

Aus dem Institut für Onkologische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. H. Bojar

**Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung von
p53-Veränderungen im Vergleich zu den Standardfaktoren beim Mammakarzinom
aus den multizentrischen Therapiestudien 2 und 3
der German Breast-Cancer Study Group**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nina Lüttgen

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Häussinger
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. H. Bojar

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Schmitt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	2
1.1	Das Tumorsuppressorgen p53.....	2
1.2	Erläuterung der ausgewählten Methoden und der Studie.....	6
1.2.1	Immunhistochemie.....	6
1.2.2	LOH-Detektion.....	6
1.2.3	German Breast-Cancer Study Group-Studien.....	7
1.3	Fragestellung.....	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Verwendete Abkürzungen und Symbole.....	9
2.2	Probenmaterial.....	10
2.3	Immunhistochemischer Nachweis des p53-Proteins.....	10
2.4	LOH-Analyse.....	13
2.4.1	DNA-Gewinnung.....	13
2.4.2	PCR.....	15
2.4.3	Primer.....	16
2.4.4	Semiautomatische DNA Fragmentlängenanalyse.....	17
2.5	Statistische Methoden.....	18
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse.....	19
3.2	Ergebnisse der LOH-Analyse.....	38
4	Diskussion	45
5	Literaturverzeichnis	55
6	Lebenslauf	69
7	Danksagung	70
8	Zusammenfassung	71

1 Einleitung

1.1 Das Tumorsuppressorgen p53

Die erste Beschreibung des zellulären p53-Proteins erfolgte 1979. Entdeckt wurde dieses Protein im Rahmen einer Forschungsarbeit an dem damals sehr populären DNA-Tumorvirus SV40, mit dessen T-Antigen es einen Komplex bildet (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine 1979). Weitere Studien wurden durchgeführt, die alle zu einem Ergebnis kamen: p53-Protein befindet sich in geringen Mengen in normalen Zellen, während eine wesentlich höhere Konzentration in SV40 transformierten Zellen und unterschiedlichen Tumorzellen nachweisbar ist (DeLeo et al., 1979). Zu dieser Zeit wurde intensiv die Struktur und Funktion von Onkogenen untersucht. Mittels Onkogen-DNA-Transfer konnten transformierende Eigenschaften auf normale Zellen übertragen werden. Diese transformierende Aktivität wurde bestimmten Genen zugeordnet, die bereits als Onkogene von RNA-Tumorviren bekannt waren. Auf Grund der Anreicherung von p53-Protein in Tumorzellen und den damaligen Forschungsarbeiten wurde postuliert, dass p53 ein Proto-Onkogen sei. Tatsächlich gelang die Klonierung des Maus-p53-Gens (Oren und Levine, 1983) und verschiedene Forschungseinrichtungen konnten die onkogenen Effekte des klonierten p53-Gens sowohl in vitro als auch in vivo nachweisen (Eliyahu et al., 1984; Jenkins et al., 1984; Parada et al., 1984).

Angezweifelt wurden die onkogenen Eigenschaften von p53, als ein muriner p53-Klon, p11-4, in Transformations-Assays nicht mit dem ras-Onkogen kooperierte (Hinds et al., 1987). Es handelte sich bei p11-4 um Wildtyp p53-cDNA (Hinds et al., 1989). Im Gegensatz dazu enthielten die Zelllinien, von denen die frühen p53-cDNA-Klone stammten, in Wirklichkeit ein mutiertes p53-Gen. Alle Versuche, die auf die onkogenen Eigenschaften von p53 hinwiesen, waren demnach mit mutierten Versionen dieses Gens durchgeführt worden. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass Wildtyp p53 die transformierende Aktivität einiger sehr potenter zellulärer und viraler Onkogene verhindern kann (Eliyahu et al., 1989; Finlay et al., 1989). Diese neueren Erkenntnisse konnten nicht mit der konventionellen Meinung, dass p53 ein Onkogen sei, in Einklang gebracht werden. Man kam nach weiteren Analysen zu der Überzeugung, dass p53 deutliche Eigenschaften eines Tumorsuppressorgens zeigt (Baker et al., 1989).

Das p53-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1). Es kodiert ein 53 kD großes Protein aus 393 Aminosäuren, das als Tetramer vorliegt. Das p53-Gen besteht aus 11 Exonen, von denen Exon 2 bis 11 translatiert werden. In den Exonen 1,4,5,7 und 8 befinden sich fünf konservierte Domänen. Diese Bereiche sind vom Krallenfrosch bis zum Menschen nahezu identisch und sind für die Funktion des p53-Proteins essentiell (Baker, 1996).

Als Kernprotein übernimmt p53 unter anderem die Aufgabe eines Transkriptionsfaktors und bestimmt damit die Regulation bestimmter Zielgene. Das Protein kann in drei funktionelle Abschnitte unterteilt werden: Die N-terminalen 42 Aminosäuren haben transkriptionsaktivierende Eigenschaften, die wesentlich für die Initiation der Transkription der entsprechenden Zielgene verantwortlich sind (Fields und Jang, 1990). Die DNA-bindende Region umfasst die Aminosäuren 102 bis 292. In diesem Bereich liegen die Erkennungssequenzen für die Zielgene, deren Transkription durch das p53-Protein reguliert werden (Hupp et al., 1992; Wang et al., 1993). Über diese zentrale Domäne kann p53 sequenzspezifisch DNA binden; sie besitzt aber auch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (Janus et al., 1999). Der dritte Abschnitt umfasst den C-terminalen Bereich des p53-Moleküls. Auch diese Region beinhaltet mehrere funktionelle Domänen. Als bekannteste sei die Oligomerisierungsdomäne genannt, die dafür verantwortlich ist, dass p53 in der Zelle hauptsächlich als Tetramer vorliegt. Weiterhin kann p53 über den äußersten C-Terminus nicht-sequenzspezifisch DNA binden und die Funktion des zentralen p53-Bereichs kontrollieren (Hupp, 1999).

1992 beschrieb Lane p53 als „guardian of the genome“. Seit dieser Zeit wird die Hauptfunktion des p53 in der Erhaltung der Stabilität der Erbinformation gesehen. Verschiedene Insulte wie DNA-Schäden oder auch Sauerstoffmangel führen zu einer Akkumulation von p53-Protein im Zellkern. Das p53-Protein kann dann einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus oder den programmierten Zelltod induzieren (Levine, 1995). Es wird vermutet, dass das Ausmaß der Schäden bestimmt, welcher dieser beiden Wege eingeschlagen wird. Handelt es sich um einen reparablen Schaden im Erbgut, würde der Stopp in der G1-Phase genutzt werden, die fehlerhafte DNA zu reparieren. Ist der Schaden allerdings groß, wäre die Apoptose der sicherere Weg zu vermeiden, dass sich eine Mutation im Genom fixiert. Der wohl bekannteste molekulare Mechanismus ist die transkriptionelle Aktivierung des 'wild-type p53-activated fragment'- (WAF-1) Gens durch p53. Das WAF-1-Gen ist in

diesem Beispiel das durch p53 regulierten Zielgen, dessen Produkt p21 Kinasen hemmt, die für die Progression des Zellzyklus wichtig sind (Janus et al., 1999).

In letzter Zeit werden p53 noch weitere Funktionen zugeschrieben, die als „dual role model“ in die Literatur eingegangen sind. Ging man früher davon aus, dass p53 in unbeschädigten Zellen inaktiv ist, wird heute vermutet, dass p53 eine 3'→5' Exonukleaseaktivität hat (Janus et al., 1999). Exonukleasen sind eine Gruppe von Enzymen, die Nukleinsäuren von den Kettenenden her schrittweise hydrolytisch zu Mononukleotiden abbauen können. Es wird angenommen, dass p53 bei Auftreten endogener DNA-Schäden, z.B. Replikationsfehlern, als Exonuklease aktiv an der DNA-Reparatur beteiligt ist, wohingegen DNA-Schäden, die durch exogene Noxen ausgelöst werden, zur Aktivierung der Transkriptionsaktivität führen. Auf weitere Aufgaben des p53-Gens und eine differenziertere Beschreibung der Abläufe soll hier nicht näher eingegangen werden. Eine aktuelle Übersicht bietet die Zusammenfassung von Janus et al. (1999).

Mutationen im p53-Gen sind die bei menschlichen Tumoren am häufigsten nachweisbaren Genveränderungen (Schlegel, 1994; Lane und Benchimol, 1990; Levine et al., 1991). Die vorherrschenden Mutationen sind Punktmutationen (ca. 85%), die aus dem Austausch eines Nukleotids bestehen. Seltener (ca. 10%) treten Deletionen oder Insertionen auf, die meist zu einer Leserasterverschiebung innerhalb der kodierenden Region führen (Levine et al., 1994). Als Folge einer Deletion eines Teiles von Chromosom 17p kann auch ein p53-Allel verloren gehen. Das auf dem unbeschädigten Chromosom verbleibende Allel kodiert dann allein für das p53-Protein. Meist ist das noch verbleibende Allel mutiert, so dass die Zelle kein funktionstüchtiges p53-Protein mehr hervorbringen kann. Der Verlust eines Allels wird LOH (loss of heterozygosity) genannt. Aber auch Mutationen in einem Allel bei erhaltenem zweiten Wildtyp-Allel können eine transformierende Wirkung haben. Das mutante Protein ist zwar nicht mehr funktionsfähig, vermag jedoch häufig mit dem Wildtyp p53-Protein einen Komplex einzugehen. Einige Mutationen haben eine dominant aktivierende onkogene Wirkung, die zu einem fast vollständigen Funktionsausfall des Wildtyp p53-Proteins in der Zelle führt (Schlegel, 1994).

Onkogene können ebenfalls p53-Protein an der Ausübung seiner Funktion hindern. Ein derartiges Onkogenprodukt ist mdm-2. Dieses Protein kann eine Bindung mit p53 eingehen, die zwei Konsequenzen hat: zum einen kann p53 nicht mehr als Transkriptionsfaktor dienen und zum anderen wird p53 schneller abgebaut. mdm-2 verhält sich also zu p53 antagonistisch (Oren and Rotter, 1999).

