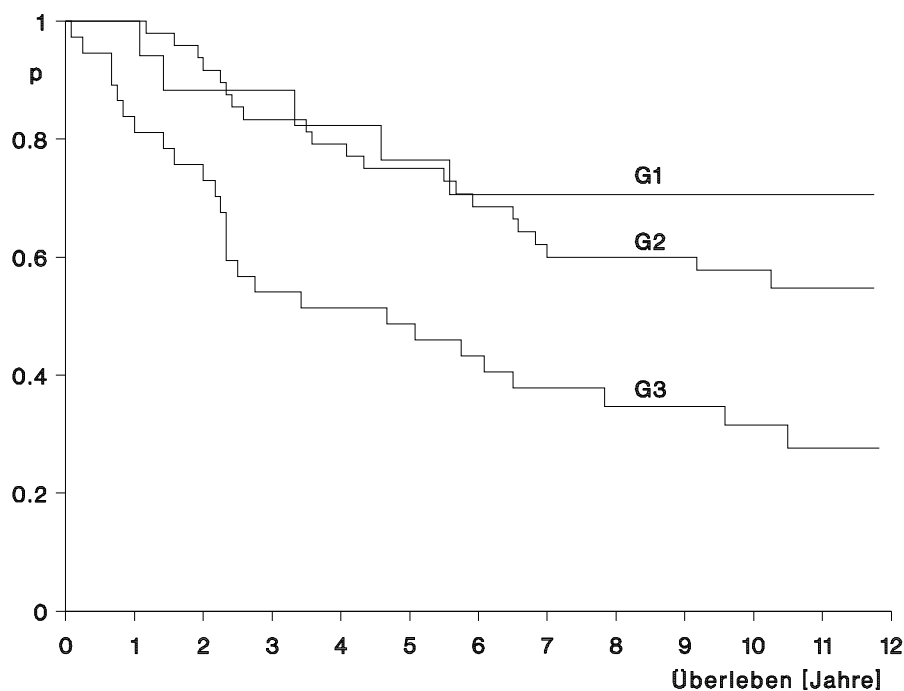


Abbildung 6: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die Gradierung

Tabelle 6: Überleben in Beziehung zur Mitoserate ($p = 0,0024$)

	MIT 1	MIT 2	MIT 3
Anzahl der Patienten	45	34	17
verstorbene Patienten	16	20	12
mittl.Überleben (Jahre)	9,1	7,2	5,2
5 J-Ü-W'keit (%)	78	65	35
10 J-Ü-W'keit (%)	66	41	35

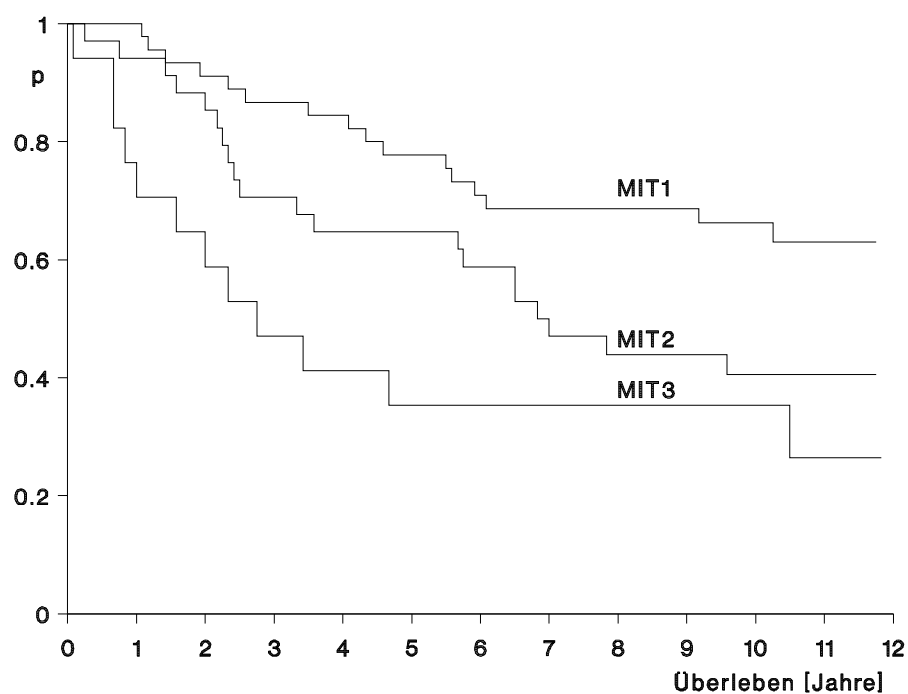


Abbildung 7: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die Mitoserate

Tabelle 7: Überleben in Beziehung zur Kernpleomorphie ($p = 0,0392$)

	KP1	KP2	KP3
Anzahl der Patienten	7	38	52
verstorbene Patienten	2	15	32
mittl.Überleben (Jahre)	9,2	8,8	6,7
5 J-Ü-W'keit (%)	71	79	56
10 J-Ü-W'keit (%)	71	60	42

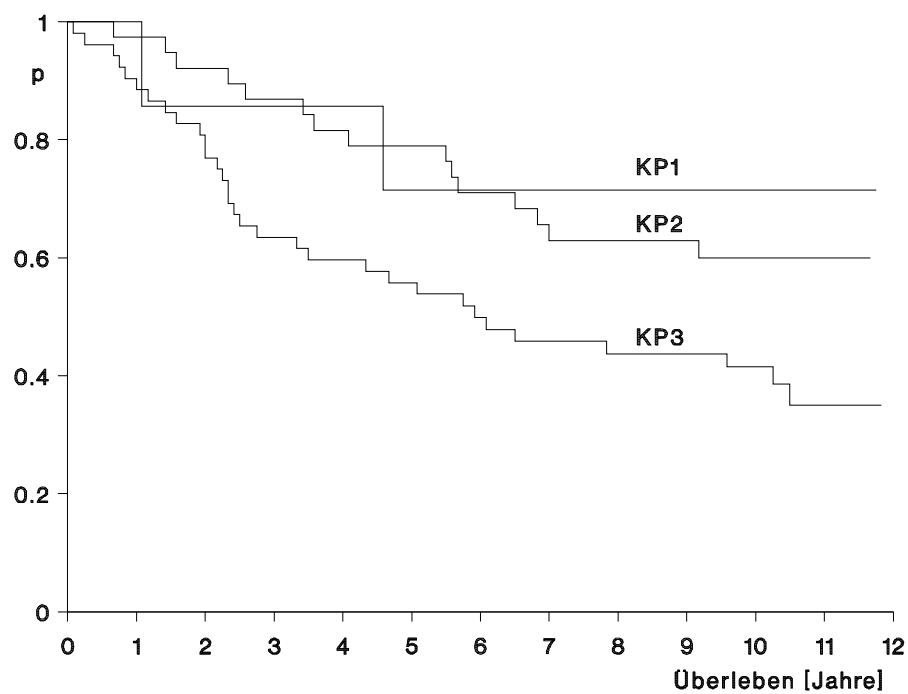


Abbildung 8: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die Kernpleomorphie

Tabelle 8: Überleben in Beziehung zur tubulären Differenzierung ($p = 0,1585$)

	TD 1	TD 2	TD 3
Anzahl der Patienten	4	27	60
verstorbene Patienten	0	13	35
mittl.Überleben (Jahre)	11,8	7,9	7,1
5 J-Ü-W'keit (%)	100	70	58
10 J-Ü-W'keit (%)	100	55	43

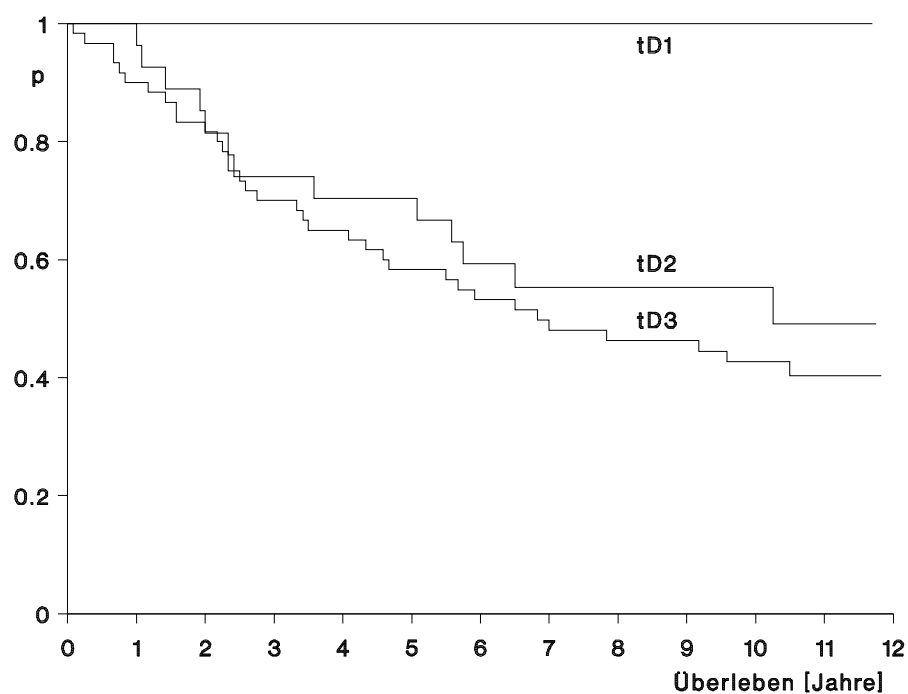


Abbildung 9: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für tubuläre Differenzierung

3.2.4 Biochemischer Hormonrezeptorenstatus

Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit dem biochemisch bestimmten Hormonrezeptorstatus verglichen. Beim Östrogenrezeptor ($p = 0,2461$, Tabelle 9) konnte im Unterschied zum

Progesteronrezeptor ($p = 0,0251$, Tabelle 10) kein statistisch signifikante Relevanz nachgewiesen werden, so dass aus prognostischer Sicht eine wertvollere Aussage vom Progesteronrezeptor zu erwarten ist. Die entsprechenden Überlebenskurven sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

Tabelle 9: Überleben in Beziehung zum Östrogenrezeptorstatus ($p = 0,2461$)

	Östrogenrezeptor	
	negativ	positiv
Anzahl der Patienten	25	78
verstorbene Patienten	13	40
mittl.Überleben (Jahre)	6,9	7,9
5 J-Ü-W'keit (%)	56	68
10 J-Ü-W'keit (%)	48	50

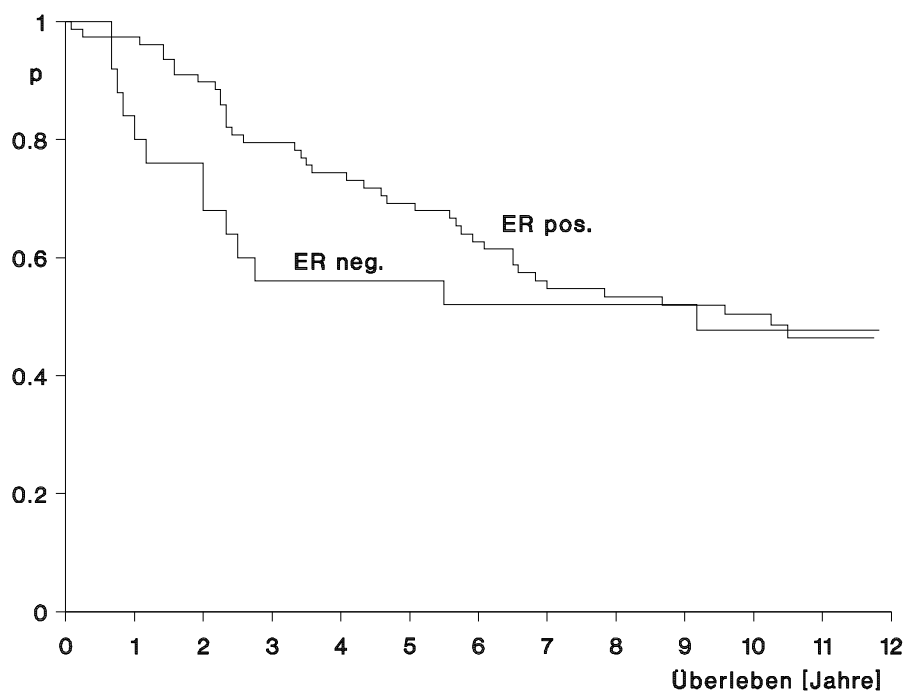


Abbildung 2: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für den Östrogenrezeptorstatus

Tabelle 10: Überleben in Beziehung zum Progesteronrezeptorstatus ($p = 0,0251$)

	Progesteronrezeptor	
	negativ	positiv
Anzahl der Patienten	48	55
verstorbene Patienten	29	24
mittl.Überleben (Jahre)	6,7	8,6
5 J-Ü-W'keit (%)	54	76
10 J-Ü-W'keit (%)	44	55

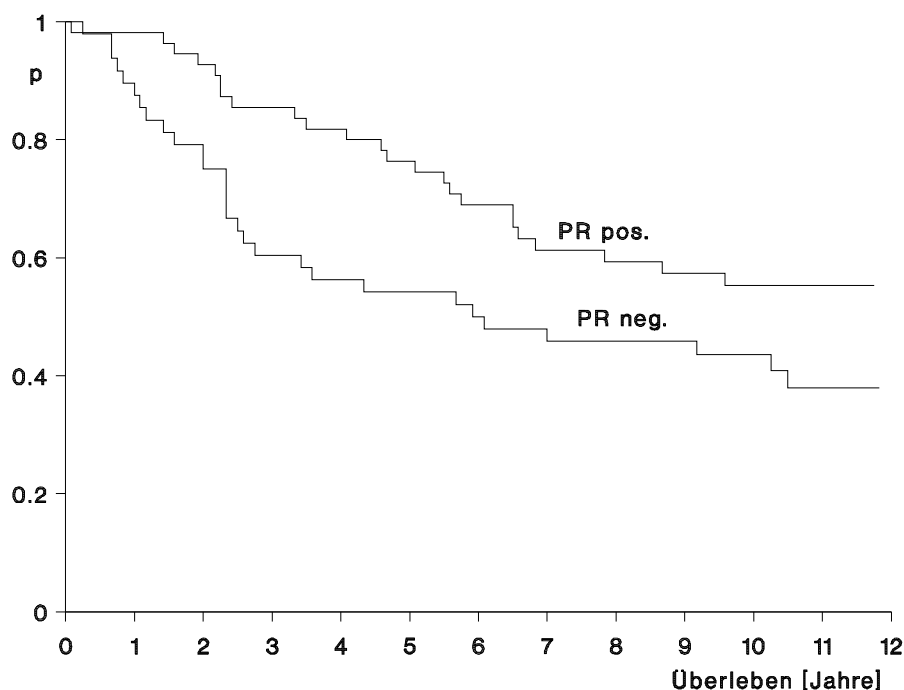


Abbildung 3: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für den Progesteronrezeptorstatus

Zusammenfassend haben sich vor allem der Lymphknotenstatus, die Tumorgröße und die biochemische Bestimmung des Hormonrezeptorgehaltes in der Praxis bewährt, sie sind als Prognoseparameter sowohl in ihrer Aussagekraft als auch in der Objektivität ihrer Bestimmung überzeugend.