Neben den häufigeren somatischen p53-Mutationen kommen auch hereditäre p53-Veränderungen vor (Malkin et al., 1990). Die betroffenen Familien leiden unter dem seltenen Li-Fraumeni-Syndrom, das mit einer erhöhten Inzidenz von Mammakarzinomen, Osteosarkomen, Weichteilsarkomen, Gehirntumoren und Leukämien einhergeht.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wird die prognostische Bedeutung von p53 kontrovers diskutiert. Einerseits scheint eine Mutation im p53-Gen für verschiedene Tumoren ein ungünstiger prognostischer Faktor zu sein. Es wird diesbezüglich ein Zusammenhang sowohl zwischen dem Ansprechen als auch einer Resistenzentwicklung auf eine Chemotherapie und dem p53-Status eines Tumors diskutiert (Lowe et al., 1993; Petty et al., 1994). Weiterhin ist beobachtet worden, dass die intakte Funktion des p53-Gens positiv mit der Radiosensitivität einiger Tumoren korreliert (Girod et al., 1998). Eine aktuelle Übersicht zu dem Thema p53 und Strahlenempfindlichkeit bietet der Artikel von Dahm-Daphi (2000). Enthalten Tumoren Wildtyp p53, erscheint das Ansprechen auf eine Therapie besser und die 5-Jahresüberlebensrate höher zu sein. Wahrscheinlich aktiviert eine Bestrahlung oder eine andersartige Schädigung der DNA der Tumorzellen das Wildtyp p53-Protein, das daraufhin die Apoptose einleitet (Levine, 1995). Hinzu kommt, dass eine Therapie, die Zellen, die ein mutiertes p53-Gen aufweisen, nicht zerstört, einen Selektionsvorteil für diese zur Folge hätte. Eine lokales Rezidiv oder eine Metastase würden wesentlich mehr p53 defiziente Zellen beinhalten als der ursprüngliche Primärtumor.

Andererseits sind auch Studien veröffentlicht worden, in denen z.B. Blasen Tumoren mit p53-Mutationen besser auf Chemotherapeutika angesprochen haben (Cote et al., 1997). Während p53 einerseits als wichtigster Indikator für eine ungünstige Prognose beim Mammakarzinom gesehen wird, gibt es aber auch Studien, die die prognostische Bedeutung von p53 in Frage stellen (Pietiläinen et al., 1995; Rozan et al., 1998; Brachmann et al., 1993).

In den westlichen Industrieländern ist das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Jede 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens. Die Inzidenz des Mammakarzinoms steigt kontinuierlich mit dem Alter. Es bestehen regionale Unterschiede; so ist Brustkrebs z.B. in Skandinavien häufiger als in Japan. Die Beurteilung der 5-Jahresüberlebensrate ist im Gegensatz zu anderen Krebserkrankungen besonders kritisch, da noch nach 10 bis 15 Jahren eine Metastasenentwicklung möglich ist (tumor dormancy). In 60-70% der Fälle muss schon bei Diagnosestellung mit einer nicht nachweisbaren Metastasierung über den lokoregionalen Bereich hinaus gerechnet werden. Die Prognose quod vitam wird durch diese Metastasierung

bestimmt. Als wichtigste Risikofaktoren gelten eine positive Familienanamnese, Kinderlosigkeit, frühe Menarche und späte Menopause (Martius et al., 1996). Am ausführlichsten ist p53 beim Mammakarzinom untersucht worden. Alterationen des p53 werden sehr häufig in spontanen Karzinomen der Brustdrüse gefunden. Einige Studien konnten eine positive Korrelation zwischen p53-Mutationen und negativem Östrogenrezeptorstatus, negativer Progesteronrezeptorexpression oder positivem EGFR-Status (epidermal growth factor receptor) eruieren. Tumoren mit einem prognostisch günstigem Grade wiesen seltener p53-Mutationen auf (Ozbun und Butel, 1995). p53-Mutationen scheinen für Therapieversagen, Tumorrezidive und Tod mitverantwortlich zu sein (Kovach et al., 1996; Clahsen et al., 1998).

1.2 Erläuterung der ausgewählten Methoden und der Studie

1.2.1 Immunhistochemie

Für den immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins stehen verschiedene p53-Antikörper zur Verfügung, die an Paraffinmaterial eingesetzt werden können. Das Wildtyp p53-Protein hat in einer normalen Zelle eine nur kurze Halbwertszeit (5 bis maximal 45 Minuten) und ist deshalb einer immunhistochemischen Erkennung meist nicht zugänglich (Shauly et al., 1990). Eine immunhistochemische Detektion erfordert eine Akkumulation des p53-Proteins, die meist Folge einer Genmutation ist (Schlegel 1994). Aber auch die Bindung einiger viraler Proteine an das p53-Protein können ein positives Ergebnis der Immunhistochemie bewirken (Thorlacius et al., 1995).

Bedingt durch die unterschiedlichen Spezifitäten und auch Sensitivitäten der zur Verfügung stehenden Antikörper sind die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen in Abhängigkeit von der Wahl der Antikörper und der Methodik zu interpretieren.

1.2.2 LOH-Detektion

Der Verlust von Heterozygotie (LOH) ist typisch für Tumorsuppressorgene wie p53. Durch paarweises Durchmusterung von Normalgewebe und Tumorproben eines Patienten auf einen spezifischen Marker, kann ein LOH im oder in der Nähe des untersuchten Gens entdeckt werden. Durch den Einsatz von mehreren solcher Marker kann der Umfang eines LOHs abgeschätzt werden. Voraussetzung für die LOH-Detektion ist, dass der Patient im

Normalgewebe heterozygot für einen bestimmten Marker ist. Weist das Tumorgewebe nur noch eine Homozygotie auf, liegt ein LOH vor. Ist hingegen das Normalgewebe des Patienten homozygot für einen bestimmten Marker, liefert das Verfahren keine Information über einen Allelverlust im Tumor. Um den Anteil dieser uninformativen Proben zu verringern, können Marker für polymorphe Mikrosatelliten verwendet werden. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen, die im gesamten Genom verteilt sind (Louis et al., 1992).

1.2.3 German Breast-Cancer Study Group-Studien

Die Untersuchungen wurden an Proben aus den multizentrischen Therapiestudien 2 und 3 der German Breast-Cancer Study Group durchgeführt. 1984 begannen diese beiden Therapiestudien, um bei nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen verschiedene adjuvante Therapieformen zu vergleichen. Zwischen 1984 und 1989 wurden 1048 Patientinnen aus 63 verschiedenen Kliniken den Studien zugeführt. Alle Patientinnen wiesen bei Studieneintritt keine Metastasierung auf. Die Primäroperation war eine modifizierte radikale Mastektomie nach Patey mit axillärer en bloc Lymphknotendisektion. Anschließend folgten 3 oder 6 Zyklen CMF (500 mg/m² Cyclophosphamid, 40 mg/m² Methotrexat, 600 mg/m² Fluorouracil). Die Chemotherapie wurde an Tag eins und acht eines vier Wochen Turnus intravenös gegeben. Einige Patientinnen erhielten zusätzlich 30 mg Tamoxifen über zwei Jahre oder eine Radiotherapie. Die Radiotherapie wurde zwischen dem zweiten und dritten Zyklus CMF verabreicht. Bestrahlt wurden der Brustkorb, die parasternalen und supraclaviculären Lymphknoten und die Axilla. Die totale Dosis betrug 44 Gy. Als prognostische Standardfaktoren wurden Patientinnenalter, Menopausenstatus, Anzahl der positiven Lymphknoten, Tumorgroße, Grade nach Bloom und Richardson, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus festgelegt. Zur Bestimmung des Lymphknotenstatus wurden mindestens sechs Lymphknoten histopathologisch begutachtet. Für die Hormonrezeptoranalyse wurde Tumorgewebe direkt nach der Exzision auf Eis gelegt, von nicht tumorösen Anteilen gereinigt und auf Trockeneis tiefgefroren. Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert. Innerhalb der nächsten zwei Wochen wurde die Hormonrezeptorstatus mittels Mehrpunkt-Dextran-Kohle-Methode bestimmt (Struse et al., 2000). Die Qualitätskontrolle erfolgte zentral durch das Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung von p53 für das Mammakarzinom untersucht.

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche prognostische Relevanz hat der immunhistochemische p53 Status?
- Wie verhalten sich die Standardfaktoren in dem untersuchten Patientenkollektiv?
- Hat ein LOH im p53 Gen eine Auswirkung auf das Überleben der Patientinnen?
- Besteht eine Korrelation zwischen positiven immunhistochemischen p53 Status und LOH?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Abkürzungen und Symbole

AK	Antikörper
aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EtOH	Ethanol
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horse-raddish-peroxidase
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenverlängerungs-Reaktion
RAD	Radiotherapie
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
TAM	Tamoxifen
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
u	unit (Enzymeinheit)

2.2 Probenmaterial

Der immunhistochemische Nachweis des p53-Proteins erfolgte an 174 Proben und 79 Proben konnten auf ein LOH untersucht werden. Die Einschränkung auf das Teilkollektiv beruhte darauf, dass dem Institut für Onkologische Chemie nur von einem Teil der Patientinnen geeignete Paraffinblöcke für die jeweilige Untersuchung zur Verfügung standen. Das Probenmaterial wurde in den jeweiligen Kliniken, in denen die Patientinnen operiert worden waren, mit unterschiedlichen Methoden in Paraffin fixiert. Anschließend wurden die Proben sieben bis 14 Jahre gelagert, bevor sie untersucht wurden. Die jüngste Patientin war 27 Jahre, die älteste Patientin 79 Jahre alt. Im Mittel lag das Alter der untersuchten Patientinnen bei 55 Jahren. Die mediane Nachbeobachtung bezüglich des rezidivfreien Überlebens betrug neun Jahre; die mediane Nachbeobachtung bezüglich des Gesamtüberlebens betrug zehn Jahre. Rezidivfreies Überleben wurde definiert als Zeit zwischen Mastektomie und erstem Rückfall (lokoregionäres Rezidiv, Fernmetastasen, kontralateraler Zweittumor, Tod ohne vorherigen Rückfall). Die Gesamtüberlebenszeit wurde vom Zeitpunkt der Mastektomie bis zum Tod der Patientin bestimmt. In dem Kollektiv von 174 Patientinnen wurden 108 Ereignisse bezüglich des rezidivfreien Überlebens und 97 Ereignisse bezüglich des Gesamtüberlebens gezählt.

2.3 Immunhistochemischer Nachweis des p53-Proteins

Zum immunhistochemischen Nachweis des p53-Proteins am Paraffinmaterial wurde der monoklonale Anti-Antikörper DO-1 der Firma Dianova (Hamburg/ Deutschland) verwendet. DO1 bindet die Aminosäuren 1 bis 45 des p53-Proteins (Jacquemier et al., 1994).

5 µm Paraffinschnitte wurden auf einem Super Frost Objektträger (Menzel/ Braunschweig / Deutschland) bei 37°C über Nacht getrocknet.

Nach 20-minütiger Inkubation bei 70°C wurden die Objektträger entparaffiniert:

Xylol	4 mal	5 min
100% Aceton	2 mal	5 min
70% Aceton	2 mal	5 min
40% Aceton	2 mal	5 min
aqua dest.	2 mal	5 min

Die Epitopdemaskierung der Paraffinschnitte in der Mikrowelle erfolgte in einer Schale in 400 ml 0,01 M Na-Citrat pH 6,0. Der erste Durchgang dauerte 10 min, die weiteren vier je 5 min. Nach jedem Zyklus wurde der Flüssigkeitsspiegel mit 50 ml aqua dest. aufgefüllt.

Anschließend wurden die Präparate 30 min bei RT inkubiert und 2 mal für 5 min in PBS getaucht.

Um unspezifische Reaktionen zu verhindern, wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Blocken der endogenen Peroxidase mit 0,3% H₂O₂/ aqua dest. bei RT für 15 min
- Einstellen der Präparate in PBS je 2 mal für 5 min
- Blocken von unspezifischen Bindungsstellen mit 100µl Humanserum bei RT für 5 min

Über Nacht wurden die Präparate mit je 100 µl Primärantikörper p53 DO-1 (Maus) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie 2 mal für 5 min in PBS getaucht.

Die Inkubation mit dem biotinylierten Brückenantikörper erfolgte bei RT für 30 min.

Dazu wurde je 100 µl E 413 (Dako/ Hamburg/ Deutschland) Kaninchen anti Maus F(ab')₂ in einer Verdünnung 1:350 in 2,5% BSA/Tris in einer feuchten Kammer verwendet.

Anschließend wurden die Präparate 2 mal für 5 min in PBS gestellt.

Die Schnitte wurden dann für 30 min bei RT mit 100 µl StreptAvidin-Biotin-Komplex-HRP-konjugiert (Dako/ Hamburg/ Deutschland) inkubiert. Die Anwendung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Anschließend wurden die Präparate nochmals je 2 mal für 5 min in PBS getaucht.

Die Färbung erfolgte mit DAB. Zur Verstärkung der Farbintensität wurden zu 5 ml 0,05 M Tris-HCl pH 7,6 einige Spritzer Kobaltchlorid gegeben und darin die DAB Tablette gelöst. Die fertige Färbelösung wurde durch einen Filter direkt auf den Schnitt getropft und bei RT für 10 min inkubiert. Daraufhin wurden die Präparate 3 mal für 1 min mit aqua dest. gespült.

Die Gegenfärbung mit Ethylgrün wurde wie folgt durchgeführt:

- Einstellen der Schnitte in Acetatpuffer 1:10 pH 4,0 bei RT für 10 min
- Färben der Schnitte in 1% Ethylgrün in Acetatpuffer 1:10 pH 4,0 bei RT für 10 min
- Spülen in aqua dest. je 3 mal für 1 min
- Dehydrieren der Schnitte in Butanol je 3 mal für 1 min
- Einstellen der Schnitte in Xylol je 3 mal für 1 min
- Eindecken der Schnitte mit Entellan

BSA/ Tris für die AK-Verdünnung:

0,1 M Tris pH 7,4 mit HCl eingestellt

0,9 % NaCl

2,5 % BSA (Sigma/ Deisenhofen/ Deutschland)

0,1 % Na-Azid

Die gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Für die semiquantitative Bewertung der Färbungsintensität und des prozentualen Anteils gefärbter Zellkerne wurde ein immunreaktiver Score verwendet:

Histoscore = Färbungsintensität x Anzahl der positiven Zellen in %.

Die Färbungsintensität wurde wie folgt definiert:

1	Schwach
2	Mittel-schwach
3	Mittel
4	Mittel-stark
5	Stark

Somit ergibt sich aus dem Produkt von Färbungsintensität und Anteil positiver Zellen für jede Untersuchung ein Histoscore von 0 bis 500. Von der Haar (2000) bestätigte den Vorteil dieses Scoring-Systems gegenüber den primär erhobenen Kategorien „Färbungsintensität“ und „Anteil der positiven Zellen“. Seine Untersuchungen zeigen, dass keine Redundanz zwischen der Färbungsintensität und dem Anteil positiver Zellen vorliegt. Die Ähnlichkeit des histochemischen Scores zu den beiden primär erhobenen Kategorien ist höher als die Ähnlichkeit beider untereinander, so dass der histochemische Score das höchste Korrelationsniveau besitzt.

Es wurden zwei Unterteilungen der Ergebnisse vorgenommen:

Histocore	Ergebnis
0 bis 179	Negativ
180 bis 500	Positiv

Diese Unterteilung greift auf eine Schwellenwertbestimmung durch Prof. Bojar, Institut für Onkologische Chemie der Universität Düsseldorf, zurück, die aus ca. 500 prospektiv analysierten Proben einen Score von 180 als diejenige Schwelle identifizierte, die Patientengruppen mit einer schlechten und guten Prognose am besten voneinander differenzieren kann. Von der Haar (2000) überprüfte diesen Schwellenwert hinsichtlich seiner Validität an einem 1399 Patientinnen umfassenden Kollektiv. Mittels Überlebenskurven nach Kaplan-Meier wurden unterschiedliche Schwellenwerte untersucht. Die Scorewerte 100, 180

und 300 erreichten als Schwellenwerte die höchste Signifikanz ($p < 0,0001$) bezüglich des Einflusses der p53-Überexpression auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Eine Definition des Schwellenwertes bei 300 ist aber aufgrund der geringen Gruppenstärke nicht sinnvoll.

Und

Histoscore	Ergebnis
0 bis 74	Gruppe 1
75 bis 179	Gruppe 2
180 bis 500	Gruppe 3

Diese Einteilung erfolgte, um das Patientenkollektiv mit einem Histoscore zwischen 75 und 179 abzugrenzen und gegebenenfalls Unterschiede auf die Prognose beschreiben zu können. Die Einführung einer zusätzlichen, mittleren Risikogruppe sollte einen geringeren Informationsverlust zur Folge haben, als die dichotome Trennung zwischen normaler und pathologischer p53-Expression.

2.4 LOH-Analyse

2.4.1 DNA-Gewinnung

Herstellung der Gewebeschnitte

Die Paraffinblöcke wurden vor dem Schneiden zwei Stunden in einem Gefrierfach vorgekühlt. Von dem in Paraffin eingebetteten Material wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 5 μm Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf einem 40°C warmen Wasserbad zum Glätten abgelegt und auf einen Objektträger gezogen. Zum Trocknen wurden die Objektträger in einen Brutschrank gebracht, in dem sie bei 37°C über Nacht verblieben. Es wurden jeweils eine HE-Färbung, zwei Eosin-Färbungen und ein immunhistochemischer Nachweis des p53-Proteins durchgeführt.

Färbung

Die HE-Färbung:

Xylol	2 mal	90 sec
100% EtOH	2 mal	90 sec
96% EtOH	2 mal	90 sec
70% EtOH	2 mal	90 sec
aqua dest.	2 mal	90 sec
Hämatoxylin	1 mal	60 sec
mit Leitungswasser 10 min spülen		
Eosin	1 mal	10 sec
70% EtOH	2 mal	90 sec
96% EtOH	2 mal	90 sec
100% EtOH	2 mal	90 sec
Eindecken mit Entellan		

Die für die DNA-Extraktion vorgesehenen Schnitte wurden mit Eosin wie folgt gefärbt:

Xylol	2 mal	90 sec
100% EtOH	2 mal	90 sec
96% EtOH	2 mal	90 sec
70% EtOH	2 mal	90 sec
aqua dest.	2 mal	90 sec
Eosin	1 mal	10 sec
70% EtOH	2 mal	90 sec
96% EtOH	2 mal	90 sec
100% EtOH	2 mal	90 sec

Zur Differenzierung zwischen dem Karzinom und dem umgebenden gesundem Gewebe wurden die HE-gefärbten Schnitte herangezogen. Die unterschiedlichen Areale wurden nach mikroskopischer Auswertung markiert.

Die Eosinfärbung wurde an Proben aus der gleichen Schnittserie durchgeführt. So konnte durch den Vergleich des markierten HE-Schnittes mit dem Eosin-gefärbten Schnitt eine Zuordnung der karzinomatösen und normalen Areale erfolgen.

Isolierung relevanter Areale

Die HE-Schnitte wurden nochmals mit den Eosin-gefärbten Schnitten unter dem Mikroskop verglichen. Dann wurde von einem Eosinschnitt das Normalgewebe abgetragen. Von dem zweiten Eosinschnitt aus der gleichen Serie wurde das Tumormaterial gewonnen. Das Abkratzen dieser Areale von den Objektträgern erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Als Hilfsmittel dienten Filtertips der Firma Greiner (Solingen/ Deutschland) und eine Saugpumpe. Ein Filtertip wurde an die Saugpumpe angeschlossen und das gewünschte Material unter Sog abgetragen. Anschließend wurde der vordere Teil des Filtertips in ein Eppendorfgefäß überführt.

Lyse des Materials

Die gewonnenen Proben wurden in 70 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 8) und 50 μ g/ml Proteinase K überführt. Die Inkubation erfolgte nach Mischen bei 55°C in einem Schüttelwasserbad über Nacht. Anschließend wurden die Proben 5 min zentrifugiert und die Proteinase K durch 10-minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert.

Diese Lösung wurde direkt für einen PCR-Ansatz verwendet oder bei -20°C gelagert.

Es wurden jeweils zwei Negativkontrollen ohne DNA mitgeführt.