3.2.5 Das p16-Protein und seine Parameter

Die Beziehung zwischen dem Prozentsatz der Zellkerne mit p16-Expression, der Färbeintensität, dem Immunreaktiven Score und der Zytoplasmafärbung sind in den Tabellen 11-14 und den Abbildungen 12-15 dargestellt.

Tabelle 11: Überleben in Beziehung zum Prozentsatz p16-positiver Zellkerne ($p = 0,8046$)

	Prozentsatz der Zellkerne mit p16-Expression (PP)		
	1 (<10%)	2 (10-50 %)	3 (> 50 %)
Anzahl der Patienten	18	50	35
verstorbene Patienten	9	28	18
mittl.Überleben (Jahre)	7,2	7,5	8,1
5 J-Ü-W'keit (%)	61	66	69
10 J-Ü-W'keit (%)	50	45	57

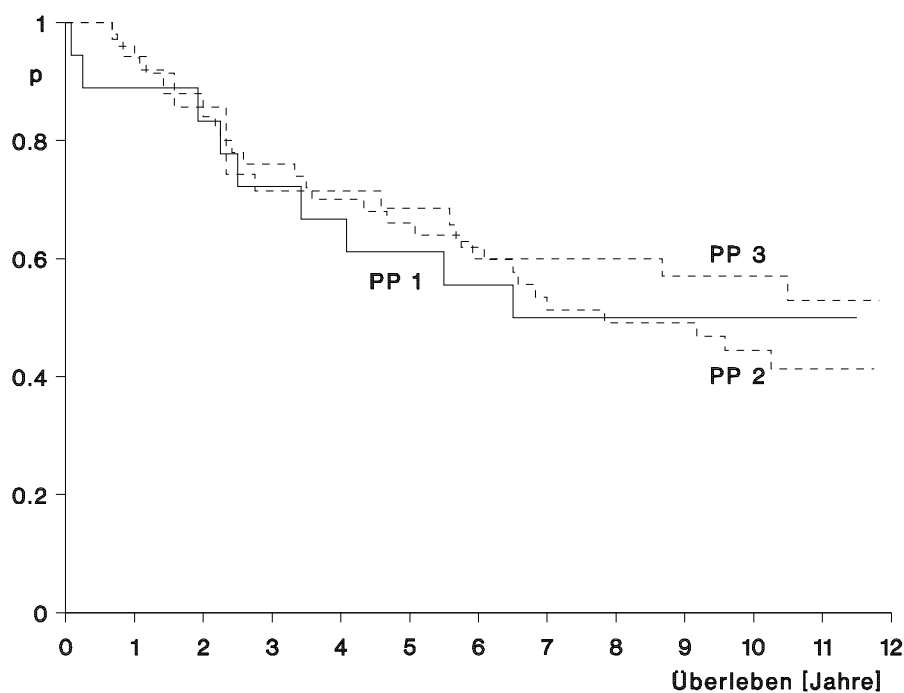


Abbildung 4: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für den Prozentsatz an p16-positiven Zellkernen (PP)

Tabelle 12: Überleben in Beziehung zu der Färbeintensität der p16 Expression ($p = 0,4050$)

	p16-Färbeintensität (SI)		
	1 (keine/schwach)	2 (mäßig)	3 (stark)
Anzahl der Patienten	14	46	43
verstorbene Patienten	4	25	24
mittl.Überleben (Jahre)	9,0	7,6	7,3
5 J-Ü-W'keit (%)	79	65	63
10 J-Ü-W'keit (%)	71	47	46

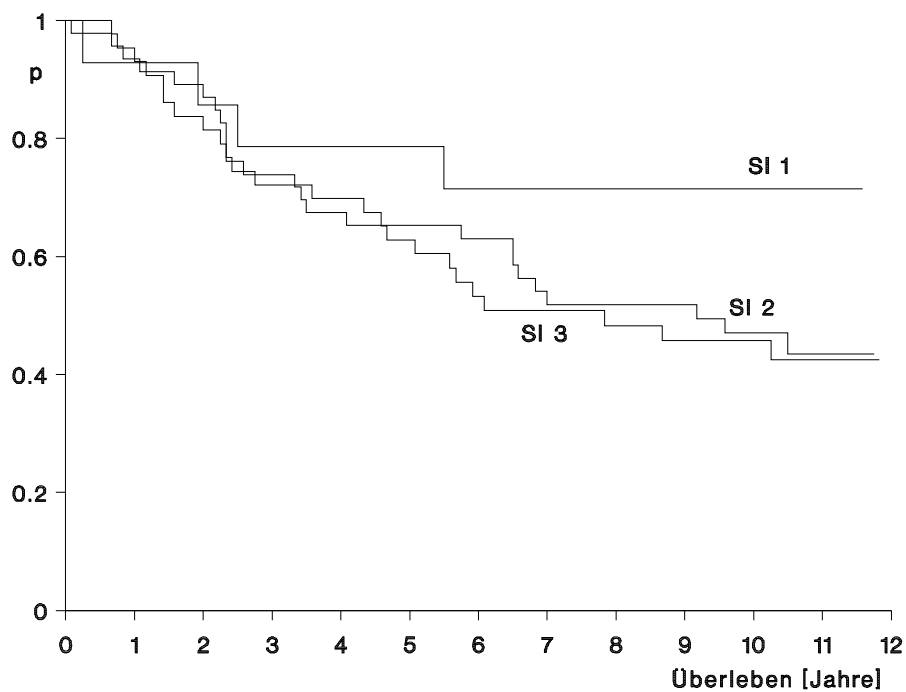


Abbildung 5: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier für die p16-Färbeintensität (SI)

Tabelle 13: Überleben in Beziehung zum Immunreaktiven Score für p16 ($p = 0,3141$)

	IRS 1-2	IRS 3-4	IRS 6	IRS 9
Anzahl der Patienten	19	29	31	24
verstorbene Patienten	9	14	19	11
mittl.Überleben (Jahre)	7,5	8,3	6,3	8,5
5 J-Ü-W'keit (%)	63	76	52	75
10 J-Ü-W'keit (%)	63	51	41	58

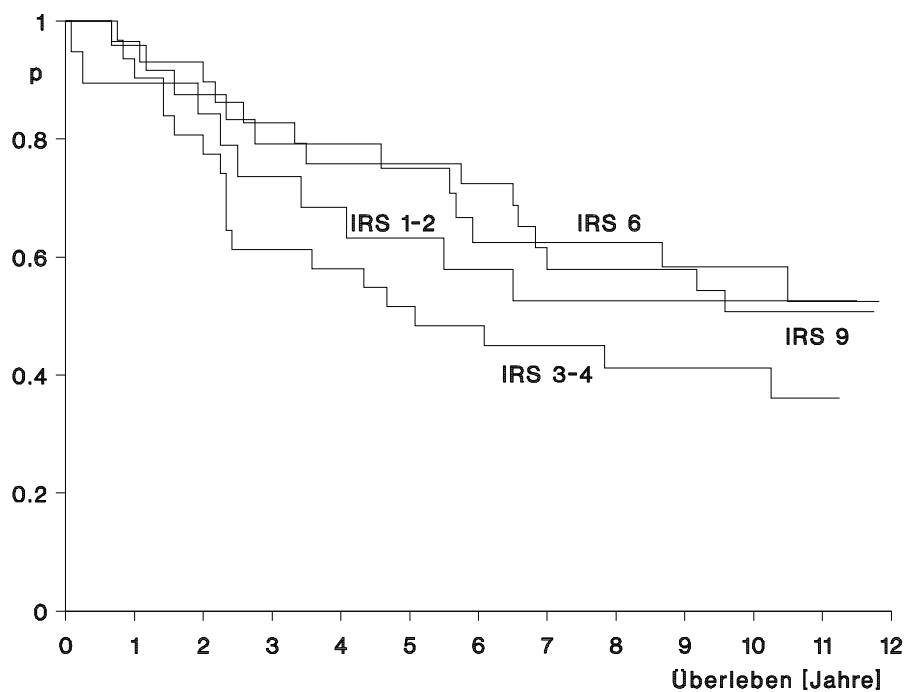


Abbildung 6: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für den immunreaktiven Score für p16 (IRS)

Tabelle 14: Überleben in Beziehung zur p16-Zytoplasmafärbung (p-Wert = 0,0013)

	Zytoplasmafärbung negativ	Zytoplasmafärbung positiv
Anzahl der Patienten	63	40
verstorbene Patienten	26	27
mittl.Überleben (Jahre)	8,7	6,1
5 J-Ü-W'keit (%)	75	53
10 J-Ü-W'keit (%)	59	35

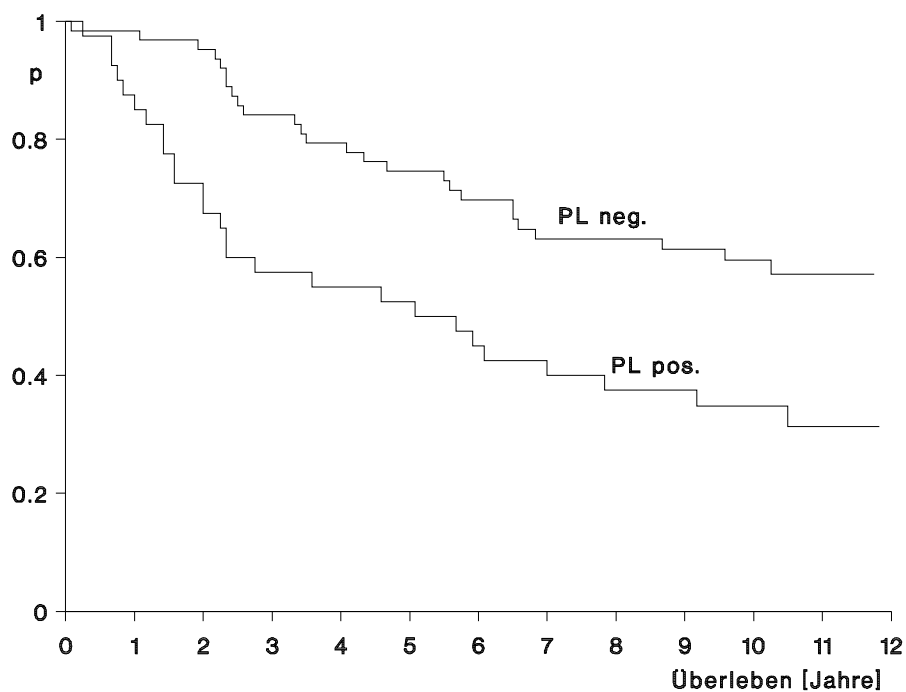


Abbildung 7: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die p16-Zytoplasmafärbung (PL)

Eine Vorhersage der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen aufgrund des Prozentsatzes an Zellkernen die das p16-Protein (p16PP) exprimiert haben, ist nicht möglich, da keine Korrelation zwischen den Parametern existiert. Es besteht keine Korrelation zwischen der Färbeintensität des p16-Markers in den Zellkernen (p16SI) und dem Überleben, jedoch ist zu erkennen, dass die Patientinnen, die keine oder nur eine schwache p16-Färbeintensität aufweisen, eine im Trend bessere Überlebenswahrscheinlichkeit haben.

Der Immunreaktive Score, der sich nach dem Anteil positiv gefärbter Zellen multipliziert mit der jeweiligen Färbeintensität ($p16PP \cdot p16SI$) berechnet, erlaubt empfindlichere Signifikanztests unter Berücksichtigung kleiner Trends in beiden Komponenten. Trotzdem konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesem sog. Remmele-Score und dem Überleben der Patientinnen gefunden werden.

Von den 103 Patientinnen zeigen 40 eine positive Zytoplasmareaktion. Die Patientinnen mit Zytoplasmaanfärbung haben eine deutlich schlechtere Prognose als Patientinnen ohne Zytoplasmaanfärbung. So sind 60% der Patientinnen mit gefärbtem Zytoplasma verstorben bzw. ist ihre Wahrscheinlichkeit nach 10 Jahren noch zu leben, stark reduziert.

3.3 Korrelation ausgewählter Parameter

3.3.1 Beziehung zwischen den einzelnen p16-Parametern untereinander

Um zu untersuchen, wie sich die einzelnen p16-Parameter untereinander verhalten, wurden sie in Beziehung zueinander gesetzt. Der immunreaktive Score (IRS) wurde hier nicht berücksichtigt, da er aufgrund seiner Definition eine zusammengesetzte Größe und keine Grundgröße darstellt.

Die Zytoplasmareaktion korreliert sowohl mit dem Prozentsatz gefärbter Zellkerne ($p = 0,0013$) als auch mit der Färbeintensität ($p = 0,0001$) signifikant (Tab. 15-16). Auch letztere beiden Größen sind signifikant korreliert ($p < 0,0001$, Tab. 17).

Tabelle 15: Beziehung zwischen der Zytoplasmafärbung (p16PL) und dem Prozentsatz positiver Zellen (p16PP) ($p = 0,0013$)

p16PL p16PP	Negativ	Positiv	Total
<10%	17	1	18
10%-50%	31	19	50
>50%	15	20	35
Total	63	40	103

Tabelle 16: Beziehung zwischen der Zytoplasmafärbung (p16PL) und der Färbeintensität der Kernfärbung (p16SI) ($p = 0,0001$)

p16PL p16SI	Negativ	Positiv	Total
1	13	1	14
2	34	12	46
3	16	27	43
Total	63	27	103

Tabelle 17: Beziehung zwischen der Färbeintensität der Kernfärbung (p16SI) und dem Prozentsatz positiver Zellen (p16PP) ($p < 0,0001$)

p16SI p16PP	1	2	3	Total
<10%	12	6	0	18
10%-50%	1	28	21	50
>50%	1	12	22	35
Total	14	46	43	103

3.3.2 Beziehung zwischen der p16-Kernreaktion und den übrigen klinischen und morphologischen Parametern

Die Ergebnisse der p16-Reaktionen am Zellkern waren lediglich mit der Tumorgroße signifikant korreliert; für p16PP, das hier exemplarisch dargestellt wird, betrug der entsprechende p-Wert z.B. $p = 0,0077$ (Tabelle 18).

Tabelle 18: Beziehung zwischen der Tumorgroße pT und dem Prozentsatz positiver Zellen (p16PP) ($p = 0,0077$)

pT p16PP	1	2	3	4	Total
<10%	3	9	2	4	18
10%-50%	4	32	11	3	50
>50%	11	20	4	0	35
Total	18	61	17	7	103

Zu den übrigen Parametern des Staging, des Grading oder des Hormonrezeptorstatus konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden.

3.3.3 Beziehung zwischen der p16-Zytoplasmareaktion und den übrigen klinischen und morphologischen Parametern

In der immunhistochemischen Interpretation der p16-Analyse wurde bis vor kurzem die positive Reaktion des Zytoplasmas auf p16 als unspezifisch betrachtet und weitgehend ignoriert, da das p16-Protein in seiner Funktion als Zellzyklusinhibitor und Tumorsuppressor eigentlich im Zellkern aktiv ist.