2.4.2 PCR

Mit Hilfe der PCR wurden spezifische DNA-Fragmente amplifiziert.

Dazu wurden folgende Ansätze pipettiert:

0,125 μ l	Taq-Polymerase (4 units/ μ l)
2,5 μ l	10xPuffer
0,5 μ l	Primer sense (20 μ M)
0,5 μ l	Primer antisense (20 μ M)
0,5 μ l	dNTP (je 10 mM)
5 μ l	Q-Solution
1 bis 3 μ l	DNA
	ad 25 μ l aqua dest.

Alle verwendeten Reagenzien, außer den eingesetzten Primern, stammen aus dem Taq DNA Polymerase Kit der Firma Qiagen (Hilden/ Deutschland).

Folgende Zyklen wurden für beide Primerpaare zur Amplifizierung genutzt:

1 Zyklus	35 Zyklen	1 Zyklus
3 min 94°C	45 sec 94°C; 60 sec 58°C; 90 sec 72°C	60 min 72°C

Alle Reaktionen liefen in einem Thermocycler PCR-2400 und PCR-9600 der Firma Perkin-Elmer (Weiterstadt/ Deutschland).

Jede PCR Reaktion wurde durch eine bekannte Positivkontrolle und eine Leerprobe ergänzt. Für die Positivkontrolle wurden unterschiedliche Plattenepithel-Karzinom-Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren eingesetzt: UM-SCC 10A und 14A. Die DNA der Zelllinien wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bier, HNO-Klinik der Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien UM-SCC 10A und 14A wurden von TE Carey, Universität Michigan, Ann Arbor, USA etabliert. Die Leerprobe bestand aus dem jeweiligem PCR Ansatz ohne DNA.

2.4.3 Primer

Fragment	Lokus	Sequenz	Länge des Fragments
Alurep	Intron 1 von p53	HexGCCTGGGCAATAAGAGCTGA	112 bis 137 bp
		TGCACTGACAAAACATCCCC	
Mfd41	D17S261	FamCAGGTTCTGTCATAGGACTA	157 bis 171 bp
		TTCTGGACCTACTCCTGA	

Der Alurep Primer wurde mit dem Computerprogramm Primer05 (Daly et al., 1991) erstellt. Die Alu-Sequenz liegt im ersten Intron von p53 auf Position 8703 der EMBL accession no. X54156 (Chumakov et al., 1991). Der Mfd41 Primer wurde Weber et al. (1990) entnommen. Um die Anzahl der nicht informativen Fälle möglichst gering zu halten, wurden Primer für polymorphe Mikrosatelliten gewählt, die eine hohe Heterozygotenhäufigkeit in der Bevölkerung haben.

Mfd41: Heterozygotehäufigkeit = 0.44	
Allel (bp)	Häufigkeit
171	0.01
165	0.01
163	0.04
161	0.10
159	0.71
157	0.13

(Weber et al., 1990)

Alurep: Heterozygotehäufigkeit = 0.68	
Allel (bp)	Häufigkeit
140	0.02
130	0.04
125	0.22
120	0.46
115	0.20
105	0.06

(Futreal et al., 1991)

2.4.4 Semiautomatische DNA Fragmentlängenanalyse

Je 1 µl der PCR-Produkte wurden mit 10 µl Formamid und 0,5 µl des Längenstandards Genescan-500 Tamra (ABI/ Weiterstadt/ Deutschland) gemischt. Danach wurde dieser Ansatz für 3 min bei 94°C erhitzt und unverzüglich auf Eis gestellt.

Zur semiautomatischen Fragmentlängenanalyse wurde ein 310 Genetic Analyser (ABI/ Weiterstadt/ Deutschland) und die Genescan Analysis Software 2.1 genutzt. Die Elektrophorese wurde für 24 min bei 60°C durchgeführt. Als Polymer wurde POP 4 (ABI/ Weiterstadt/ Deutschland) verwendet und das Modul GS STR POP 4 eingestellt.

Als LOH wurde ein Peakverlust im Tumorgewebe von $\geq 60\%$ des Ausgangswertes im Normalgewebe definiert (Niederacher et al., 1997).

2.5 Statistische Methoden

Die rezidivfreien und absoluten Überlebenszeiten wurden nach der Kaplan-Meier-Methode geschätzt. Das Coxsche Regressionsmodell wurde für die uni- und multivariaten Analysen des Einflusses der prognostischen Standardfaktoren auf die rezidivfreie und Gesamtüberlebenszeit verwendet. Das relative Risiko wurde mit dem 95%-Konfidenzintervall geschätzt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

Die statistische Analyse wurde von Frau Dr. C. Schmoor am Institut für Medizinische Biometrie und Informatik der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg (Direktor des Instituts: Prof. Dr. M. Schumacher) durchgeführt. Die selbst erhobenen Untersuchungsergebnisse wurden dem Institut zugeleitet und dort der Zusammenhang mit den Standardprognosefaktoren und den Zielkriterien analysiert.

3 Ergebnisse

Von den 223 Paraffinblöcken, die dem Institut für Onkologischen Chemie zum Zeitpunkt der Untersuchung vorlagen, konnten 192 Proben untersucht werden. Zum größten Teil lag diese Einschränkung an der Tatsache, dass nicht mehr genügend Gewebe in den Paraffinblöcken vorhanden war, da die Proben vorher für andere Untersuchungen verwendet worden waren. Die 192 verwendeten Proben führten zu 174 Ergebnissen (90%) für die immunhistochemische Untersuchung. Die untersuchten Proben stammten aus 25 verschiedenen Kliniken. Nicht verwertbare Untersuchungsergebnisse häuften sich bei Proben aus bestimmten Kliniken. So ergab die immunhistochemische Untersuchung einer Klinik z.B. sieben unsichere Ergebnisse aus 23 Proben (31%). Die 23 Proben einer anderen Klinik waren im Gegensatz dazu zu 100% aussagekräftig.

Für die LOH-Untersuchung konnten nur 79 Ergebnisse erhoben werden. Dies lag zum einem daran, dass neben dem Tumorgewebe zusätzlich ausreichend Normalgewebe zur Verfügung stehen musste; zum anderen musste sich das Normalgewebe gut isolieren lassen, um eine Kontamination mit Tumorzellen zu verhindern. 92 Proben erfüllten diese Voraussetzungen. Bei den restlichen 100 Proben war zum größten Teil kein Normalgewebe isolierbar oder die Zellmenge war zu gering. Weitere 13 Proben lieferten kein reproduzierbares oder eindeutiges Ergebnis in der LOH-Analyse. Auch hier ergaben sich Unterschiede bezüglich der Klinikherkunft der Proben. Bei einer Klinik waren z.B. nur 50% der LOH-Untersuchung aussagekräftig, während Proben aus anderen Kliniken eine deutlich höhere Ausbeute an verwertbaren Ergebnissen lieferten.

Die jüngste Patientin war 27 Jahre, die älteste Patientin 79 Jahre alt. Im Mittel lag das Alter der untersuchten Patientinnen bei 55 Jahren. Die mediane Nachbeobachtung bezüglich des rezidivfreien Überlebens betrug neun Jahre; die mediane Nachbeobachtung bezüglich des Gesamtüberlebens betrug zehn Jahre. In dem Kollektiv von 174 Patientinnen wurden 108 Ereignisse bezüglich des rezidivfreien Überlebens und 97 Ereignisse bezüglich des Gesamtüberlebens registriert.

3.1 Immunhistochemische Untersuchungsergebnisse

174 Patienten wurden immunhistochemisch bezüglich ihres p53-Status untersucht. p53 negativ entspricht einem Histoscore von 0 bis 179, während ein Histoscore von 180 bis 500 als p53 positiv definiert wurde. 32 (18%) der analysierten Gewebeproben waren p53 positiv.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen beispielhaft lichtmikroskopische Bilder p53 positiver Präparate. Tabelle 1 beschreibt das Patientinnenkollektiv.

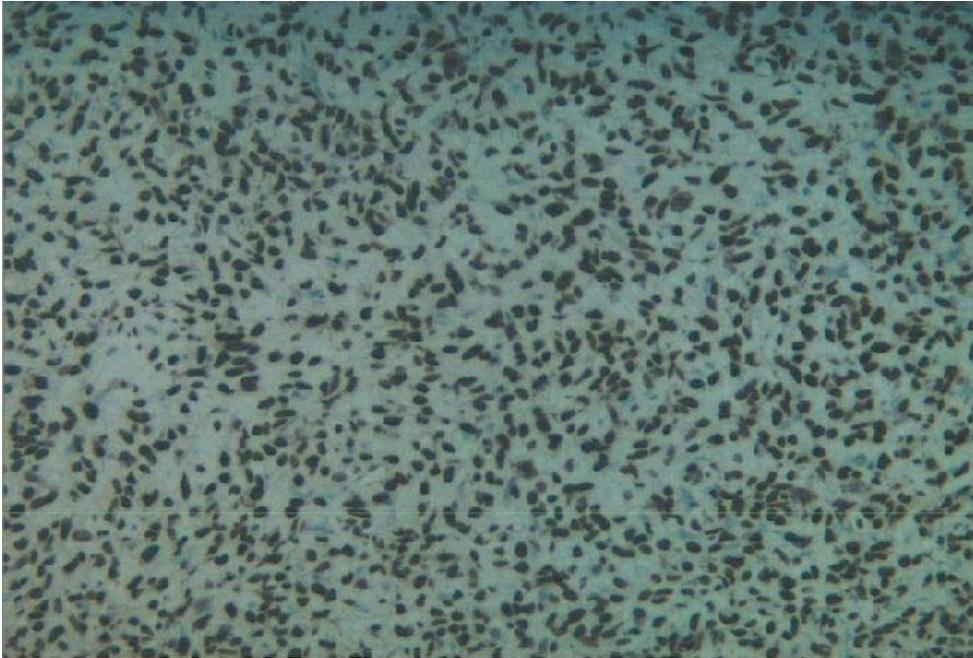


Abbildung 1: Immunhistochemischer Nachweis einer p53 Überexpression mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 in einem Mammakarzinom (20-fache Vergrößerung).