Nachdem aber von Emig et al. (1998)⁶⁴ bereits vor einiger Zeit auf eine Beziehung einer p16-Zytoplasmareaktion zu Differenzierungsmerkmalen hingewiesen worden war (s. Diskussion), soll diesem Aspekt auch hier, gerade auch im Hinblick auf die univariate prognostische Relevanz (Tabelle 14, Abbildung 15, s.o.) besonders Rechnung getragen werden.

Mit den Staging-Parametern pT und pTNM war p16PL jeweils unkorreliert ($p > 0,05$); beim Lymphknotenstatus allerdings fand sich ein leichter, nicht statistisch signifikanter Trend, der hier exemplarisch in Tabelle 19 dargestellt werden soll.

Tabelle 19: Beziehung zwischen dem Lymphknotenstatus und p16PL ($p = 0,2237$)

p16PL \ pN	Negativ	Positiv	Total
negativ	34	28	62
positiv	17	23	40
total	51	51	102

Mit den Differenzierungsparametern der Gradierung und den Hormonrezeptoren ergaben sich hingegen verschiedene deutliche Korrelationen des p16PL-Status; lediglich für die tubuläre Differenzierung waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Sie sind in den folgenden Tabellen 20- 23 dargestellt.

Tabelle 20: Beziehung zwischen dem Grading und p16PL ($p = 0,0067$)

P16PL \ GRADING	1	2	3	Total
Negativ	12	35	15	62
Positiv	5	13	22	40
Total	17	48	37	102

Tabelle 21: Beziehung zwischen der Mitoserate und p16PL ($p = 0,0013$)

MIT p16PL	1	2	3	Total
Negativ	35	18	5	58
Positiv	10	16	12	38
Total	45	34	17	96

Tabelle 22: Beziehung zwischen der Kernpleomorphie p16PL ($p = 0,0259$)

KP p16PL	1	2	3	Total
Negativ	4	29	25	58
Positiv	3	9	27	39
Total	7	38	52	97

Tabelle 23: Beziehung zwischen der tubulären Differenzierung und p16PL ($p = 0,01743$)

TD p16PL	1	2	3	Total
Negativ	1	19	34	54
Positiv	3	8	26	37
Total	4	27	60	91

Im Bezug auf den Hormonrezeptorstatus ist die Korrelation mit der Zytoplasmafärbung am Klarsten, sowohl beim Östrogenrezeptor als auch beim Progesteronrezeptor. Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus weisen häufiger eine Zytoplasmafärbung auf, wie in den Tabellen 24 und 25 dargestellt.

Tabelle 24: Beziehung zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und p16PL ($p = 0,0001$)

ER p16PL	Negativ	Positiv	Total
Negativ	7	56	63
Positiv	18	22	40
Total	25	78	103

Tabelle 25: Beziehung zwischen dem Progesteronrezeptorstatus und p16PL ($p < 0,0001$)

PR p16PL	Negativ	Positiv	Total
Negativ	19	44	63
Positiv	29	11	40
Total	48	55	103

3.4 Multivariate Analyse: Cox-Modell

Um die morphologischen Parameter, die Komponenten des Tumorstadiums und die p16 Expressionsparameter auf ihre sich ergänzende prognostischen Fähigkeiten und ihre Unabhängigkeit voneinander hin zu untersuchen, wurde eine multivariate Überlebensanalyse mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. Die Ergebnisse des Modells, in dem alle prognostischen Faktoren inklusive der neuen p16 Parameter mit einbezogen wurden, sind in den folgenden Tabellen schrittweise dargestellt; zunächst ist die Ausgangssituation vor Schritt 1 dargestellt (Tabelle 26). In dieser kommt dem Lymphknotenstatus (pN) die höchste univariate Relevanz zu, der somit als erster in das Cox-Modell aufgenommen wird (Tabelle 27).

Tabelle 26: Multivariates Cox-Modell vor Schritt 1

vor Schritt 1	χ^2 Enter-Wert	χ^2 Remove-Wert	p-Wert
pN	14,82		0,0001
pT	8,35		0,0039
MIT	7,33		0,0068
GRAD	5,29		0,0214
PR	4,53		0,0334
KP	3,16		0,0755
TD	2,78		0,0952
p16PL	2,11		0,1464
p16SI	1,18		0,2766
p16PP	0,56		0,4544
ER	0,5		0,4797
p16IRS	0		0,9759

Tabelle 27: Multivariates Cox-Modell nach Schritt 1

Schritt 1	χ^2 Enter-Wert	χ^2 Remove-Wert	p-Wert
pN		14,82	0,0001
PR	7,62		0,0058
MIT	5,27		0,0216
pT	5,06		0,0245
GRAD	3,11		0,0776
ER	2,36		0,1243
p16PL	1,78		0,1819
KP	1,56		0,2112
p16SI	0,61		0,4366
TD	0,37		0,5422
p16PP	0,13		0,7157
p16IRS	0,03		0,8633

Da der Progesteronrezeptorenstatus nach Schritt 1 über die größte verbliebene univariate prognostische Bedeutung verfügte, wurde er als zweite Größe in das Cox-Modell aufgenommen (Tabelle 28).

Tabelle 28: Multivariates Cox-Modell nach Schritt 2

Schritt 2	χ^2 Enter-Wert	χ^2 Remove-Wert	p-Wert
pN		17,91	<0,0001
PR		7,62	0,0058
pT	6,81		0,009
MIT	3,14		0,0765
GRAD	1,78		0,1817
KP	0,54		0,4616
p16SI	0,8		0,3721
p16PP	0,31		0,5777
p16PL	0,25		0,6159
TD	0,15		0,6974
ER	0,02		0,8755
p16IRS	0		0,9687

In Schritt 3 folgte noch pT, die postoperative Tumorgroße. Danach wurden keine weiteren Parameter mehr in das Modell aufgenommen, da das Aufnahmeniveau der multivariaten Überlebensanalyse, $p = 0,10$, nicht mehr erreicht wurde. Das in Tabelle 29 dargestellte Modell stellt somit das Endergebnis der multivariaten Analyse dar.

Tabelle 29: Multivariates Cox-Modell nach Schritt 3

Schritt 3	χ^2 enter-Wert	χ^2 Remove-Wert	p-Wert
pN		15,71	0,0001
PR		9,37	0,0022
pT		6,81	0,009
übrige	< 2,63		> 0,10

Zusammenfassend sagt das Modell somit aus, daß sich der Lymphknotenstatus, der Progesteronrezeptorstatus und die Tumorgroße in dieser Reihenfolge abnehmender Bedeutung prognostisch ergänzen. Im folgenden soll dargestellt werden, inwieweit sich das Ergebnis des Modells bei einer Validierung bestätigen ließ.

Da pN und PR als gestufte Größen vorlagen, bot sich an, sie in ihren vier Kombinationsmöglichkeiten pN0/PR+, pN0/PR-, pN1/PR+ und pN1/PR- in einer gemeinsamen Grafik in Kaplan-Meier-Kurven darzustellen. Diese Vorgehensweise führte darüber hinaus zu einer im Prinzip erwünschten relativ gleichmäßigen Verteilung der Patientinnen auf die vier Gruppen. In Tabelle 30 sind hierzu zunächst die notwendigen Kenndaten dargestellt.

Tabelle 30: Überleben im Vergleich zum Progesteronrezeptorstatus bei Lymphknotenbefall N0: $p = 0,7083$, N1: $p = 0,0016$

	N0/PR-	N0/PR+	N1/PR-	N1/PR+
Anzahl der Patienten	25	24	23	28
verstorbene Patienten	7	6	19	13
mittl. Überleben (Jahre)	9,1	9,6	4,2	8,0
5 J-Ü-W'keit (%)	72	88	35	64
10 J-Ü-W'keit (%)	72	75	17	53

Der Verlauf der Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 16 veranschaulicht noch einmal deutlich die schlechtere Prognose von Patientinnen mit PR-negativen Tumoren, die bei positivem Lymphknotenbefund (N1, $p > 0,05$) allerdings stärker ausgeprägt ist als bei negativem (N0, $p = 0,0016$).

Die Hinzunahme der im dritten Schritt des Cox-Modells aufgenommenen Tumorgroße ist nur unter Hinzuziehung einer multivariaten Funktion möglich, die sich aus dem Cox-Modell ergibt. Anderenfalls würde die Zahl der zu unterscheidenden Gruppen ($n = 16$) dazu führen, daß diese nur jeweils mit wenigen Patientinnen besetzt wären. Hieraus würde sich eine nur bedingte Aussagekraft der Validierung ergeben.

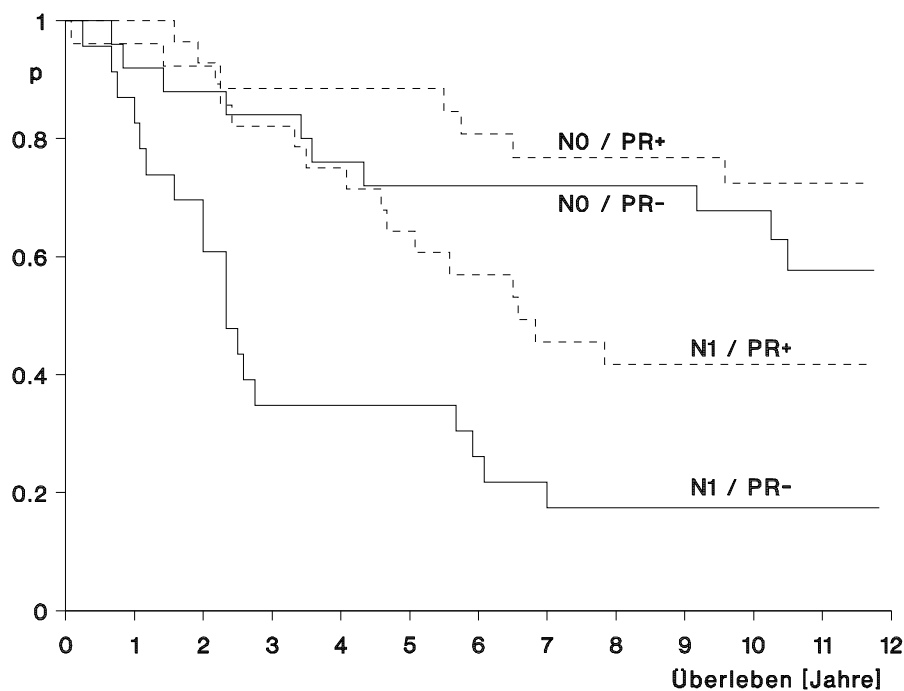


Abbildung 16: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die Kombination aus Lymphknotenstatus und Progesteronrezeptorstatus

Deswegen wurde nun aus den Ergebnissen des Cox-Modells eine multivariate Funktion gebildet; hierzu wurden die im Cox-Modell den aufgenommenen Größen zugeordneten Koeffizienten mit zugrunde gelegt. Sie dienen zur prognostischen und skalierenden Wichtung der aufgenommenen Größen; hier lauteten sie für pN: 1,34, für PR: -0,99 und für pT: 0,55. Somit ist es möglich, pro Schritt des Cox-Modells auch neue „multivariate Parameter“ (MP1 und MP2) zu definieren; den Patientinnen wird pro multivariatem Parameter jeweils eine neue Maßzahl zugeordnet. Die entsprechenden Formeln lauten

$$\begin{aligned} \text{MP1} &= 1,34 * \text{pN} - 0,99 * \text{PR} \\ \text{MP2} &= 1,34 * \text{pN} - 0,99 * \text{PR} + 0,55 * \text{pT} \end{aligned}$$

Der MP1 führte gegenüber dem Lymphknotenstatus N zu keinen Veränderungen der Kaplan-Meier-Kurven, der MP2 nur zu marginalen ($p > 0,05$, Abb. 17). Dies bedeutet, daß bei bekannten Lymphknotenstatus und bekanntem biochemisch erhobenen PR-Status der Tumorgroße keine entscheidende additive prognostische Relevanz mehr zukommt.

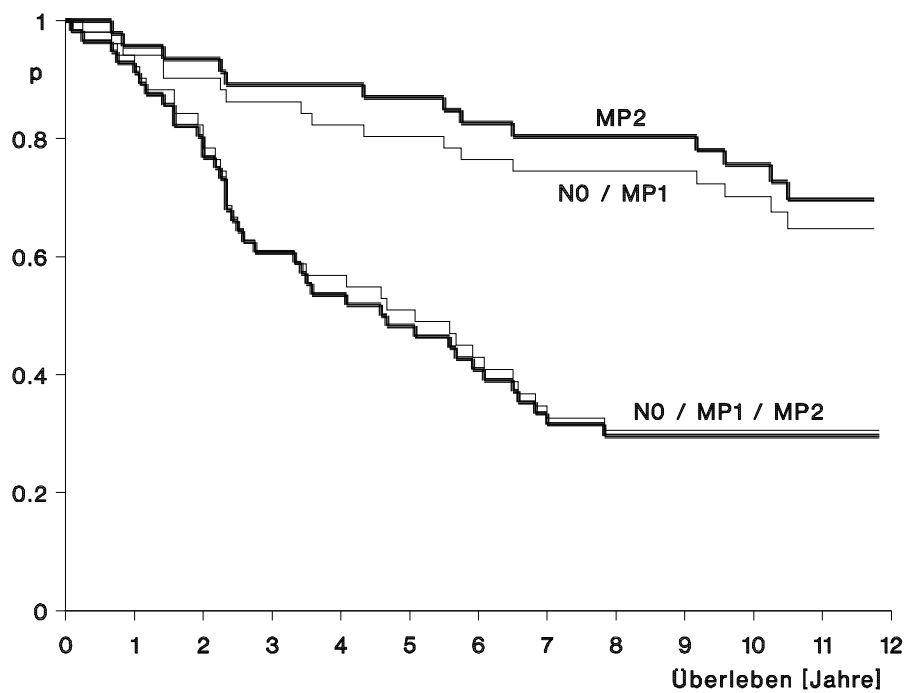


Abbildung 8: Überlebenskurven nach Kaplan-Meier für die Kombination aus Lymphknotenstatus, Progesteronrezeptorstatus und Tumorgröße (MP2)

Anderen Größen, darunter auch denen, die aus der p16-Expression abgeleitet werden konnten, kommt abschließend keine ergänzende prognostische Bedeutung zu.

4 DISKUSSION

Prognosefaktoren dienen dem Zweck, den klinischen Verlauf des Patienten individuell mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit vorausszusagen und demzufolge Therapiestrategien zu ermöglichen, mit denen man Übertherapien oder Untertherapien möglichst vermeiden kann. Dies gilt insbesondere auch für das Mammakarzinom, wo aufgrund der Vielseitigkeit der Krankheitsverläufe unterschiedliche Therapieansätze besonders wichtig sind und es darum geht, für jede Patientin eine eigenes Risikoprofil zu entwickeln.

Ziel dieser Studie war es, vergleichend zu den bereits etablierten prognostischen Faktoren beim Mammakarzinom in einer retrospektiven Studie die prognostische Relevanz der Expression des p16-Proteins zu untersuchen. Zunächst werden im Folgenden die anerkannten Prognoseparameter der Routinediagnostik wie TNM-Stadium, histologische Gradierung und Hormonrezeptorstatus diskutiert und schließlich mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Analyse des p16-Proteins unter Zugrundelegung der aktuellen Literatur verglichen.

4.1 Anerkannte Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

4.1.1 Tumorstaging

Das Tumorstaging gilt als der wichtigste prognostische Faktor beim Mammakarzinom. Neben der Tumorgöße und dem Lymphknotenstatus geht auch der Metastasenstatus in das Tumorstaging ein. Dies sind alle Faktoren, die die Tumorausbreitung, beziehungsweise das Krankheitsstadium wiedergeben. Im Allgemeinen gilt, dass die Prognose umso günstiger ist, je geringer das TNM-Stadium ist. Seit vielen Jahren ist dies in Bezug auf das Mammakarzinom unverändert geblieben, da es sich offenbar in dieser Form bewährt hat. So findet sich die prognostische Validität des postoperativen Tumorstadiums in einer Vielzahl von Arbeiten bestätigt ^{65, 66, 67}, Layfield et al. mit 236 ⁶⁸, wobei in derartigen Studien bis zu 94000 Patientinnen zusammengefasst sind ⁶⁹.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine mit der Literatur übereinstimmende deutliche Korrelation mit den Überlebenszeiten in Bezug auf das postoperative Tumorstadium der Patientinnen

nachgewiesen werden ($p = 0,0001$). Auch die Einzelfaktoren haben signifikanten Einfluß auf das Überleben. Sowohl der Lymphknotenstatus ($p = 0,0002$) als auch die Tumorgroße ($p = 0,0219$) und der Metastasenstatus ($p = 0,0009$) bestätigen sich als nützliche Prognosefaktoren, so wie in der Literatur auch einschlägig beschrieben^{70, 71, 72, 73}. Auf diese Weise ergibt sich die Berechtigung, indirekt darauf zu schließen, daß unser Patientenkollektiv, obwohl es nicht nach biometrischen Studienrichtlinien gewonnen wurde, keiner Selektion unterlegen haben dürfte, welche eine Beurteilbarkeit der Daten einschränkt.

Dennoch ist die TNM-Klassifikation offenbar noch nicht zu einer absolut zuverlässigen Prognoseplanung geeignet. Es bleiben nämlich trotz allem noch zu viele Fälle, die einen unerwarteten Verlauf nehmen; sei es eine T1N0-Konstellation mit schneller Progression und Tod der Patientin oder eine T3N1-Konstellation mit unerwartetem rezidivfreien Langzeitüberleben. Anscheinend spielen somit noch weitere Aspekte eine mit entscheidende Rolle.

4.1.2 Tumorigradung

Als weiterer anerkannter Prognoseparameter wird das histomorphologische Grading nach Bloom and Richardson (1957) verwendet; trotz einiger Modifikationen gehen nach wie vor die Aspekte der Gewebsdifferenzierung, der zytologischen Kernveränderungen und der Mitoserate semiquantitativ in dieses ein. Letztendlich soll es die Wachstumsgeschwindigkeit oder maligne Potenz des Tumors einzuschätzen helfen. Auch wenn die eingeschränkte Reproduzierbarkeit von ca. 70% bis 80%, die aufgrund der subjektiven Beurteilung besteht, bemängelt wird^{74, 75}, konnte eine signifikante Korrelation mit der Prognose in vielen großen Studien bestätigt werden^{76, 77, 78}.

Auch in dieser Arbeit war die Korrelation der Gradierung mit den Überlebensdaten deutlich vorhanden ($p = 0,0018$); eine hohe Korrelation bestand außerdem für die Mitoseaktivität ($p = 0,0024$). Auch bei der Kernpleomorphie ($p = 0,0392$) lassen sich unterschiedliche Patientengruppen bilden, deren Überleben mit zunehmender Entdifferenzierung abnimmt. Während die tubuläre Differenzierung, als Teil des Gradings, üblicherweise als Prognosefaktor anerkannt wird, konnte hier (wie auch schon bei Genestie et al.⁴¹) kein Zusammenhang mit der Überlebenswahrscheinlichkeit gefunden werden ($p = 0,1585$). Dies hängt vermutlich mit der zu geringen Anzahl an beobachteten Fällen in der hier als gut differenziert angesehenen Gruppe zusammen.

Insgesamt konnte also die Gültigkeit auch für die etablierten Faktoren der histomorphologischen Gradierung gezeigt werden.

4.1.3 Hormonrezeptoren

Zu den etablierten Prognosefaktoren gehört weiterhin auch der Hormonrezeptorstatus. Ein positiver Hormonrezeptorstatus korreliert unabhängig von der eingeleiteten adjuvanten Therapie mit einer besseren Prognose der Patientinnen^{79, 80, 81}. Zusätzlich erlaubt er eine Aussage über den Nutzen einer antihormonellen Therapie im Sinne eines prädiktiven Faktors⁸². Allerdings beschreiben auch einige Autoren nicht signifikante Korrelationen sowohl zwischen dem Östrogenrezeptorstatus als auch dem Progesteronrezeptorstatus und dem Überleben^{83, 84}. Man vermutet, dass der Progesteronrezeptor der bessere Indikator für eine gute Prognose ist, die Ansprechrate auf adjuvante systemische Therapie ist ebenfalls höher^{85, 86, 87}.

In dieser Arbeit korreliert nur der Progesteronrezeptorstatus ($p = 0,0142$), was auch mit Literaturangaben⁸⁸ übereinstimmt und sich mit dem Ergebnissen der Konsensuskonferenz St. Gallen 1998 deckt, in der die Bedeutung des Progesteronrezeptorstatus für die Unterteilung der einzelnen Risikokollektive aufgewertet wurde.

Zusammenfassend haben sich vor allem der Lymphknotenstatus, die Tumorgröße und die biochemische Bestimmung des Hormonrezeptorgehaltes in der Praxis bewährt, sie sind als Prognoseparameter sowohl in ihrer Aussagekraft als auch in der Objektivität ihrer Bestimmung überzeugend. Viele andere morphologischen Größen sind versuchsweise in Gebrauch (z.B. zur Proliferations- und Apoptoseanalyse, zur AgNOR-Quantifizierung, zur Darstellung von Adhäsionsmolekülen etc.), haben sich jedoch entweder wegen uneindeutiger bzw. nicht unwidersprochen gebliebener Aussagen oder methodischer Probleme nicht durchgesetzt. Eine gewisse Ausnahme scheint die biochemische Analyse von PAI-1 bzw. uPA zu sein, mit der sich in der Tat relevante Ergebnisse erzielen lassen, jedoch ist diese Bestimmung an fixiertem Material nicht möglich und soll daher im Rahmen der hier vorliegenden Studie nicht näher erläutert werden.

4.2 Das p16-Protein und seine Parameter

Auch heute noch bleibt die Rolle der wichtigsten Faktoren in der Zellzykluskaskade undurchsichtig, und deren prognostische Relevanz ist noch längstens nicht entschlüsselt. Über mögliche p16-Veränderungen beim Mammakarzinom ist wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem p16-Protein und dem Überleben der Brustkrebspatientinnen besteht und zu untersuchen, inwiefern die p16-Expression im Vergleich mit den Routineprognoseparametern prognostische Relevanz besitzt.

Bekannt sind verschiedene Mechanismen, die für den Verlust der Zellzykluskontrolle verantwortlich sind. Der wichtigste ist die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene in Verbindung mit der Aktivierung der Zyklin-abhängigen Kinasen und Zykline^{89, 90}.

Suppression von p16 infolge einer Inaktivierung wurde schon oft in Fällen von akuter lymphatischer Leukämie (ALL), bei Non-Hodgkin Lymphomen, Bronchial- und Zervixkarzinomen, Melanomen und Leberzellkarzinomen beschrieben und als ein Faktor mit schlechter Prognose angesehen⁹¹. Andere Ergebnisse zeigten jedoch, dass zumindest in Ovarialkarzinomen eine p16-Akkumulation mit einer schlechteren Prognose einhergeht⁹², so dass die klinische Aussagekraft der Signalregulationsfähigkeit von p16 in Tumoren weiterhin unklar bleibt.

Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen sind Punktmutationen des p16-Gens nur sporadisch beim primärem Mammakarzinom nachgewiesen worden^{93, 94, 95}. Allerdings findet man in vitro Brustkrebszelllinien einen hohen Prozentsatz von homozygoten Deletionen⁹⁶.

Auf Genebene hat sich die DNA-Methylierung als ein Mechanismus gezeigt, der die p16-Expression modulieren kann. Van Zee et al.⁹⁷ berichten, dass in primären und metastasierten Mammakarzinomen erhöhte p16-mRNA mit einer Hypomethylierung des Genes korreliert, während kein p16 und keine Hypermethylierung in normalem Mammagewebe nachgewiesen wird.

Ursprünglich wurde angenommen, dass der Inhibitionseffekt von p16 im Zellzyklus Rb-abhängig sei, da beide in einem negativen Feedbackzyklus stehen und p16 in vielen Tumoren überexprimiert ist, in denen das Rb-Protein (pRb) nicht funktionstüchtig ist^{98, 99}. Nach neuesten Erkenntnissen ist aber die p16-Akkumulation nicht abhängig von einer Retinoblastomgen-Mutation¹⁰⁰, und der von p16 eingeleitete Zellzyklusstopp benötigt die Anwesenheit aus der Familie der p21/p27-Proteine und nicht die des Retinoblastom-Proteins¹⁰¹. Auf jeden Fall ist

jedoch weder eine starke Expression von pRb noch von p16^{INK4a} alleine fähig, die Zellzykluskaskade zu stoppen¹⁰².

In verschiedenen Arbeiten von Gorgoulis und Geradts^{20, 103} konnte eine immunhistochemische Färbung des p16-Proteins in Mammakarzinomen festgestellt werden, allerdings wurden keine Korrelationen mit anderen Prognosefaktoren gefunden. Sie berücksichtigten auch nicht die Zytoplasmafärbung, die seinerzeit noch als Artefakt der Färbung bzw. als unspezifisch betrachtet wurde.

Eine Arbeit von Dublin et al.¹⁰⁴ beschreibt als erste, dass starke p16-Expression mit schlechter Prognose einhergeht. Tumoren mit schwacher p16-Expression hatten hier die beste Prognose. Eine Korrelation mit Tumorgrading, Lymphknotenstatus und Östrogenrezeptorstatus konnte nicht nachgewiesen werden, so daß gegebenenfalls eine Aussicht auf eine unabhängige prognostische Relevanz im Vergleich zu den anerkannten Prognoseparametern besteht. Außerdem war die Beobachtung, dass starke p16-Färbung mit schlechter Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen einhergeht, umso überraschender, als in vielen Tumortypen der p16-Verlust das zu erwartende herkömmliche Ergebnis war¹⁰⁵. Man konnte sich nicht erklären, dass nicht etwa eine Suppression des p16 mit schlechter Prognose einhergeht, sondern eine starke Expression dieses Zellzyklus-Inhibitors.

Eine jüngere Arbeit von Wong¹⁰⁶, in der p16 ebenfalls immunhistologisch nachgewiesen wird, zeigt klar, dass im Gegensatz zum normalem Brustdrüsengewebe eine p16 Expression in den Tumorzellkernen vorliegt und diese sowohl im Anteil der gefärbten Zellkerne als auch in der Färbeintensität negativ mit dem Tumorgrad korreliert. Die Mehrzahl der G1-Tumoren war stark p16 positiv, während mit zunehmendem Grading die p16 Expression geringer wurde. Ähnliche Ergebnisse ergab die Studie von Sehwan et al.¹⁰⁷. Hier wurde die p16-Protein-Expression bei Brustkrebspatientinnen, die sich einer CMF-Chemotherapie unterzogen hatten, untersucht. Auch hier wies die p16 Expression eindeutig eine negative Korrelation mit dem histologischen Grading auf ($p < 0,001$). Ansonsten konnten keine signifikanten Assoziationen nachgewiesen werden, allerdings ergab sich im Bezug auf das Überleben der Patientinnen nach dieser Chemotherapie ein deutlicher Unterschied bzgl. ihrer p16-Expression: Diejenigen, deren Tumoren eine p16-Expression aufwiesen, zeigten eine Resistenz gegenüber der Chemotherapie und hatten somit eine schlechtere Prognose. Dies könnte vielleicht im Zusammenhang damit stehen, dass schlecht differenzierte Tumore allgemein besser auf die Chemotherapie ansprechen.

In der hier vorgelegten Arbeit zeigte sich sowohl in den Zellkernen als auch im Zytoplasma der Zellen deutlich eine p16-Expression. In den Zellkernen wurde die p16-Expression quantifiziert als Prozentsatz der gefärbten Zellkerne und die Färbeintensität wurde in verschiedene Abstufungen eingeteilt. So konnte dann auch der immunreaktive Score gebildet werden. Allerdings lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Überleben und dem Anteil der positiv gefärbten Zellen, der Färbeintensität und dem immunreaktiven Score nachweisen.

Im Gegensatz zu den vorher zitierten Arbeiten wurde in dieser Arbeit die Zytoplasmareaktion als eigenständiger Parameter mit einbezogen; hier kristallisiert sich eine besondere Beobachtung heraus: Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dieser Zytoplasmafärbung und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen ($p = 0,0013$). Diese Tatsache und die hervorstechende Resultate bei der Zytoplasmafärbung im Vergleich zu den anderen Prognoseparametern sind sehr interessant und werden später eingehend diskutiert werden.

Der Prozentsatz der gefärbten Zellkerne im Brustkrebsgewebe variiert in der Literatur von 37%-73%^{108, 109}. Diese Diskrepanz könnte zum einen an der unterschiedlichen technischen Ausführung während der Immunhistometrie liegen, zum anderen an den angewandten Selektionskriterien. Der immunhistochemische Nachweis des p16 Proteins ist eine Herausforderung an den Untersucher, da die Tumorpräparate schwer zu schneiden und sehr fetthaltig sind und eine zu lange Fixierung einen „Antigenverlust“ mit sich bringt. Weiterhin beeinflussen Art der Antikörper, Verdünnungen und Inkubationszeiten die Resultate in den verschiedenen Studien. Außerdem ist der p16-Marker sehr empfindlich. Wahrscheinlich sind die Angaben über unterschiedliche Färbeintensitäten hierauf zurück zu führen. In unserer Arbeit besteht keine Korrelation zwischen der Färbeintensität des p16-Markers in den Zellkernen und dem Überleben, jedoch ist zu erkennen, dass die Patientinnen, die keine oder nur eine schwache p16-Färbeintensität aufweisen, eine im Trend bessere Überlebenswahrscheinlichkeit haben. Dies würde sich dann sogar mit den Ergebnissen von Dublin et al. u.a. decken.