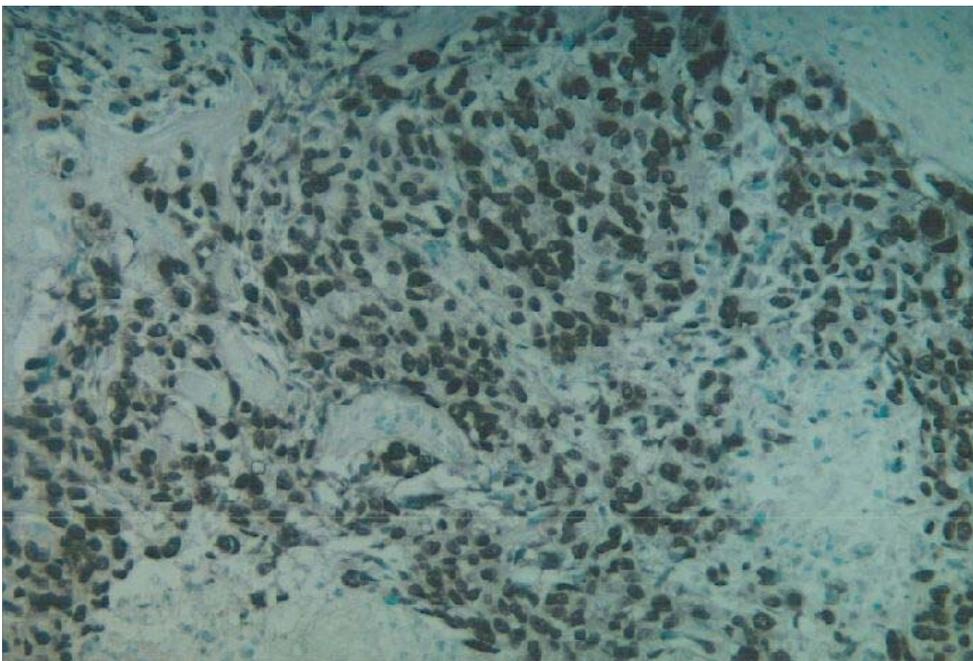


Abbildung 2: Immunhistochemischer Nachweis einer p53 Überexpression mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 in einem Mammakarzinom (20-fache Vergrößerung).

Tabelle 1: Beschreibung des Patientinnenkollektivs und des Verhältnisses zwischen Immunhistochemie für p53 und den prognostischen Standardfaktoren bzw. c-erbB-2.

Faktor		p53 negativ (n=142)	p53 positiv (n=32)	Total (n=174)
Studie	2	69 (49%)	12 (38%)	81 (47%)
	3	73 (51%)	20 (63%)	93 (53%)
Therapieschema	3xCMF	21 (15%)	2 (6%)	23 (13%)
	6xCMF	65 (46%)	14 (44%)	79 (45%)
	3xCMF+TAM	14 (10%)	4 (13%)	18 (10%)
	6xCMF+TAM	12 (8%)	4 (13%)	16 (9%)
	6xCMF+RAD	30 (21%)	8 (25%)	38 (22%)
Alter (Jahre)	≤ 40	9 (6%)	3 (9%)	12 (7%)
	41-60	80 (56%)	18 (56%)	98 (56%)
	> 60	53 (37%)	11 (34%)	64 (37%)
Anzahl der positiven Lymphknoten	1-3	87 (62%)	10 (31%)	97 (56%)
	4-9	38 (27%)	15 (47%)	53 (31%)
	> 9	15 (11%)	7 (22%)	22 (13%)
	unbekannt	2	0	2
Menopause	prä	46 (32%)	9 (28%)	55 (32%)
	post	96 (68%)	23 (72%)	119 (68%)
Tumorgröße (mm)	≤ 20	48 (34%)	5 (16%)	53 (30%)
	21-30	58 (41%)	15 (47%)	73 (42%)
	>30	36 (25%)	12 (38%)	48 (28%)
Histologischer Grade	I	14 (10%)	1 (3%)	15 (9%)
	II	107 (75%)	13 (41%)	120 (69%)
	III	21 (15%)	18 (56%)	39 (22%)
Östrogenrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	96 (70%)	9 (28%)	105 (62%)
	< 20	42 (30%)	23 (72%)	65 (38%)
	unbekannt	4	0	4
Progesteronrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	89 (65%)	5 (16%)	94 (56%)
	< 20	48 (35%)	27 (84%)	75 (44%)
	unbekannt	5	0	5
c-erbB-2	Keine Überexpr.	108 (79%)	21 (68%)	129 (77%)
	Überexpr.	29 (21%)	10 (32%)	39 (23%)
	unbekannt	5	1	6

TAM = Tamoxifen, RAD = Radiotherapie, Überexpr. = Überexpression, CMF = Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil

Die meisten Patientinnen (45%) erhielten sechs Zyklen CMF. Während das Alter der Patientinnen keine Auswirkungen auf das immunhistochemische Untersuchungsergebnis zeigt, weisen p53 positive Tumoren häufiger eine höhere Anzahl befallener Lymphknoten auf als p53 negative Tumoren. p53 positive Tumoren gehen weiterhin häufiger mit einem größerem Tumor und einem höherem Grade einher. Besonders deutliche Unterschiede bestehen bezüglich der Verteilung des Hormonrezeptorstatus. 70% der p53 negativen Tumoren haben eine Östrogenrezeptorkonzentration größer gleich 20 fmol/mg. Hingegen haben 72% der p53 positiven Tumoren eine Östrogenrezeptorkonzentration unter 20 fmol/mg. Auch für die Progesteronrezeptorkonzentration erkennt man eine Verschiebung zu niedrigen Konzentrationen unter 20 fmol/mg für p53 positive Tumoren.

Mit Hilfe der Cox-Regressionsanalyse wurden für die Standardfaktoren (Alter, Menopause, Anzahl der positiven Lymphknoten, Tumorgröße, histologischer Grade, Östrogen- und Progesteronrezeptor) und für den immunhistochemischen p53-Status die relativen Risiken bezüglich der absoluten und rezidivfreien Überlebenszeit untersucht (siehe Tabelle 2-5). Hinsichtlich der Fragestellung wurden in der univariaten Analyse die Standardfaktoren und der immunhistochemische p53-Status getrennt dargestellt. In der multivariaten Analyse wurden die Faktoren unter der Voraussetzung geprüft, dass gleichzeitig alle anderen Faktoren mit berücksichtigt werden.

Tabelle 2: Univariate Analyse der Effekte prognostischer Faktoren auf die Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit im p53-Kollektiv.

Faktor		Anzahl der Patientinnen	Gesamtüberlebenszeit			Rezidivfreie Überlebenszeit		
			RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert	RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Alter	≤ 40	174	1.00		0.2585	1.00		0.5134
	41-60		0.55	[0.3,1.2]		0.71	[0.3,1.6]	
	> 60		0.67	[0.3,1.4]		0.86	[0.4,1.9]	
Menopause	prä	174	1.00		0.4808	1.00		0.3088
	post		1.71	[0.8,1.8]		1.25	[0.8,1.9]	
Anzahl der positiven Lymphknoten	1-3	172	1.00		0.0001	1.00		0.0001
	4-9		1.78	[1.1,2.8]		1.86	[1.2,2.8]	
	> 9		4.18	[2.4,7.2]		3.02	[1.8,5.2]	
Tumorgröße (mm)	≤ 20	174	1.00		0.0003	1.00		0.0009
	21-30		0.87	[0.5,1.4]		0.90	[0.6,1.4]	
	> 30		2.17	[1.3,3.6]		2.03	[1.3,3.3]	
Histologischer Grade	I	174	1.00		0.0118	1.00		0.1171
	II		3.87	[1.2,12.3]		2.49	[1.0,6.2]	
	III		5.66	[1.7,18.7]		2.71	[1.0,7.0]	
Östrogenrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	170	1.00		0.0031	1.00		0.0660
	< 20		1.85	[1.2,2.8]		1.44	[1.0,2.1]	
Progesteronrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	169	1.00		0.0002	1.00		0.0083
	< 20		2.19	[1.5,3.3]		1.69	[1.1,2.5]	

RR = geschätztes relatives Risiko

In der univariaten Analyse (Tabelle 2) ergaben sich erhöhte Risiken für folgende Standardfaktoren: Anzahl der positiven Lymphknoten, Tumorgröße, histologischer Grade, Östrogen- und Progesteronrezeptor. Patienten mit mehr als 9 positiven Lymphknoten hatten ein 4-fach erhöhtes Risiko zu versterben als Patienten mit 1 bis 3 positiven Lymphknoten. Auch eine Tumorgröße über 30 mm geht mit einem 2-fach erhöhtem Sterberisiko einher. Ein fast 6-fach höheres Risiko hatten Patienten mit einem histologischem Grade von III und auch bei einem Grade von II war das Risiko noch fast 4-fach erhöht. Für Patienten mit einer

Östrogenrezeptorkonzentration unter 20 fmol/mg war das Risiko zu sterben fast doppelt so hoch wie für Patienten mit einer Östrogenrezeptorkonzentration über 20 fmol/mg. Über 2-fach war das Risiko zu versterben erhöht, wenn die Progesteronrezeptorkonzentration unter 20 fmol/mg lag. Außer für den Östrogenrezeptor ergaben sich für diese Standardfaktoren auch bezüglich des rezidivfreien Überlebens signifikant erhöhte Risiken. Die relativen Risiken für das rezidivfreie Überleben waren für die einzelnen Faktoren niedriger als für das Gesamtüberleben. Keine signifikant erhöhten Risiken ergaben sich für die Standardfaktoren Alter und Menopause.

Tabelle 3: Univariate Analyse des Effekts p53 Immunhistochemie auf die Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit.

Faktor		Anzahl der Patientinnen	Gesamtüberlebenszeit			Rezidivfreie Überlebenszeit		
			RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert	RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert
p53	negativ	174	1.00	[1.0,2.6]	0.0487	1.00	[0.8,2.0]	0.3276
	positiv		1.61			1.27		

RR = geschätztes relatives Risiko

Tabelle 3 zeigt, dass das relative Risiko zu sterben bei p53 positiven Tumoren 1,6-fach höher ist, als wenn keine p53-Akkumulation nachweisbar ist. Für das rezidivfreie Überleben ergibt sich kein signifikant erhöhtes Risiko.