Von den 103 Patientinnen wiesen 40 eine positive Zytoplasmareaktion im Tumorgewebe auf. Die Patientinnen mit Zytoplasmaanfärbung haben eine deutlich schlechtere Prognose als Patientinnen ohne Zytoplasmaanfärbung. So sind 60% der Patientinnen mit gefärbtem Zytoplasma verstorben bzw. ist ihre Wahrscheinlichkeit nach 10 Jahren noch zu leben, stark reduziert.

In der immunhistochemischen Interpretation der p16-Analyse wurde bis vor kurzem die positive Reaktion des Zytoplasmas auf p16 als unspezifisch betrachtet und weitgehend ignoriert, da das p16-Protein in seiner Funktion als Zellzyklusinhibitor und Tumorsuppressor eigentlich im Zellkern aktiv ist. Nachdem aber von Emig et al. (1998)¹¹⁰ bereits vor einiger Zeit auf eine Beziehung einer p16-Zytoplasmareaktion zu Differenzierungsmerkmalen hingewiesen worden war, soll diesem Aspekt auch hier, gerade auch im Hinblick auf die univariate prognostische Relevanz besonders Rechnung getragen werden.

Eine Studie von Milde-Langosch et al. (2000)¹¹¹ bestätigt, dass starke p16-„Überexpression“ vergesellschaftet ist mit schlechten prognostischen Parametern wie hohes Grading, positiver Lymphknotenstatus und negativer Hormonrezeptorstatus. Diese Ergebnisse widersprechen eigentlich der Tatsache, dass es sich beim p16 um ein Tumorsuppressorprotein handelt. Um dieses Phänomen erklären zu können, muß es noch unbekannte Mechanismen geben, die mit der p16-Expression interagieren.

In einer weiteren Arbeit von Milde-Langosch (2001)¹¹² wurde noch einmal immunhistochemisch die p16-Expression untersucht und die Ergebnisse zeigten, dass es keine Korrelation zwischen der p16-Expression und dem klinischen Staging gibt, jedoch sowohl nukleäre wie auch zytoplasmatische Immunreaktivität in Tumorzellen der Brustdrüse p16-spezifisch sind. Beide Reaktionen weisen auf einen undifferenzierteren malignen Phänotyp bei Mammakarzinom hin (je stärker die Färbung von p16 im Zytoplasma war, desto höher war das Grading, und hohe p16-Expression korrelierte mit negativem Östrogenrezeptorstatus). Aus diesen Daten ließen sich allerdings auch keine Schlussfolgerungen über die funktionelle Bedeutung der p16-Expression im Zytoplasma ziehen.

Ein Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen Anfärbung des Zytoplasmas mit Hilfe des p16-Tumormarkers und dem Staging, einschließlich der Tumorgroße und dem Lymphknotenstatus, konnte auch hier nicht gefunden werden. Im Gegensatz dazu besteht eine deutlich signifikante Korrelation zwischen der p16-Expression im Zytoplasma und dem Grading. Schlecht differenziertes histologisches Grading, Fehlen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren und verstärktes Tumorwachstum scheinen sich in einer p16 Überexpression des Zytoplasmas wiederzuspiegeln. So beobachtet man bei schlecht differenzierten Tumoren (G3) einen hohen Anteil von 60% an p16-Expression im Zytoplasma. Ähnlich verhält sich die Zytoplasmareaktion im Vergleich zur Mitoserate und der Kernpleomorphie, nämlich je höher die Kernpleomorphie und je stärker die Mitoserate, desto intensiver ist die Anfärbung des

Zytoplasmas. Und auch bei der tubulären Differenzierung ist ein Trend in diese Richtung zu erkennen zu erkennen. In Bezug auf den Hormonrezeptorstatus ist die Korrelation mit der Zytoplasmafärbung am Klarsten, sowohl beim Östrogenrezeptor als auch beim Progesteronrezeptor. Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus weisen häufiger Zytoplasmafärbung auf. Die p16-Expression im Zytoplasma spiegelt demnach durch die Hyperproliferation der Tumorzellen den Funktionsverlust wieder, der auf einen Defekt auf der Ebene des p16-Gens oder eines anderen Gens hinzudeuten scheint. Auf jeden Fall wird darauf hingewiesen, dass diese abnorme p16-Anhäufung einen wichtigen biologischen Marker zur Identifizierung von hochgradig malignen Mammakarzinomen in Zukunft sein könnte.

Eine mögliche Erklärung für diese Zytoplasmareaktion könnten die Veränderungen auf subzellulärer Ebene sein, die als weiterer Mechanismus für die p16-Inaktivierung in Frage kämen.

Hui et al.¹¹³ untersuchten auf Genebene die INK4a Expression und die Methylierung bei primären Mammakarzinomen und bestätigten, dass die „Überexpression“ von p16-m-RNA als einen Marker schlechter Prognose gilt. Sie fanden nicht nur eine Korrelation der starken p16 Expression mit hohem Grading und positivem Lymphknotenstatus, sondern auch eine Korrelation mit negativem Östrogenrezeptorstatus. Diese inverse Beziehung zwischen p16 und dem Hormonstatus lässt eine mechanistische Verknüpfung vermuten. Hui et al. nehmen an, dass durch hohe p16 Expression der Bedarf an Östrogenen bei der Proliferation von Brustkrebszellen vermindert wird und außerdem mit fehlender Hormonansprechbarkeit beim verschiedenen Brustkrebsarten in Verbindung steht.

Es stellt sich die Frage, warum eine Zelle mit besonders großer p16-Konzentration eine schlechte Prognose bedeutet, obwohl vom p16 angenommen wird, dass es Tumorsuppressorfunktion hat.

Eine relativ einfache Erklärung könnte die hohe Stabilität des p16 in der Zelle sein. Das p16 Protein, aktiv in der G₁-Phase des Zellzyklus, hat eine sehr lange Halbwertszeit. Deshalb häuft es sich vermehrt in denjenigen Zellen an, die eine erhöhte Anzahl an Zellzyklen vorweisen. p16 würde in solchen Zellen dann schneller gebildet als abgebaut, womit die Konzentration an p16 steigt, und dies auch bei gleicher p16-Expression pro Zellzyklus. Damit würde es sich hierbei nicht um eine verstärkte Expression, sondern um eine Anreicherung im

Zytoplasma handeln, die in proliferierenden Tumorzellen stärker ist als in normalen epithelialen Brustdrüsenzellen.

Eine abnorm hohe p16-Expression könnte eine weitere Erklärung für die starke immunhistochemische Reaktion im Zellplasma sein. Eine nicht vorhandene immunhistochemische Reaktion auf p16 hat unterschiedliche Ursachen: homozygote Deletion des INK4a Gen, Mutationen, Hypermethylierung in der Promotorregion. Eine abnorm hohe p16-Expression dagegen könnte auf drastischere Schäden in anderen Regulatorgenen hindeuten, da ja eine Korrelation mit negativen Prognosefaktoren besteht. Ob jetzt das p16 Protein selbst, vor allem wenn es hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist, eine dieser unbekannten Funktionen in der Tumorentwicklung wahrnimmt, ist weiterhin unklar. Was gegen diese Hypothese spricht, ist, dass eine abnorm hohe Expression automatisch auch im Zellkern zu hohen p16-Konzentrationen führen muß. Dies konnte nicht gezeigt werden.

Auf lange Sicht wird das Verständnis aus den Zusammenhängen dieser Vielzahl von Zellzyklusregulatoren dazu beitragen, dass neue Prognosemarker geschaffen werden und /oder eine gezielte Therapie eingeleitet werden kann, um die Defekte dieser Kaskaden in betroffenen Tumorzellen wieder herzustellen. So gelang es z.B. in einer Studie von Campbell¹¹⁴ zu zeigen, dass ein mit Hilfe eines Adenovirus durchgeführter Gentransfer eines Wild-Typs von p16^{INK4} Gens in Brustkrebszelllinien sowohl in vitro als auch in vivo den Tumoreintritt in die S-Phase des Zellzyklus blockiert, die Tumorzellapoptose induziert und so die Proliferation der Tumorzellen verhindert. Dieses bestätigt noch einmal, dass p16^{INK4} ein Tumorsuppressorgen ist und legt die potentielle Möglichkeit einer Gentherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom nahe.

4.3 Multivariate Überlebensanalyse

Das validierte Cox-Modell zeigt, daß sich der Lymphknotenstatus, der Progesteronrezeptorstatus und die Tumorgröße in dieser Reihenfolge abnehmender Bedeutung prognostisch ergänzen. Weiterhin fällt auf, daß bei bekanntem Lymphknotenstatus und bekanntem biochemisch erhobenen PR-Status der Tumorgröße keine entscheidende additive prognostische Relevanz mehr zukommt. Anderen Größen, darunter auch denen, die aus der p16-Expression abgeleitet werden konnten, kommt auch keine ergänzende prognostische Bedeutung zu.

Sie können nicht als unabhängige Faktoren betrachtet werden und deshalb nicht mit in die Reihe der Routineparameter aufgenommen werden.

Insgesamt kann man bei der multivariaten Analyse durch das Cox-Regressionsmodell festhalten, dass der Lymphknotenstatus, der Progesteronrezeptorstatus und die Tumorgröße von statistisch signifikanter Bedeutung sind und als unabhängige Prognoseparameter betrachtet werden können. Ähnlich wird es auch in der Literatur beschrieben: laut Donegan et al.¹¹⁵, der die Ergebnisse von 13 Autoren zusammenfasst, wird die Basis für prognostische Aussagen vom Lymphknotenstatus und der Tumorgröße gebildet und bei Somlo et al.⁴⁸ wird der Progesteronrezeptorstatus als Prognoseparameter mit eigenständiger Relevanz validiert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In einer retrospektiven Studie über einen Beobachtungszeitraum von 12 Jahren wurde die p16-Expression, eines Proteins, das eine wichtige Rolle beim Übergang der Zellen in die G₁-Phase des Zellzyklus spielt, an 103 Fällen von Mammakarzinomen immunhistochemisch mit Hilfe monoklonaler Antikörper analysiert. Ziel war es, die Bedeutung von p16 in Bezug auf das Überleben der Patientinnen zu prüfen und seine Relation mit anderen klinisch-pathologischen Parametern zu untersuchen.

In der univariaten Überlebensanalyse konnte eine deutliche Korrelation der Überlebenszeiten der Patientinnen mit dem Staging nachgewiesen werden (pTNM = 0,0005, pN = 0,0005, pT = 0,0141, pM = 0,0081). Die Gültigkeit konnte auch für die etablierten Faktoren der histomorphologischen Gradierung gezeigt werden (p = 0,003). Bei den Hormonrezeptoren fand sich eine statistische Signifikanz allerdings nur für den Progesteronrezeptorstatus (p = 0,0142), was sich aber mit den Ergebnissen der Konsensuskonferenz St. Gallen 1998 deckt.

Bei der p16-Expression in den Zellkernen, sowohl als Prozentsatz positiver Zellen quantifizierbar, als auch in verschiedene Abstufungen der Färbeintensität eingeteilt, konnte kein signifikanter Zusammenhang im Hinblick auf das Überleben oder in Beziehung zu anderen Routine-Prognoseparametern hergestellt werden. Somit ergaben sich folglich auch keine Korrelationen mit dem immunreaktiven Score.

Jedoch erwies sich die p16-Expression im Zytoplasma als ein Parameter schlechter Prognose, der mit einer kürzeren Überlebenswahrscheinlichkeit einherging (p = 0,0013). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von p16 im Zytoplasma und dem Staging, einschließlich der Tumorgroße und dem Lymphknotenstatus wurde nicht gefunden. Im Gegensatz dazu bestand aber eine deutlich signifikante Korrelation zwischen der p16-Expression im Zytoplasma und dem Grading (p = 0,0067), wie auch bei den Einzelkomponenten Mitoserate (p = 0,0013) und Kernpleomorphie (p = 0,0259). Beim Hormonrezeptorstatus ergab sich ebenfalls eine eindeutige Korrelation für Östrogen- (p = 0,0001) und Progesteronrezeptor (p < 0,0001).

In der multivariaten Analyse bestätigten sich der Lymphknotenstatus, der Progesteronrezeptorstatus und die Tumorgroße als unabhängige Prognoseparameter mit signifikanter Relevanz. Die p16-Parameter wurden allesamt nicht berücksichtigt und verfügen somit nicht über eine multivariate Relevanz.

Schlussfolgernd stellte sich somit die starke zytoplasmatische p16-Reaktivität beim Mammakarzinom als ein allerdings nicht multivariater gültiger prognostischer Faktor schlechter Prognose heraus.

6 TECHNISCHER ANHANG

6.1 Reagenzien

Primärer Antikörper:	Monoklonaler p16 Mausantikörper IgG1, Firma Biermann, Klon DCS-50.17H Katalognummer: SM1425P
Sekundärantikörper:	Horse anti mouse IgG biotinyliert Fa. Vector Laboratories Burlingame, CA.
Avidin-Biotin-Komplex:	ABC Elite Kit Peroxidase Fa. Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA.
Magermilchpulver:	Fa. Libbys o.ä.
Poly-L-Lysin:	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
PBS 0,15:	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,16 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.
TBS 10x:	53 g NaCl 12 g Tris ad 1000 ml Aqua dest. zum Gebrauch 1:10 verdünnen und auf pH 7,4 einstellen

Tris/HCl-Puffer 0,5 m:	60,57 g in 500 ml Aqua dest. Lösen mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen (man benötigt ca. 500 ml HCl) auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen. (Gebrauchslösung: 0,05 molar)
DAB:	Pro Küvette 50 µg DAB (Sigma D 5637) in 50 ml 0,05 m Tris/HCl-Puffer lösen, filtrieren, kurz vor Gebrauch 50 µl 10% H ₂ O ₂ zugeben
2% Milchpulver/PBS:	2 g Magermilchpulver in 100 ml 0,15 PBS lösen Lösung jeden Tag frisch ansetzen

6.2 Silanisierung der Objektträger

Zum besseren Anhaften der Gewebsschnitte werden die Objektträger vor dem Aufziehen der Präparate silanisiert. Diese ist für die Mikrowellenbehandlung entscheidend, da durch die Silanisierung die Probleme der Ablösung der Präparate deutlich verringert werden können. Folgende Schritte werden durchlaufen:

- ♦ Einstellen in Aceton-Lösung (5 min) – Entfernung der Objektträger.
- ♦ Trocknen lassen im Brutschrank bei 60 °C.
- ♦ Einstellen in Lösung aus 450 ml Aceton und 50 ml 3(Triethoxysilyl)-Propylamin (5 min).
- ♦ Aceton-Lösung (2 min).
- ♦ Aqua dest. (1 min).
- ♦ Trocknen im Brutschrank bei 60 °C.

7 DATENSAMMLUNG

Tabelle 31: Auflistung von Alter, Menopausenstatus, WHO-Einteilung und Staging

Nr. (E-Nr.)	Alter	Meno	WHO	pTNM	pT	pN	M
1 (1)	47	2	4	2	2	0	0
2 (2)	51	2	12	3	3	1	0
3 (3)	35	1	3	2	2	0	0
4 (4)	38	1	4	2	2	1	0
5 (6)	56	3	4	4	3	1	1
6(7)	32	2	13	2	2	1	0
7 (8)	33	1	1	1	1	0	0
8 (9)	41	1	8	2	2	0	0
9 (10)	50	3	4	1	1	0	0
10 (11)	41	1	10	2	2	0	0
11 (12)	53	2	3	1	1	0	0
12 (13)	54	3	8	1	1	0	0
13 (14)	55	3	3	3	3	1	0
14 (15)	55	3	12	2	2	0	0
15 (17)	55	3	4	2	2	1	0
16 (19)	64	4	8	2	2	0	0
17 (20)	66	4	3	2	2	1	0
18 (21)	65	4	8	2	2	0	0
19 (22)	66	4	3	2	1	1	0
20 (23)	63	4	9	1	1	0	0
21 (24)	49	2	4	2	2	0	0
22 (25)	51	3	12	2	2	0	0
23 (26)	62	4	13	2	2	0	0
24 (27)	53	3	5	3	3	1	0
25 (28)	34	1	3	2	2	1	0
26 (30)	67	4	1	1	1	0	0
27 (31)	73	4	4	2	2	1	0
28 (32)	34	1	10	2	2	0	0

29 (33)	54	3	4	4	3	1	1
30 (34)	54	3	9	2	2	1	0
31 (35)	85	4	13	2	2	1	0
32 (36)	58	3	4	2	2	0	0
33 (37)	32	1	3	2	2	1	0
34 (38)	95	4	4	2	2	0	0
35 (39)	65	4	6	2	2	1	0
36 (40)	41	1	8	3	3	1	0
37 (41)	52	3	4	2	3	0	0
38 (42)	39	1	4	2	2	1	0
39 (43)	54	3	4	2	2	0	0
40 (45)	71	4	4	2	2	0	0
41 (47)	74	4	9	2	1	1	0
42 (49)	68	4	4	1	1	0	0
43 (50)	67	4	4	2	2	0	0
44 (51)	63	4	4	1	1	0	0
45(52)	63	4	4	2	2	0	0
46 (53)	73	4	9	1	1	0	0
47 (54)	74	4	4	2	2	0	0
48 (55)	66	4	4	2	2	0	0
49 (56)	85	4	8	2	2	0	0
50(58)	90	4	4	4	4	0	1
51 (59)	54	3	13	2	3	0	0
52 (60)	59	4	4	3	4	0	0
53 (62)	81	4	4	4	2	0	1
54 (63)	54	3	13	2	2	1	0
55 (64)	82	4	4	1	1	0	0
56 (65)	64	4	4	2	2	1	0
57 (66)	63	4	4	2	2	1	0
58 (67)	46	1	8	2	2	0	0
59 (68)	89	4	4	3	4	0	0
60 (69)	66	4	8	4	4	0	1
61 (71)	81	4	13	2	2	1	0

62 (73)	50	2	11	3	3	1	0
63 (74)	45	2	4	2	2	1	0
64 (75)	62	4	6	2	2	1	0
65 (76)	52	3	4	2	3	0	0
66 (77)	80	4	13	2	2	1	0
67 (78)	78	4	4	3	4	1	0
68 (80)	53	3	4	2	1	1	0
69 (81)	56	3	6	2	2	1	0
70 (82)	74	4	6		4	1	
71 (86)	83	4	4	4	1		1
72 (87)	45	1	4	2	2	0	0
73 (88)	38	1	4	3	3	1	0
74 (89)	61	4	4	4	3	1	1
75 (90)	55	3	12	2	2	1	0
76 (91)	58	3	4	2	2	1	0
77 (93)	58	3	4	3	3	1	0
78 (95)	54	4	13	2	2	1	0
79 (96)	53	3	4	1	1	0	0
80 (97)	72	4	8	2	2	1	0
81 (100)	49	3	4	3	3	1	0
82 (101)	51	3	4	2	2	1	0
83 (102)	51	3	4	2	2	0	0
84 (104)	53	1	10	2	2	1	0
85 (105)	76	4	1	2	2	1	0
86 (106)	65	4	4	2	2	0	0
87 (110)	53	2	4	2	3	0	0
88 (111)	59	4	4	3	3	1	0
89 (112)	45	1	4	2	2	1	0
90 (114)	82	4	13	2	2	0	0
91 (115)	74	4	14	2	1	1	0
92 (116)	51	2	12	3	4	1	0
93 (118)	38	1	3	2	2	0	0
94 (119)	57	3	1	4	3	1	1

95 (121)	64	4	9	2	2	1	0
96 (122)	54	3	6	1	1	0	0
97(123)	69	4	2	2	2	1	0
98 (124)	75	4	2	2	2	0	0
99 (126)	66	4	2	2	2	0	0
100 (127)	63	3	4	2	2	0	0
101 (128)	44	1	2	2	2	1	0
102 (130)	35	1	3	2	2	1	0
103 (131)	77	4	2	1	1	0	0

Erläuterungen zu Tabelle 31 :

- ♦ Nr.: Die in dieser Arbeit benutzte Patientennummer.
- ♦ E-Nr.: Ursprüngliche Eingangsnummer in chronologischer Reihenfolge.
- ♦ Alter: Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Jahren.
- ♦ Meno.: Menopausenstatus wobei 1 = normal, 2 = prä-, 3 = postmenopausal, 4 = Senium.
- ♦ WHO: Tumorklassifikation der WHO in 1 = duktal, 2 = intraduktal, 3 = komedo, 4 = szirrhös, 5 = paget, 6 = lobulär, 7 = clis, 8 = lobinvasiv, 9 = tubulär, 10 = papillär, 11 = muzinös, 12 = medullär, 13 = adeno, 14 = lipid.
- ♦ pTNM: Postoperatives TNM-Stadium.
- ♦ pT: Postoperative Tumorgroße.
- ♦ pN: Postoperatives Lymphknotenstadium.
- ♦ M: Stadium der Fernmetastasierung.

Tabelle 32: Auflistung von Grading und Hormonrezeptorstatus

Nr. (E-Nr.)	GRAD	TD	KP	MIT	ER	PR
1 (1)	3	3	3	3	102	0
2 (2)	3	3	3	3	0	0
3 (3)	2	1	3	2	0	0
4 (4)	3	3	3	2	12	119
5 (6)	3	3	3	2	20	0

6(7)	1	2	1	1	12	39
7 (8)	2	2	2	2	41	228
8 (9)	2	2	2	2	44	54
9 (10)	1	1	2	1	100	0
10 (11)	1	2	1	1	45	241
11 (12)	2	2	3	1	0	0
12 (13)	2		2	2	102	0
13 (14)	3	3	3	2	35	27
14 (15)	3	2	3	3	197	78
15 (17)	2	3	2	1	149	414
16 (19)	2		2	1	1796	457
17 (20)	2	2	3	1	876	3000
18 (21)	2	3	2	1	70	178
19 (22)	3	3	2	2	17	0
20 (23)	3				95	89
21 (24)	2	3	3	2	0	0
22 (25)	3	3	2	3	0	10
23 (26)	3	2	3	1	409	301
24 (27)	2	3	3	2	2	4
25 (28)	2	3	3	3	52	86
26 (30)	1	3	2	2	68	215
27 (31)	3	3	3	2	1446	0
28 (32)	3		1	1	34	11
29 (33)	1	3	3	2	170	95
30 (34)	1	3	3	2	111	339
31 (35)	1	3	1	1	130	357
32 (36)	3	2	2	2	200	0
33 (37)	3	3	3	2	62	40
34 (38)	2	3	3	3	0	0
35 (39)	1		3	1	1796	0
36 (40)	3	3	3	1	16	102
37 (41)	2	1	1	2	20	0
38 (42)	3	3	3	3	0	0

39 (43)	3	3	2	1	14	213
40 (45)	2	2	3	2	235	90
41 (47)	2	3	3	3	437	835
42 (49)		3	3	1	0	0
43 (50)		2	2	1	558	0
44 (51)	2	3		1	29	62
45(52)	3		2		836	18
46 (53)		3	2	1	28	0
47 (54)		3	3	1	544	609
48 (55)	3	3		2	213	980
49 (56)	2		3		2527	162
50(58)	2	3	3	3	78	24
51 (59)	2	2	2	1	55	484
52 (60)	2	3	3	2	46	0
53 (62)	2	3	2	1	0	0
54 (63)	2	3	2	1	0	2
55 (64)	1	3	3	1	0	58
56 (65)	2	3	2	2	80	0
57 (66)	3	3	2	1	179	103
58 (67)	2	2	2	1	79	103
59 (68)	2	2	2	2	15	0
60 (69)	2	3	3	3	401	0
61 (71)	2	2	3	2	0	0
62 (73)	1	3	3	1	25	38
63 (74)	2	3	1	2	0	0
64 (75)		3	3	3	16	0
65 (76)	3	2		1	40	0
66 (77)	2	3	3	1	20	91
67 (78)	3		2	2	367	410
68 (80)	3	3	3	2	71	0
69 (81)	2	3	3	2	39	28
70 (82)		2	2	1	146	66
71 (86)	3	2	1		79	67

72 (87)	2	3	3	1	0	320
73 (88)	2	3	2	3	20	8
74 (89)	3	3	2	1	19	0
75 (90)	1	2	3	1	13	0
76 (91)	3	1	2	3	0	0
77 (93)	3	3	3	3	0	0
78 (95)	2	3	3	2	0	0
79 (96)	2	3	2	2	0	0
80 (97)	2	2	2	1	489	602
81 (100)		2	3	2	96	48
82 (101)	2	3	3	2	460	0
83 (102)	2	2	2	1	1056	0
84 (104)	2	3	2	1	103	87
85 (105)	3	3	3	2	68	148
86 (106)	1	3	1	3	0	26
87 (110)	1	2	2	1	14	134
88 (111)	2	2	2	2	20	30
89 (112)	1	2	2	1	63	30
90 (114)	3	2	3	3	270	75
91 (115)	2	3	2	1	0	0
92 (116)	3	3	3	2	89	1430
93 (118)	1	1	3	1	0	0
94 (119)	2	2	3	2	408	36
95 (121)	3	3	3	2	338	184
96 (122)	1		2	1	11	20
97(123)	2	3	3	1	288	22
98 (124)	3	3	2	3	0	0
99 (126)	2	3	2	1	147	33
100 (127)	2	3	3	1	71	39
101 (128)	2	3	2	1	30	55
102 (130)	2	3	3	1	0	0
103 (131)	2	2	2	2	0	0

Erläuterungen zu Tabelle 32:

- ♦ Nr.: Die in dieser Arbeit benutzte Patientennummer.
- ♦ E-Nr.: Ursprüngliche Eingangsnummer in chronologischer Reihenfolge.
- ♦ Grad: Histomorphologische Gradierung.
- ♦ TD: Tubuläre Differenzierung.
- ♦ KP: Kernpolymorphie.
- ♦ MIT: Mitoserate.
- ♦ ER: Östrogenrezeptorstatus.
- ♦ PR: Progesteronrezeptorstatus.

Tabelle 33: Auflistung der p16 Parameter und der Überlebensdauer

Nr. (E-Nr.)	p16PP	p16SI	p16IRS	p16PL	Überleben
1 (1)	3	2	6	1	10,5
2 (2)	3	3	9	1	11,83
3 (3)	3	2	6	1	11,75
4 (4)	1	2	2	0	6,5
5 (6)	1	1	1	1	0,25
6(7)	2	2	4	0	11,75
7 (8)	3	1	3	0	11,58
8 (9)	2	2	4	0	6,5
9 (10)	2	2	4	0	11,42
10 (11)	1	1	1	0	11,17
11 (12)	2	2	4	0	11,25
12 (13)	1	1	1	0	11
13 (14)	2	2	4	0	11,67
14 (15)	2	3	6	0	7,17
15 (17)	2	2	4	0	11,08
16 (19)	3	3	9	0	10,67
17 (20)	1	1	1	0	1,92
18 (21)	3	3	9	0	11,58
19 (22)	2	2	4	1	7

20 (23)	3	3	9	0	11,67
21 (24)	2	3	6	1	1,75
22 (25)	2	2	4	0	10,58
23 (26)	3	3	9	0	10,33
24 (27)	1	1	1	0	2,5
25 (28)	2	3	6	0	4,67
26 (30)	1	1	1	0	10,58
27 (31)	1	1	1	0	7,25
28 (32)	3	3	9	1	11,17
29 (33)	2	3	6	1	2,25
30 (34)	2	2	4	0	11,67
31 (35)	3	3	9	1	4,58
32 (36)	3	2	6	0	10,83
33 (37)	2	2	4	0	3,33
34 (38)	3	2	6	1	0,83
35 (39)	2	3	6	1	6,08
36 (40)	2	2	4	0	3,5
37 (41)	2	3	6	1	10,58
38 (42)	2	3	6	1	2
39 (43)	1	1	1	0	11,17
40 (45)	2	2	4	0	5,75
41 (47)	3	3	9	1	11,17
42 (49)	3	2	6	0	10,67
43 (50)	2	3	6	0	10,25
44 (51)	3	3	9	1	11,67
45(52)	3	2	6	0	2,33
46 (53)	3	2	6	0	11,25
47 (54)	3	3	9	0	11,33
48 (55)	2	2	4	0	9,58
49 (56)	1	2	2	0	2,25
50(58)	1	2	2	0	0,08
51 (59)	2	2	4	1	11,33
52 (60)	2	3	6	1	1,42

53 (62)	2	2	4	1	9,17
54 (63)	1	1	1	0	10,58
55 (64)	1	1	1	0	5,5
56 (65)	3	3	9	1	5,67
57 (66)	3	3	9	1	5,92
58 (67)	2	2	4	0	6,08
59 (68)	2	3	6	1	3,58
60 (69)	1	2	2	0	3,42
61 (71)	2	2	4	1	2
62 (73)	3	3	9	1	1,58
63 (74)	3	3	9	1	2,75
64 (75)	2	2	4	0	1,08
65 (76)	2	2	4	0	10,25
66 (77)	2	2	4	0	6,58
67 (78)	2	2	4	0	2,17
68 (80)	3	2	6	1	2,33
69 (81)	2	3	6	1	5,08
70 (82)	1	1	1	0	10
71 (86)	3	3	9	0	8,67
72 (87)	1	1	1	0	11,5
73 (88)	3	2	6	1	1,58
74 (89)	2	2	4	0	2,58
75 (90)	3	2	6	0	2,33
76 (91)	2	3	6	1	1
77 (93)	2	2	4	1	0,67
78 (95)	2	3	6	1	0,75
79 (96)	2	3	6	1	11,25
80 (97)	2	3	6	0	10,5
81 (100)	2	2	4	0	9,75
82 (101)	2	2	4	1	9,83
83 (102)	2	3	6	0	4,33
84 (104)	2	1	2	0	9,5
85 (105)	2	2	4	0	6,83

86 (106)	3	3	9	1	9,58
87 (110)	2	2	4	0	9,75
88 (111)	3	3	9	0	5,58
89 (112)	2	3	6	0	10,17
90 (114)	2	3	6	1	1,42
91 (115)	3	3	9	1	2,33
92 (116)	1	2	2	0	9,75
93 (118)	3	3	9	1	9,83
94 (119)	2	3	6	0	2,42
95 (121)	2	3	6	1	7,83
96 (122)	3	3	9	0	9,5
97(123)	2	3	6	0	5,25
98 (124)	3	3	9	1	0,67
99 (126)	2	2	4	0	9,75
100 (127)	3	2	6	0	9,83
101 (128)	1	2	2	0	4,08
102 (130)	3	3	9	1	1,17
103 (131)	3	2	6	1	8,08

Erläuterungen zu Tabelle 33:

- ♦ Nr.: Die in dieser Arbeit benutzte Patientennummer.
- ♦ E-Nr.: Ursprüngliche Eingangsnummer in chronologischer Reihenfolge.
- ♦ p16PP: Prozentsatz jener Zellen, die das p16 Protein exprimiert haben, wobei 1 einem Anteil positiver Zellen von < 10 % entspricht, 2 einem Anteil positiver Zellen von 10-50 % entspricht und 3 einem Anteil positiver Zellen von > 50 % entspricht.
- ♦ p16SI: Färbeintensität der Zellen, die p16 exprimieren, wobei 1 entspricht einer schwachen bzw. keiner Färbeintensität entspricht, 2 einer mäßigen Färbeintensität entspricht und 3 einer starken Färbeintensität entspricht.
- ♦ p16IRS: Immunreaktive Score, sich zusammensetzend aus p16PP x p16SI mit Werten von 1,2,3,4,6 und 9.