Tabelle 4: Multivariate Analyse der Effekte prognostischer Faktoren auf die Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit im p53-Kollektiv (Anzahl der Patientinnen mit vollständigen Daten: 166, Anzahl der Ereignisse bzgl. des Gesamtüberlebens: 92 Todesfälle, Anzahl der Ereignisse bzgl. des rezidivfreien Überlebens: 101 Rezidive/Todesfälle).

Faktor		Gesamtüberlebenszeit			Rezidivfreie Überlebenszeit		
		RR	95% Konfidenz- intervall	p-Wert	RR	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Alter	≤ 40	1.00		0.0098	1.00		0.0617
	41-60	0.35	[0.1,0.8]		0.54	[0.2,1.3]	
	> 60	0.63	[0.3,1.5]		0.88	[0.4,2.2]	
Anzahl der positiven Lymphknoten	1-3	1.00		0.0035	1.00		0.0381
	4-9	1.21	[0.7,2.0]		1.46	[0.9,2.3]	
	> 9	2.76	[1.5,5.0]		2.12	[1.2,3.9]	
Tumorgroße (mm)	≤ 20	1.00		0.0016	1.00		0.0036
	21-30	0.84	[0.5,1.5]		0.97	[0.6,1.6]	
	> 30	2.20	[1.2,4.0]		2.24	[1.3,4.0]	
Histologischer Grade	I	1.00		0.1404	1.00		0.2545
	II	2.85	[0.9,9.2]		2.34	[0.8,6.5]	
	III	3.46	[1.0,11.8]		2.06	[0.7,6.1]	
Östrogenrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	1.00		0.7484	1.00		0.9034
	< 20	1.09	[0.6,1.8]		1.03	[0.6,1.7]	
Progesteronrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	1.00		0.0118	1.00		0.0779
	< 20	1.95	[1.2,3.3]		1.53	[1.0,2.4]	

RR = geschätztes relatives Risiko

In der multivariaten Analyse (Tabelle 4) finden sich erhöhte relative Risiken für folgende Standardfaktoren: Alter, Anzahl der positiven Lymphknoten, Tumorgroße und Progesteronrezeptor.

Tabelle 5: Multivariate Analyse der Effekte prognostischer Standardfaktoren und p53 auf die Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit (Anzahl der Patientinnen mit vollständigen Daten: 167, Anzahl der Ereignisse bzgl. des Gesamtüberlebens: 93 Todesfälle, Anzahl der Ereignisse bzgl. des rezidivfreien Überlebens: 102 Rezidive/Todesfälle).

Faktor		Gesamtüberlebenszeit			Rezidivfreie Überlebenszeit		
		RR	95% Konfidenz- intervall	p-Wert	RR	95% Konfidenz- intervall	p-Wert
Alter	≤ 40	1.00		0.0265	1.00		0.0677
	41-60	0.38	[0.2,0.9]		0.50	[0.2,1.2]	
	> 60	0.63	[0.3,1.5]		0.80	[0.3,2.0]	
Anzahl der positiven Lymphknoten	1-3	1.00		0.0041	1.00		0.0154
	4-9	1.29	[0.8,2.1]		1.62	[1.0,2.6]	
	> 9	2.89	[1.5,5.4]		2.35	[1.3,4.4]	
Tumorgröße (mm)	≤ 20	1.00		0.0022	1.00		0.0034
	21-30	0.85	[0.5,1.5]		0.90	[0.5,1.5]	
	> 30	2.12	[1.2,3.7]		2.16	[1.2,3.8]	
Progesteronrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	1.00		0.0029	1.00		0.0682
	< 20	2.22	[1.3,3.7]		1.58	[1.0,2.6]	
p53	negativ	1.00		0.9376	1.00		0.6714
	positiv	0.98	[0.5,1.8]		0.88	[0.5,1.6]	

RR = geschätztes relatives Risiko

Während sich bei der univariaten Analyse ein signifikant erhöhtes relatives Risiko für p53 positive Tumoren ergibt, verschwindet diese Bedeutung des p53-Status in der multivariaten Analyse.

Die Kaplan-Meier-Methode wurde mit den Zielparametern Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit durchgeführt. Die statistische Analyse der Faktoren Alter und Menopausenstatus ergibt keine signifikanten Zusammenhänge. Dagegen zeigen die Faktoren Anzahl der positiven Lymphknoten, Tumorgröße, Progesteronrezeptorkonzentration und c-erbB-2 Expression signifikante Zusammenhänge für absolutes und rezidivfreies Überleben. Für das Gesamtüberleben ergeben sich signifikante Zusammenhänge für folgende Faktoren: histologischer Grade, Östrogenrezeptorkonzentration und p53 Status. Die graphischen Darstellungen zeigen die Abbildungen 3 bis 11.

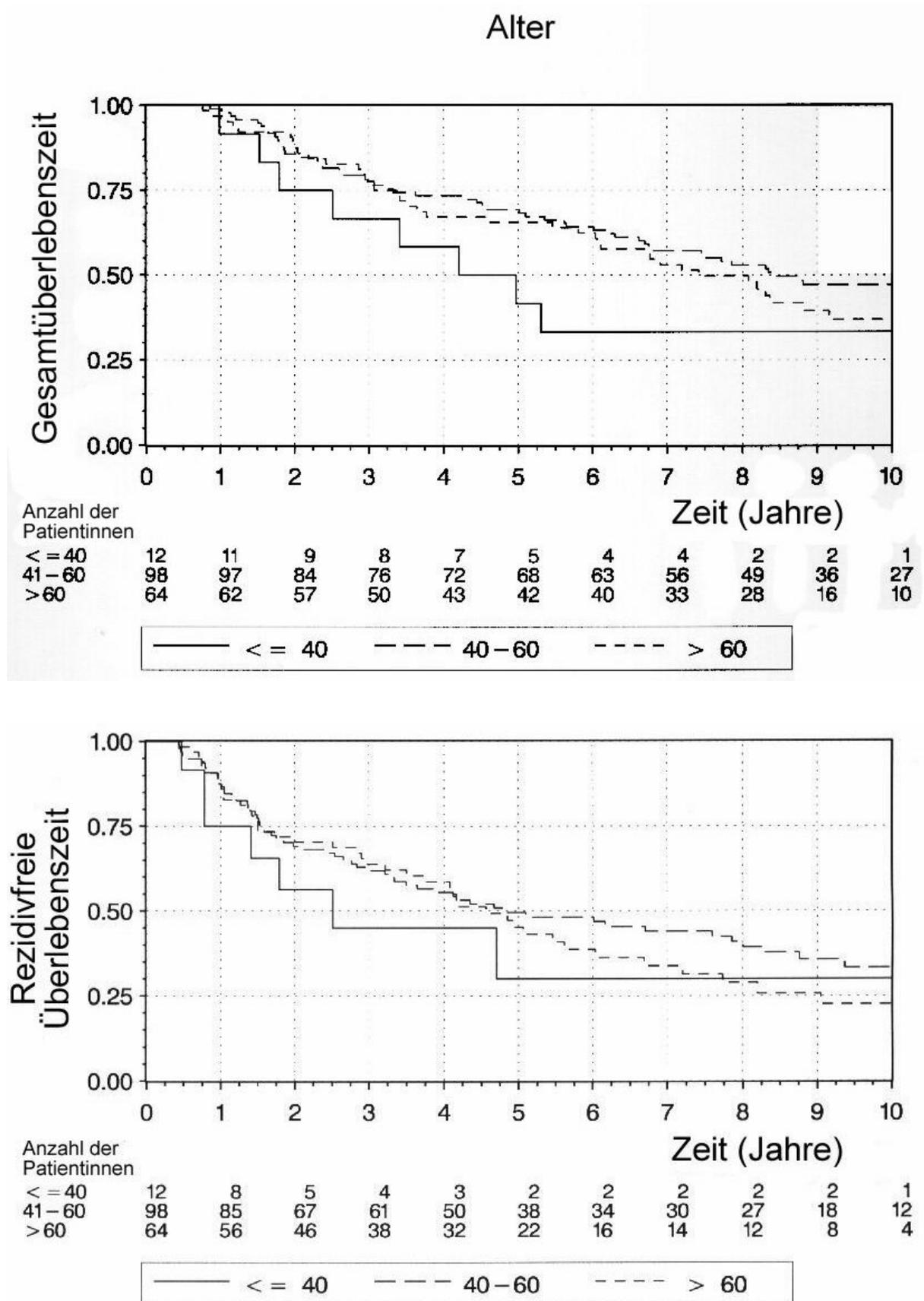


Abbildung 3: Auswirkung des Alters auf die Gesamtüberlebenszeit und die rezidivfreie Überlebenszeit.