- ♦ p16PL: Zytoplasmaanfärbung der Zellen mit p16 Expression, wobei 0 = Negativ (keine oder schwache Reaktion des Zytoplasmas und 1 = positiv (mit mäßiger oder starker Färbung)).
- ♦ Überleben: Beobachtungszeitraum der Patientinnen vom Zeitpunkt der Diagnose bis zu ihrem Tod oder bis zum Stichtag der Studie in Jahren.

8 LITERATURVERZEICHNIS

-
- ¹ European Society for Medical Oncology (ESMO), Überlebensdaten beim Mammakarzinom, *Ann.Oncol.* **2001**, 12, 1047-48.
- ² RKI (2000) Krebskrankheiten. Robert Koch Institut, Berlin, <http://www.rki.de>.
- ³ Zimmermann V.L., BRCA- Gene Mutations and Cancer, *Anm. J. Nurs* **2002**, 102 (8), 28-36.
- ⁴ Anderson D.E., Genetic Study of Breast Cancer, Identification of a high risk group, *Cancer* **1974**, 34, 1090-1097.
- ⁵ Petrakis N.L., Genetic factors in the etiology of breast cancer, *Cancer* **1977**, 39, 2709-2715.
- ⁶ Prof. Dr. Med. H. Sauer, Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 8. überarbeitete Auflage **2001**.
- ⁷ Henderson B.E., Powell D., Rosario I., Keys C., Young M., Casagrande J., Gerkins V., Pike M.C., An epidemiologic study of breast cancer, *J.Natl. Cancer. Inst.* **1974**, 53, 609-614.
- ⁸ Trichopoulos D., MacMahon M.D., Cole P., Menopause and breast cancer risk, *J. Nat. Cancer Inst.* **1972**, 48, 605-613.
- ⁹ MacMahon B., Cole P., Brown J., Etiology of human breast cancer: a review, *Journal of the National Cancer Institut* **1973**, 50, 21-42.
- ¹⁰ Marchbanks P.A., McDonald J.A., Wilson H.G., Folger S.G., Mandel M.G., Daling J.R., Bernstein L., Malone K.E., Ursin G., Strom B.L., Norman S.A., Weiss L.K., Oral contraceptives and the risk of breast cancer, *N. Engl. J. Med.* **2002**, 26, 2025-2032.
- ¹¹ Prof. Dr. Med. H. Sauer, Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 8. überarbeitete Auflage **2001**.
- ¹² La Guardia M., Giammanco M., Breast cancer and obesity, *Panminerva Med.* **2001**, 43 (2), 123-133.
- ¹³ Veer van'ter P., Combination of dietary factors in relation to breast cancer occurrence, *Int. J. Cancer* **1991**, 47, 649-653.
- ¹⁴ Fuchs R., Guggenberger D., Karl C., Mammakarzinom, Diagnostik und Therapie, Euregio-Brust-Zentrum, Eschweiler, **2002**.
- ¹⁵ McCarty K., Kinsel L., Georgiade G., Leight G., McCarty K.Sr., Long-term prognostic implications of sex-steroid receptors in human breast cancer, *Prog. Clin. Biol. Re.* **1990**, 322, 279-293.

-
- ¹⁶ Anderson J., Thorpe S., Rose C., Christensen I., Rasmussen B., Poulsen H., Estrogen receptor in primary breast cancer estimate in paraffinembedded tissue, *Acta Oncol.* **1991**, 30, 685-690.
- ¹⁷ Sauer H., Adjuvante Chemo- und Hormontherapie des Mammakarzinoms, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **1993**, 53, 73-80.
- ¹⁸ Esteban J., Ahn C., Metha P., Battifora H., Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer, *Mod. Pathol.* **1991**, 4, 53-57.
- ¹⁹ McGuire W.L., Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines, *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 154-155.
- ²⁰ Andreasen PA, Kjöllér L, Christensen L, Duffy MJ, The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review, *Int. J. Cancer* **1997**, 72, 1-22.
- ²¹ Hayes D.F., Bast R., Desch C.E., Fritsche Jr.H., Kemeny N.E., Jessup J.M., Locker G.Y., MacDonald J.S., Mennel R.G., Norton L., Ravdin P., Taube S., Winn R.J., A tumor marker utility grading system (TMUGS): a framework to evaluate clinical utility of tumor markers, *J. Nat. Cancer Inst.* **1996**, 88, 1456-1466.
- ²² Harberg N., Dettmar P., Thomssen C., Berger U., Ulm K., Kates R., Jänicke F., Höfler H., Graeff H., Schmitt M., Risk-group discrimination in node-negative breast cancer using invasion and proliferation markers: six-year median follow-up, *Br. J. Cancer* **1999**, 80, 419-426.
- ²³ Jänicke F., Prechtel A., Thomssen C., Harbeck N., Meisner C., Untch M., Sweep C.G., Selbmann H.K., Graeff H., Schmitt M., risk-adapted adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer based on tumor biological factors uPA and PAI-1: first interim analysis of a randomized multicenter trial, *J. Natl. Cancer* **2001**.
- ²⁴ Slamon D.J., Clark G.H., Wong S.G., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene, *Science* **1987**, 235, 177-182.
- ²⁵ Cater P., Presta L., Gorman C, Humanization of an anti-p185^{HER2} antibody for human cancer therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1992**, 89, 4285-4289.
- ²⁶ Slamon D.J. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 783-792.
- ²⁷ Cobleigh M.A., Vogel C.L., Tripathy D, Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease, *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 2639-2648.

-
- ²⁸ Wittekind C, Wagner G (eds), TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 5. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg **1997**.
- ²⁹ Funke I., Schraut W., Meta-analysis of studies on bone narrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated, *J. Clin. Oncol* **1998**, 16, 557-566.
- ³⁰ Poremba C., Heine B., Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR, *J Pathol* **2002**, 198, 181-189.
- ³¹ Nielsen NH., Lodén M., Cajander J., O. Emdin S., Landberg G., G1-S transition defects occur in most breast cancers and predict outcome, *Breast Cancer Research and Treatment* **1999**, 56, 105-112.
- ³² Geradts J., Christopher MD., Ingram MD., Abnormal expression of cell cycle regulatory proteins in ductal and lobular carcinomas of the breast, *Mod Pathol.* **2000**, 13 (9), 945-953.
- ³³ Serrano M., Hannon G., Beach D., A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4, *Nature* **1993**, 366, 704-707.
- ³⁴ Ruas M., Peters G., The p16INK4a/CDKN2 tumor suppressor and its relatives, *Biochim Biophys Acta* **1998**, 1378, F115-F177.
- ³⁵ Lukas J., Aagaard L., Strauss M., Bartek J., Oncogenetic aberrations of p16^{INKA4}/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control, *Cancer Res.* **1995**, 55, 4818-4823.
- ³⁶ Koh J., Enders GH., Dynlacht BD., Harlow E., Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition, *Nature* **1995**, 375, 506-510.
- ³⁷ Kamb A., Gruis NA., Weaver FJ., Liu Q., Harshman K., a cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types, *Science* **1994**, 264, 436-440.
- ³⁸ Nobori T., Miura K., Wu DJ., Lois A., Takabayashi K. and Carson DA., Deletions of cyclin-dependant kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers, *Nature* **1994**, 368, 753-756.
- ³⁹ Serrano M., Lee H., Cordon-Cardo C., Beach D., DePinho RA., Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality, *Cell* **1996**, 85, 27-37.
- ⁴⁰ Herman JG., Merlo A., Mao L., Lapidus RG., Issa JP., Davidson NE., Sidransky D., Baylin SB., Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers, *Cancer Res.* **1995**, 55, 4525-4530.
- ⁴¹ Fizzotti M., Cimino G., Pisegna S., Alimena G., Quartarone C., Mandelli F., Pelicci PG., Coco FL., Detection of homozygous deletions of the cyclin-dependant kinase 4 inhibitor (p16) gene in acute lymphoblastic leukaemia and association with adverse prognostic features, *Blood* **1995**, 85, 2685-2690.

-
- ⁴² Nishikawa R., Furnari FB., Lin H., Arap W., Berger MS., Caveness WS., Su Huang HJ., Loss of p16^{INK4} expression is frequent in high-grade gliomas, *Cancer Res.* **1995**, 55, 1941-1945.
- ⁴³ Reed JA., Loganzo FJ., Shea CR., Walker G., Flores JF., Glendening JM., Shiel MJ., Albino AP., Loss of expression of the p16/cyclin-dependant kinase inhibitor 2 tumour suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumour progression, *Cancer Res.* **1995**, 55, 2713-2718.
- ⁴⁴ Kratzke RA., Greatens TM., Rubis JB., Maddaus MA., Niewoehner DE., Niehans GA., Geradts J., Rb and p16^{INK4a} expression in resected non-small cell lung tumours, *Cancer Res.* **1996**, 56, 3415-3420.
- ⁴⁵ Kees UR., Burton PR., Lu C., Baker DL., Homozygous deletion of the p16/MTS1 gene in pediatric acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavorable clinical outcome, *Blood* **1997**, 89, 4161-4166 .
- ⁴⁶ Naka T., Kobayashi M., Ashida K., Toyota N., Kaneko T., Kaibara N., Aberrant p16^{INK4} expression related to clinical stage and prognosis in patients with pancreatic cancer, *Int. J. Oncol.* **1998**, 12, 1111-1116 .
- ⁴⁷ Klüppel D., Immunhistometrische Analyse der Proliferationsfraktion von Mammakarzinomen nach MIB-1-Markierung, *Med. Diss. RWTH Aachen*, **1998**.
- ⁴⁸ Schneider S., Immunhistometrische Analyse der Proliferationskinetik von Mammakarzinomen mit PCNA, *Med. Diss. RWTH Aachen*, **2000**.
- ⁴⁹ Steinhagen S., Immunhistometrische Analyse des Progesteronrezeptorstatus beim Mammakarzinom, *Med. Diss. RWTH Aachen*, **2000**.
- ⁵⁰ Koch R., Prognostische Relevanz der bildanalytisch bestimmten Östrogenrezeptor-Expression beim Mammakarzinom, *Med. Diss. RWTH Aachen*, in Vorbereitung, **2004**.
- ⁵¹ Zitzelsberger D., Prognostische Relevanz der PSA-Expression beim Mammakarzinom. *Med. Diss. RWTH Aachen*, eingereicht, **2004**.
- ⁵² Doetkotte R., Prognostische Relevanz der bcl-2-Expression beim Mammakarzinom. *Med. Diss. RWTH Aachen*, in Vorbereitung, **2004**.
- ⁵³ Abu-Nasir H., Prognostische Relevanz der immunhistochemischen Darstellung der p53-Expression von Mammakarzinomen, *Med. Diss. RWTH Aachen*, **2001**.
- ⁵⁴ Fischer N., Prognostische Relevanz der Rb-Expression beim Mammakarzinom. *Med. Diss. RWTH Aachen*, in Vorbereitung, **2004**.

-
- ⁵⁵ Remmele W., Stegner HE., Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe: Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes, *Frauenarzt* **1987**, 41-43.
- ⁵⁶ Gohring U.J., Scharl A., Ahr A., Der Stellenwert der immunhistochemischen Bestimmung von Rezeptoren, Gewebsproteasen, Tumorsuppressorproteinen und Prolifertationsmarkern als Prognoseindikatoren beim primären Mammakarzinom, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **1996**, 56 (4), 177-183.
- ⁵⁷ Beckmann W.M., Niederacher D., Massenkeil G., Tutschek B., Beckmann A., Schenko G., Schnürch H.G. Bender H.G., Expression Analysis of epidermal Growth Factor Receptor and HER-2/neu: No Advantage of Prediction of Recurrence or Survival in Breast Cancer Patients, *Oncology* **1996**, 53, 441-447.
- ⁵⁸ UICC (Union Internationale Contre le Cancer), TNM-Klassifikation maligner Tumoren, Springer, Berlin **1987**.
- ⁵⁹ Bloom HJG., Richardson WW., Histological grading and prognosis in breast cancer, *Br. J. Cancer* **1957**, 11, 359.
- ⁶⁰ EORTC Breast Cancer Cooperative Group, Revision of standards for the assessment of hormone receptor in human breast cancer, Report on second EORTC workshop, *Eur. J. Cancer* **1980**, 16, 1513-1515.
- ⁶¹ Dixon D., BMDP statistical software, Department of biostatistics, University of California, Los Angeles, *University of California Press* **1981**.
- ⁶² Kaplan EL., Meier P., Nonparametric estimation from incomplete observations, *J. Am. Stat. Assoc.* **1958**, 53, 457-481.
- ⁶³ Breslow N., A generalized Kruskal-Wallis test for comparing k-samples subjected to unequal patterns of censorship, *Biometrics* **1970**, 57, 579-594.
- ⁶⁴ Emig R., Magener A., Ehemann V., Meyer A., Stilgenbauer F., Volkmann M., Wallwiener D., Sinn HP., Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation, *British J. Cancer* **1998**, 78, 1661-1668.
- ⁶⁵ Baak J., van Dop H., Kurver P., Hermans J., The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer, *Cancer* **1985**, 56, 374-382.
- ⁶⁶ Biesterfeld S, Klüppel D, Koch R, Schneider S, Steinhagen G, Mihalcea AM, Schröder W., Rapid and prognostically valid quantification of immunohistochemical reactions by immunohistometry of the most positive tumour focus. A prospective follow-up study on breast cancer using antibodies against MIB-1, PCNA, ER, and PR, *J Pathol* **1998**, 185, 25-31, DNA-Malignitätsgradierung des Mammakarzinoms, Med. Diss., RWTH Aachen, **1989**.

-
- ⁶⁷ Friedl W., Herfarth CH., Langzeitprognose des Mammakarzinoms, *Langenbecks Arch. Chi.* **1992**, 377,168-173.
- ⁶⁸ Layfield LJ., Saria EA., Conlon DH, Kerns BJ., Estrogen and Progesterone Rezeptor Status determined by the Ventana ES 320 Automated Immunohistochemical Stainer and the CAS 200 Image Analyser in 236 Early-Stage Breast Carcinomas, Prognostic Significance, *J. Surg. Oncol.* **1996**, 61, 177-184.
- ⁶⁹ Henson DE., Ries L., Freedman LS., Carriaga M., Relationship among outcome, Stage of Disease, and Histologic Grade for 22.616 Cases of breast cancer, *Cancer* **1991**, 68, 2142-2149.
- ⁷⁰ Niezabitowski A., Rys J., Lackowska B., Dyba T., Stelmach A., Gruchala A., Wasilewska A., Szkarski W., Kruczak A., Swiatkiewicz I., Relationship of histology, DNA-values and proliferative activity in unselected breast cancer patients (a preliminary study), *Pol. J. Pathol.* **1995**, 46, 23-28.
- ⁷¹ Eissa S., Khalifa A., el-Gharib A., Salah N., Mohamed MK., Multivariate analysis of DNA ploidy, p53, c-erb-2 protein, EGFR and steroid hormone receptors for short-term prognosis in breast cancer, *Anticancer Res.* **1997**, 17, 3091-3097.
- ⁷² Gago FE., Tello OM., Diblasi AM., Ciocca DR., Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular factors in breast cancer patients, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 67, 431-437.
- ⁷³ Narita M., Nakao K., Ogino N., Nakahara M., Onishi A., Tsujimoto M., Independant prognostic factors in breast cancer patients, *Am. J. Surg.* **1998**, 175, 73-75.
- ⁷⁴ LeDoussal V., Tubiana-Hulin M., Hacene K., Friedman S., Brunet M., Nuclear characteristics as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients, *Breast Cancer Res. Treat.* **1989**, 14, 207.
- ⁷⁵ Stenkvist B., Bengtsson E., Ericson O., Jarkrans T., Nordin B., Westman-Naeser S., Histo-pathological systems of breast cancer classifiaction: reproductility and clinical signifance, *J. Clin. Pathol.* **1983**, 36, 392-398.
- ⁷⁶ Balslev I., Axelsson CK., Zedeler K., Bruun Rasmussen B., Carstensen B., Mouridsen. H., The Nottingham Prognostic Index applied to 9.149 Patients from the studies of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (DBCG), *Breast Cancer Res. Treat.* **1994**, 32, 281-290.
- ⁷⁷ Elston CW., Ellis IO., Pathological prognostic factors in breast Cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up, *Histopathology* **1991**, 19, 403- 410.

-
- ⁷⁸ Genestie C., Zafrani B., Asselain B., Fourquet A., Rozan S., Validire P., Vincensalomon A., Sastre-Garau X., Comparison of the Prognostic Value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham Histological Grades in a Series of 825 Cases of Breast Cancer: Major Importance of the mitotic Count as a Component of Both Grading Systems, *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 571-576.
- ⁷⁹ Reiner A., Neumeister B., Spona J., Reiner G., Schemper M., Jakesz R., Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 7057-7061.
- ⁸⁰ Molino A., Micciolo R., Turazza M., Bonetti F., Piubello Q., Corgnati A., Sperotto L., Recaldin E., Spagnoli P., Manfrin E., Bonetti A., Nortilli R., Tomezoli A., Pollini G.P., Modena S., Cetto G.L., Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancer: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods, *Breast cancer Res. Treat.*, **1997**, *45*, 241-249.
- ⁸¹ Gago F.E., Tello O.M., Diblasi A.M., Ciocca, D.R., Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients, *J. Steroid Biochem. Mol.* **1998**, *67*, 431-437.
- ⁸² Ellis P., Smith I., Ashley S., Walsh G., Ebbs S., Baum M., Sachs N., McKinna J., Clinical Prognostic and Predictive Factors for Primary Chemotherapy in Operable Breast Cancer, *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 107-114.
- ⁸³ Gasparini G., Boracchi P., Verderio P., Bevilacqua P., Cell kinetics in human breast cancer: Comparison between the prognostic value of the cytofluorimetric s-phase fraction and that of the antibodies to ki-67 and pcna antigens detected by immunohistochemistry, *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 822-829.
- ⁸⁴ Mitze M., Weikel W., Brumm C., Lippold R., Knapstein P., Einfluß der Proliferationsrate auf den Krankheitsverlauf von nodal negativen Mammakarzinomen, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **1995**, *55*, 299-305.
- ⁸⁵ Kovach JS., Hartmann A., Blaszyk H., Cunningham J., Schaid D., Sommer SS., Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 1096-1096.
- ⁸⁶ Lethaby A., Mason B., Harvey V., Holdaway I., Survival of woman with node negative breast cancer in the Auckland region, *N. Z. Med. J.* **1996**, *109*, 303-333.
- ⁸⁷ Somlo G., Doroshow J., Forman S., Odom-Maryon T., Lee J., Chow W., High-Dose Chemotherapy and Stem-Cell Rescue in the Treatment of High-Risk Breast Cancer: Prognostic Indicators of Progression-Free and Overall Survival, *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 2882-2893.

-
- ⁸⁸ Coradini D., Biganzoli E., Boracchi P., Bombardieri E., Seregni E., De Palo G., Martelli G., Di Fonzo D., Effect of steroid receptors pS2 and cathepsin D on the outcome of elderly breast cancer patients: an exploratory investigation, *Int. J. Cancer* **1998**, 79, 305-311.
- ⁸⁹ Hunter T., Pines J., Cyclins and cancer. II. Cyclin D and CDK inhibitors come of age, *Cell* **1994**, 79, 573-582.
- ⁹⁰ Sherr CJ., G1 phase progression: cycling on cue, *Cell* **1994**, 79, 551-555.
- ⁹¹ Tsihlias J., Kapusta L., Slingerland J., The prognostic significance of altered cyclin-dependant kinase inhibitors in human cancer, *Ann. Rev. Med.* **1999**, 50, 401-423.
- ⁹² Dong Y., Walsh MD., McGuckin MA., Reduced expression of retinoblastoma gene product (pRB) and high expression of p53 are associated with poor prognosis in ovarian cancer, *Int. J. Cancer* **1997**, 74, 407-415.
- ⁹³ Xu L., Sgroi D., Sterner CJ., Beauchamp RL., Pinney DM., Keel S., Ueki K., Rutter JL., Buckler AJ., Louis DN., Gusella JF., Ramesh V., Mutational analysis of CDKN2 (MTS1/p16^{INK4}) in human breast carcinomas, *Cancer Res.* **1994**, 54, 5262-5264.
- ⁹⁴ Quesnel B., Fenaux P., Philippe N., Fournier J., Bonnetterre J., Preudhomme C., Peyrat JP., Analysis of p16 gene deletion and point mutation in breast carcinoma, *Br. J. Cancer* **1995**, 72, 351-353.
- ⁹⁵ Musgrove EA., Lilischkis R., Cornish AL., Lee CS., Setlur V., Seshadri R., Sutherland RL., Expression of the cyclin-dependant kinase inhibitors p16INK4, p15INK4b and p21 WAF1/CIP1 in human breast cancer, *Int. J. Cancer* **1995**, 63, 584-591.
- ⁹⁶ Cairns P., Polascik TJ., Eby Y., Tokino K., Califano J., Merlo A., Mao L., Herath J., Jenkins R., Westra W., Rutter JL., Buckler A., Tockman M., Bova GS., Schwab D., Sidransky D., Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours, *Nature Genet.* **1995**, 11, 210-212.
- ⁹⁷ Van Zee KJ., Calvano JE., Bisogna M., Hypomethylation and increased gene expression of p16^{INK4a} in primary and metastatic breast carcinoma as compared to normal breast tissue, *Oncogene* **1998**, 16, 2723-2727.
- ⁹⁸ Parry D., Bates S., Mann DJ., Peters G., Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16^{INK4}/MTS1 tumour suppressor gene product, *EMBO J.* **1995**, 14, 503-511.
- ⁹⁹ Kinoshita I., Doaska-Akita H., Mishina T., Akie K., Nishi M., Hiroumi H., Hommura F., Kawakami Y., Altered p16^{INK4} and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity, *Cancer Res.* **1996**, 56, 5557-5562.

-
- ¹⁰⁰ Dong Y., Walsh MD., McGuckin MA., Gabrielli BG., Cummings M., Wright RG., Hurst T., Khoo SK., Parsons PG., Increased expression of cyclin-dependant kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product p16^{INK4a} in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis, *Int. J. Cancer* **1997**, 74, 57-63.
- ¹⁰¹ Sherr CJ., Roberts JM., CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev.* **1999**, 13, 1501-1512.
- ¹⁰² Lukas J., Parry D., Aagaard L., Mann D., Bartkova J., Strauss M., Peters G., Bartek J., Retinoblastoma-protein-dependant cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16, *Nature* **1995**, 375, 503-506.
- ¹⁰³ Gorgoulis VG., Koutroumbi EN., Kotsinas A., Zacharatos P., Markopoulos C., Giannikos L., Kyriakou V., Voulgaris Z., Gogas I., Kittas C., Alterations of p16-pRB Pathway and Chromosome Locus 9p21-22 in Sporadic Invasive Breast Carcinomas, *Mol. Medicine* **1998**, 4, 807-822.
- ¹⁰⁴ Dublin EA., Patel NK., Gillett CE., Smith P., Peters G., Barnes DM., Retinoblastoma and p16 protein in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters, *Int. J. Cancer* **1998**, 79, 71-75.
- ¹⁰⁵ Geradts J., Kratzke RA., Niehans GA., Lincoln CE., Immunohistochemical detection of the cyclin-dependant kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16^{INKFA} in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression, *Cancer Res.* **1995**, 55, 6006-6011.
- ¹⁰⁶ Sze Chen Wong C., Chan JKC, Lee KC., Wendy Hsiao WL., Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast, *J Pathol* **2001**, 194, 35-42.
- ¹⁰⁷ Sehwan H., Sei-Hung A., Kyeongmee P., Byung-Noe B., Ki Hwan K., Hong-Joo K., Young-Duck K., Hong-Yong K., p16INK4a protein expression is associated with poor survival of the breast cancer patients after CMF chemotherapy, *Breast Cancer Res. Treat.* **2001**, 70, 205-212.
- ¹⁰⁸ Ito Y., Kobayashi T., Takeda T., Expression of p16 and cyclin-dependant kinase 4 proteins in primary breast carcinomas, *Oncology* **1997**, 54, 508-515.
- ¹⁰⁹ Marsh KL., Varlay JM., Frequent alterations of cell cycle regulators in early-stage breast lesions as detected by immunohistochemistry, *Br. J. Cancer* **1998**, 77, 1439-1447.
- ¹¹⁰ Emig R., Magener A., Ehemann V., Meyer A., Stilgenbauer F., Volkmann M., Wallwiener D., Sinn HP., Aberrant cytoplasmic expression of the p16 protein in breast cancer is associated with accelerated tumour proliferation, *British J. Cancer* **1998**, 78, 1661-1668.

-
- ¹¹¹ Milde-Langosch K., Bamberger A., Methner C., Rieck G., Löning T., Expression of cell cycle-regulatory proteins Rb, p16/MTS1., p27/KIP1, p12/WAF1, Cyclin D1, and Cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members, *Int. J. Cancer* **2000**, 87, 468-472.
- ¹¹² Milde-Langosch K., Bamberger A., Rieck G., Kelp B., Löning T., Overexpression of p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotyp, *Breast Cancer Res. Treat.* **2001**, 67, 61-70.
- ¹¹³ Hui R., Macmillan D., Kenny FS., Musgrove E., Blamey RW., Nicholson R., Robertson JF., Sutherland RL., INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16^{INK4a} messenger RNA is a marker of poor prognosis, *Clinical Cancer Res.* **2000**, 6, 2777-2787.
- ¹¹⁴ Campbell I., Magliocco A., Moyana T., Zheng C., Xiang J., Adenovirus-mediated p16^{INK4} gene transfer significantly suppresses human breast cancer growth, *Cancer Gene Therapy* **2000**, 7, 1270-1278.
- ¹¹⁵ Donegan WL., Tumor-related prognostic factors for breast cancer, *A Cancer Journal for Clinicians* **1997**, 47(1), 28-51.

9 DANKSAGUNG

Durch die spannenden und mit unbändigem Enthusiasmus gehaltenen Vorlesungen von Professor Dr. Ch. Mittermayer wurde mein Interesse an der Pathologie geweckt. In den Laboren des unter seiner Leitung stehenden Institutes für Pathologie des Universitätsklinikum Aachens konnte ich den experimentellen Teil dieser Arbeit durchführen.

Während der ganzen Zeit von der Entstehung dieser Doktorarbeit bis zur endgültigen Fertigstellung und auch noch später darüber hinaus, war PD Dr. S. Biesterfeld, derjenige, der mit viel Interesse, Verständnis, mit kritischer und wohlwollender Anregung diese Arbeit ständig begleitet hat. Nicht nur für die Bereitstellung des Themas danke ich ihm, sondern auch für die Freundschaft, die sich daraus entwickelt hat.

Einen besonderen Dank gebührt Frau Baumann, die mir bei den Laborarbeiten in Ihrer freundlichen Art immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir bei der sorgfältigen Anfertigung der histologischen Schnitte eine große Hilfe war.

Meiner Freundin Nele ist es mir unmöglich, hier in nur so wenigen Zeilen zu danken. Es hat einfach Spaß gemacht, gemeinsam die Präparate zum x-ten Male zu mikroskopieren, gemeinsam die Daten stundenlang in den Computer einzugeben und auszuwerten und gemeinsam in den verschiedensten Bibliotheken in den unzähligen Artikeln nach Literatur zu suchen, ...

Ganz zum Schluß möchte ich noch und vor allem meinen Eltern danken. In jeder Hinsicht waren Sie immer für mich da!

10 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Corinne Scozzai
Geburtsdatum und Ort: 12.08.1977, Ettelbrück/Luxemburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: luxemburgisch

Schul Ausbildung

1983-1989: Ecole primaire Bettendorf (Lux.)
1989-1996: Lycée classique Diekirch, section C scientifique classique

Studium

1996-1997 : Centre Universitaire de Luxembourg, section médecine
07/1997: Certificat d'études scientifiques
10/1997 : Wechsel zur RWTH Aachen, Medizinische Fakultät
09/1998: Physikum
09/1999: I. Staatsexamen
09/2001: II. Staatsexamen
11/2002: III. Staatsexamen

Praktisches Jahr

2001-2002: Chirurgie, Innere und Anästhesie im St. Antonius Hospital
Eschweiler

Berufliche Tätigkeit

04/2003-10/2004: AiP in der Kinderklinik der Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden
seit Oktober 2004: Assistenzärztin in der Kinderklinik der HSK Wiesbaden