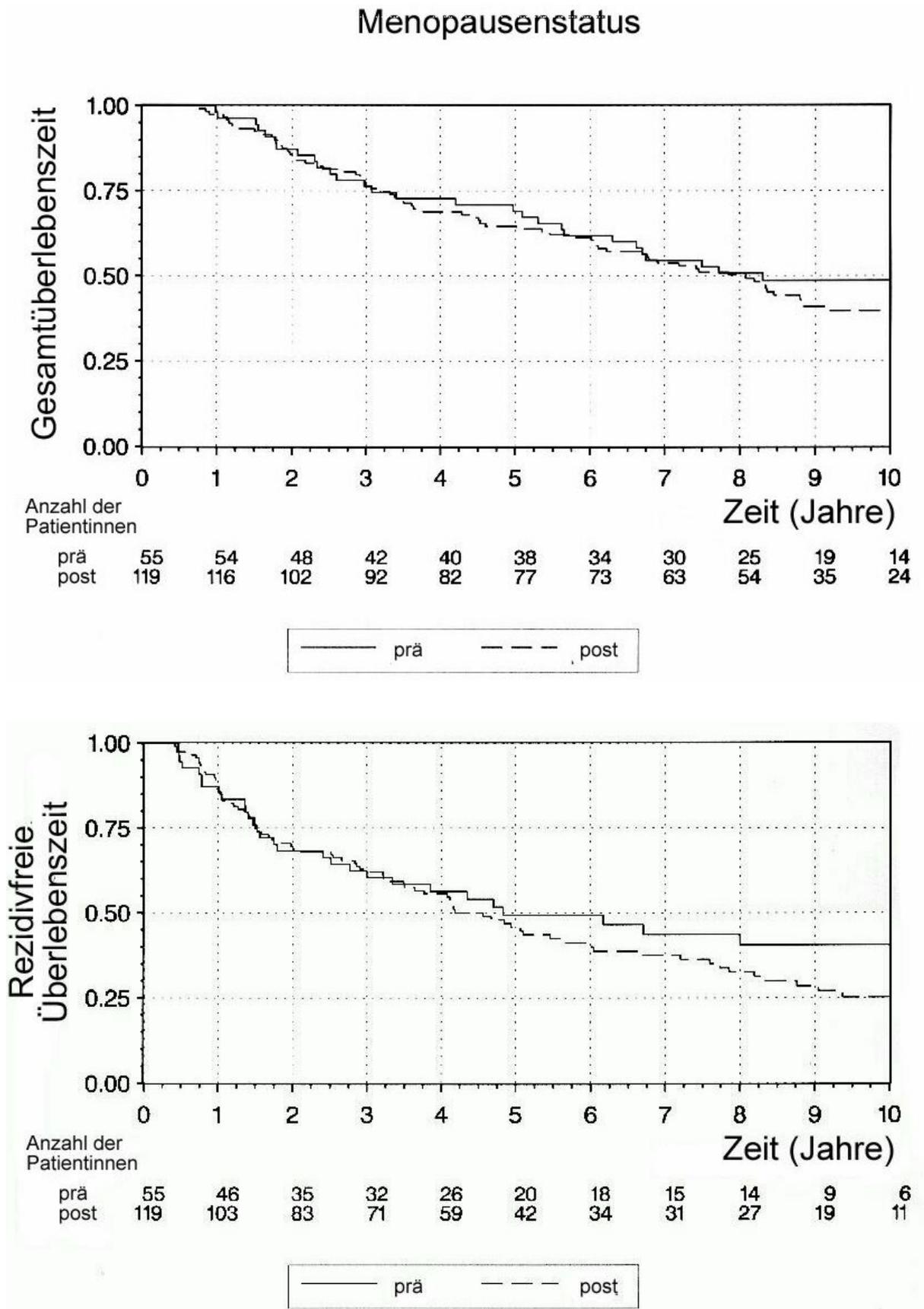


Abbildung 4: Gesamtüberlebenszeiten und rezidivfreie Überlebenszeiten für Patientinnen prä- und postmenopausal.

Anzahl der positiven Lymphknoten

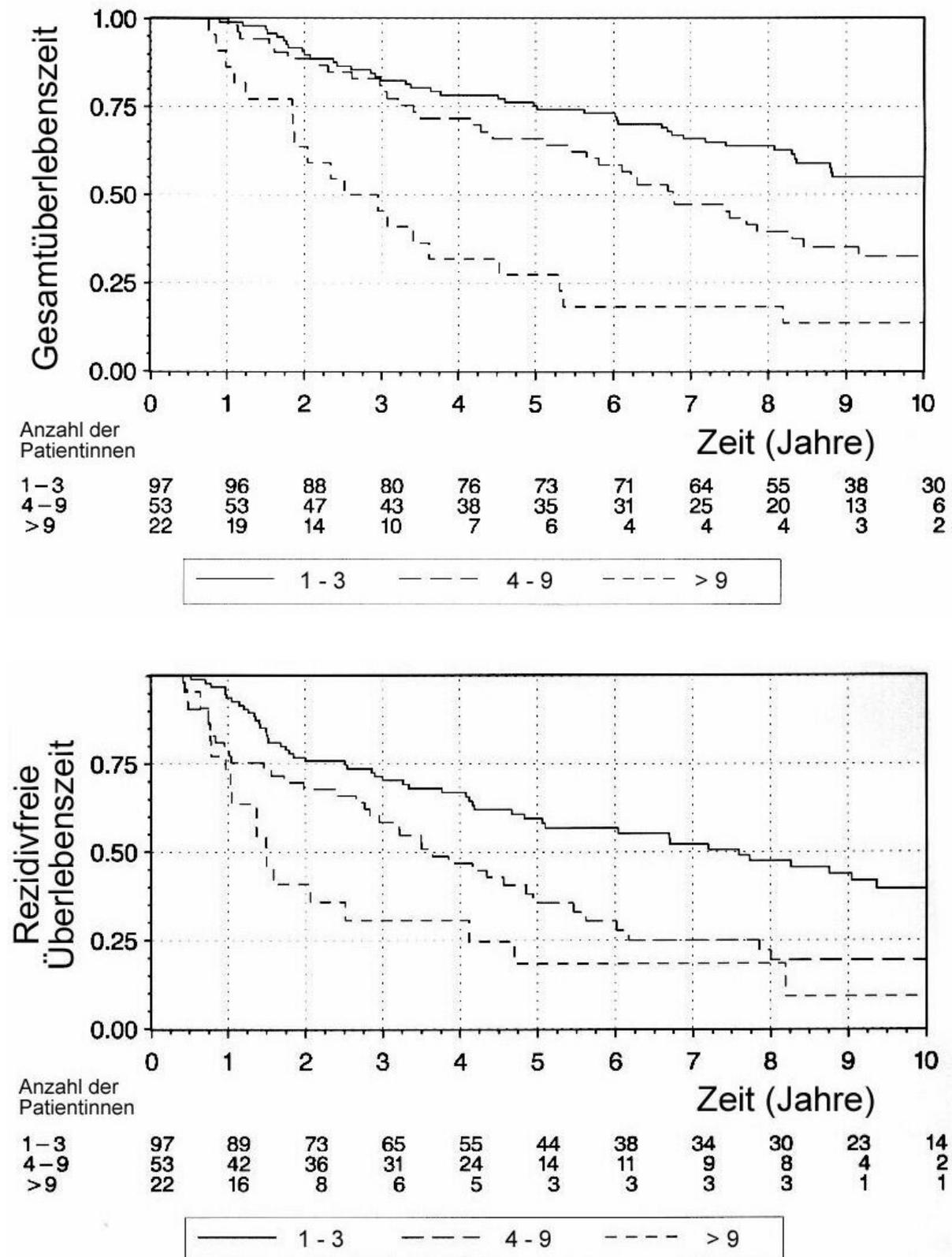


Abbildung 5: Auswirkung der Anzahl positiver Lymphknoten auf die Gesamtüberlebenszeit und die rezidivfreie Überlebenszeit.

Tumorgröße

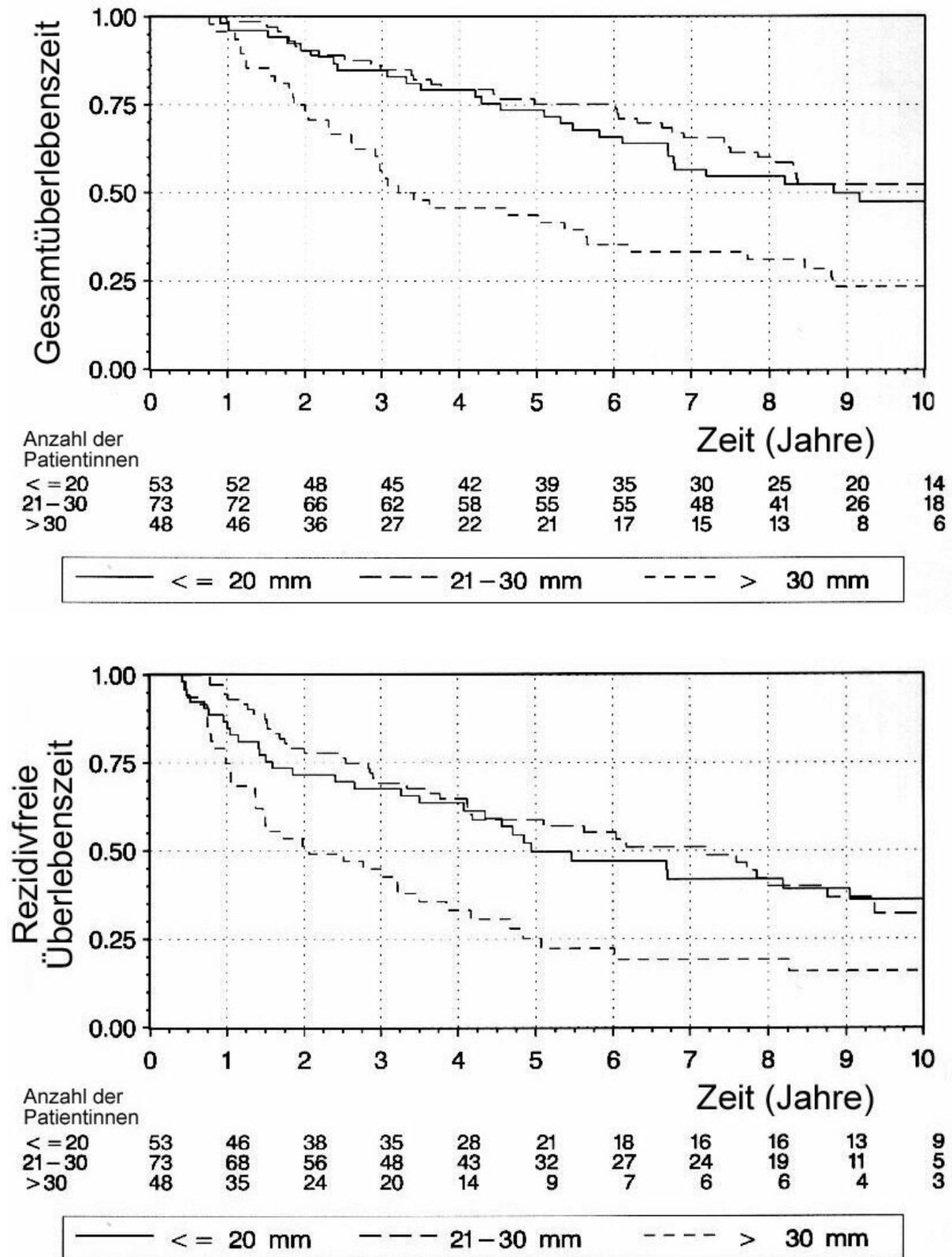


Abbildung 6: Gesamtüberlebenszeiten und rezidivfreie Überlebenszeiten für Patientinnen mit unterschiedlichen Tumorgößen.

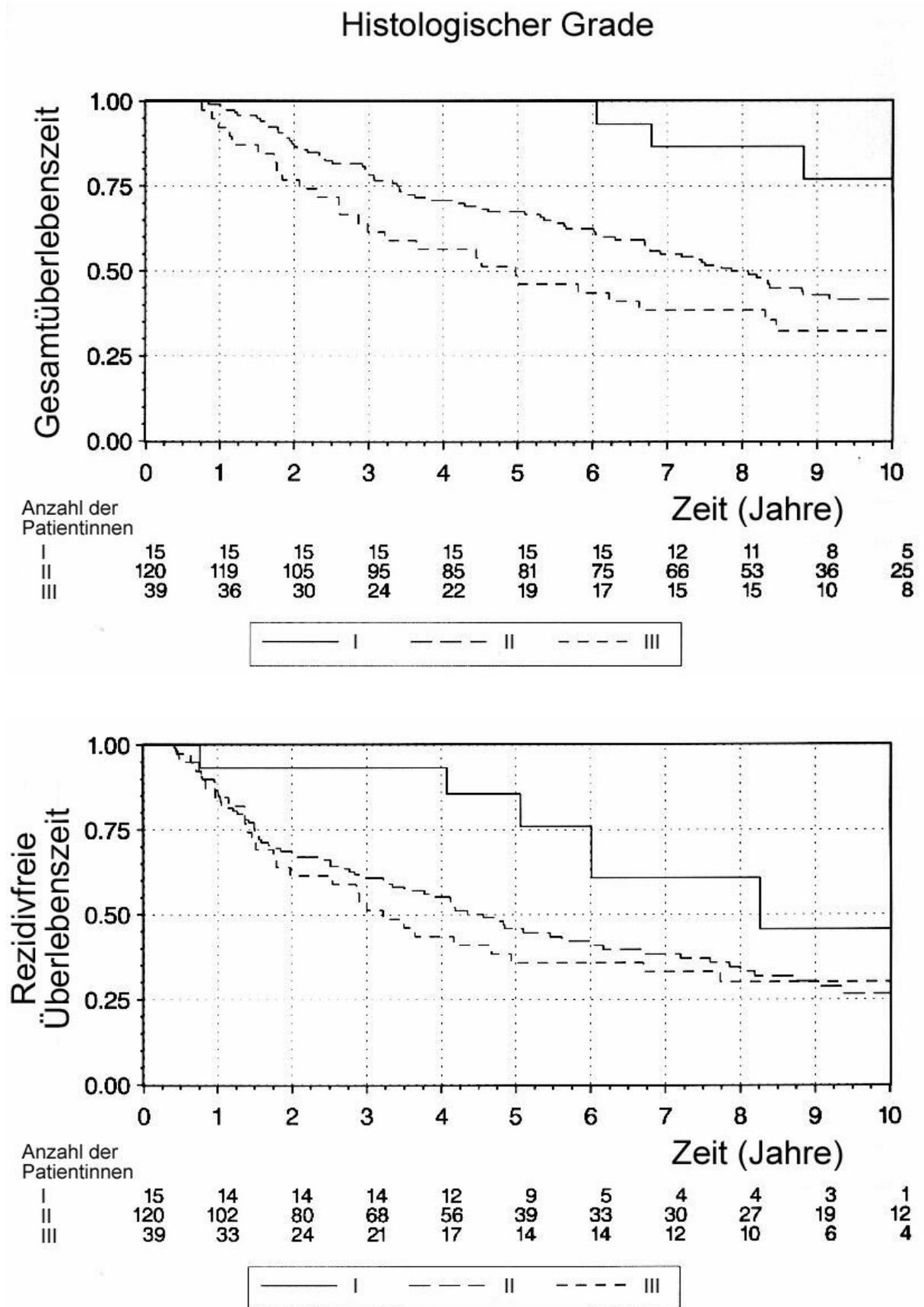


Abbildung 7: Auswirkung des histologischen Grades auf die Gesamtüberlebenszeit und die rezidivfreie Überlebenszeit.

Östrogenrezeptor

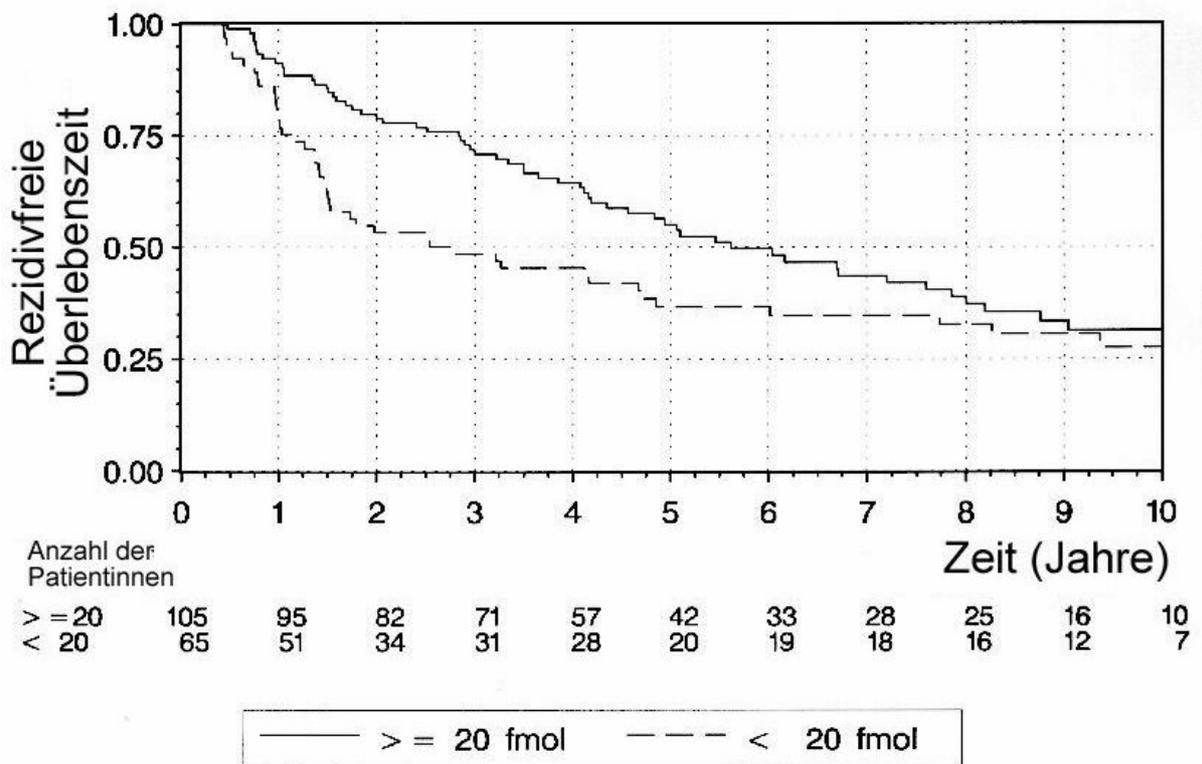
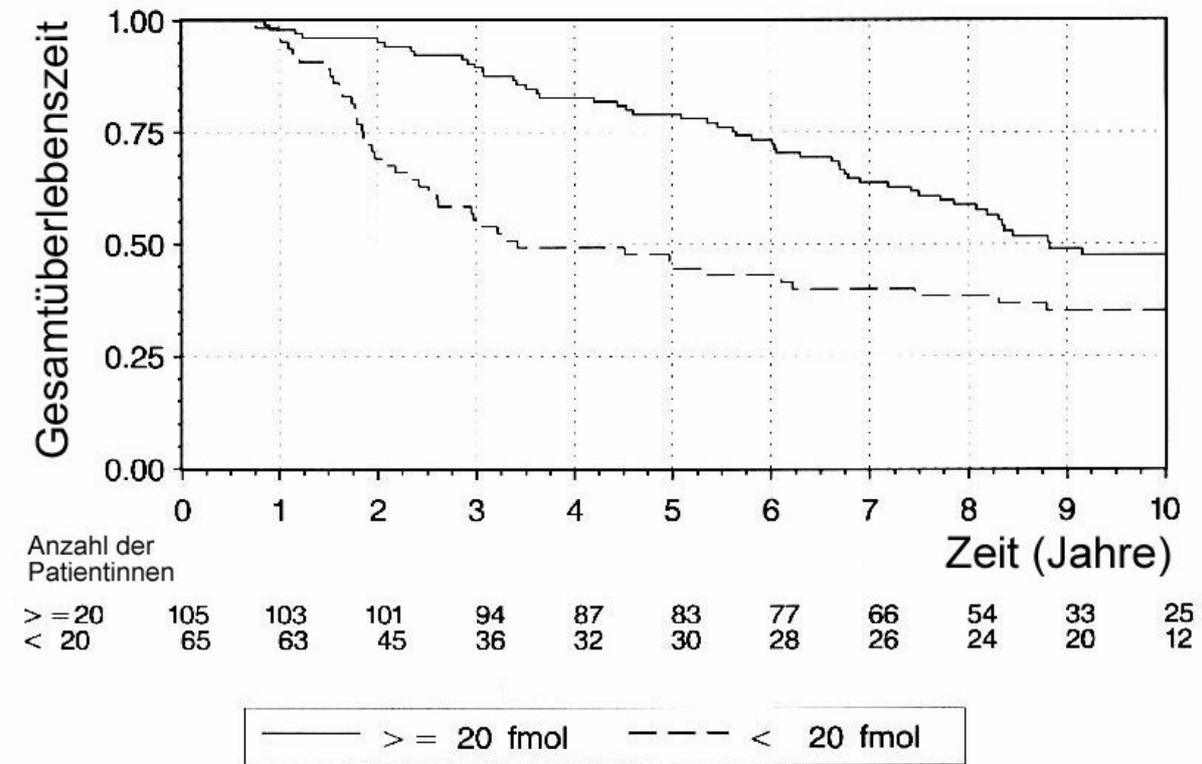


Abbildung 8: Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit für Patientinnen mit Östrogenrezeptorkonzentration ≥ 20 fmol/mg versus < 20 fmol/mg.

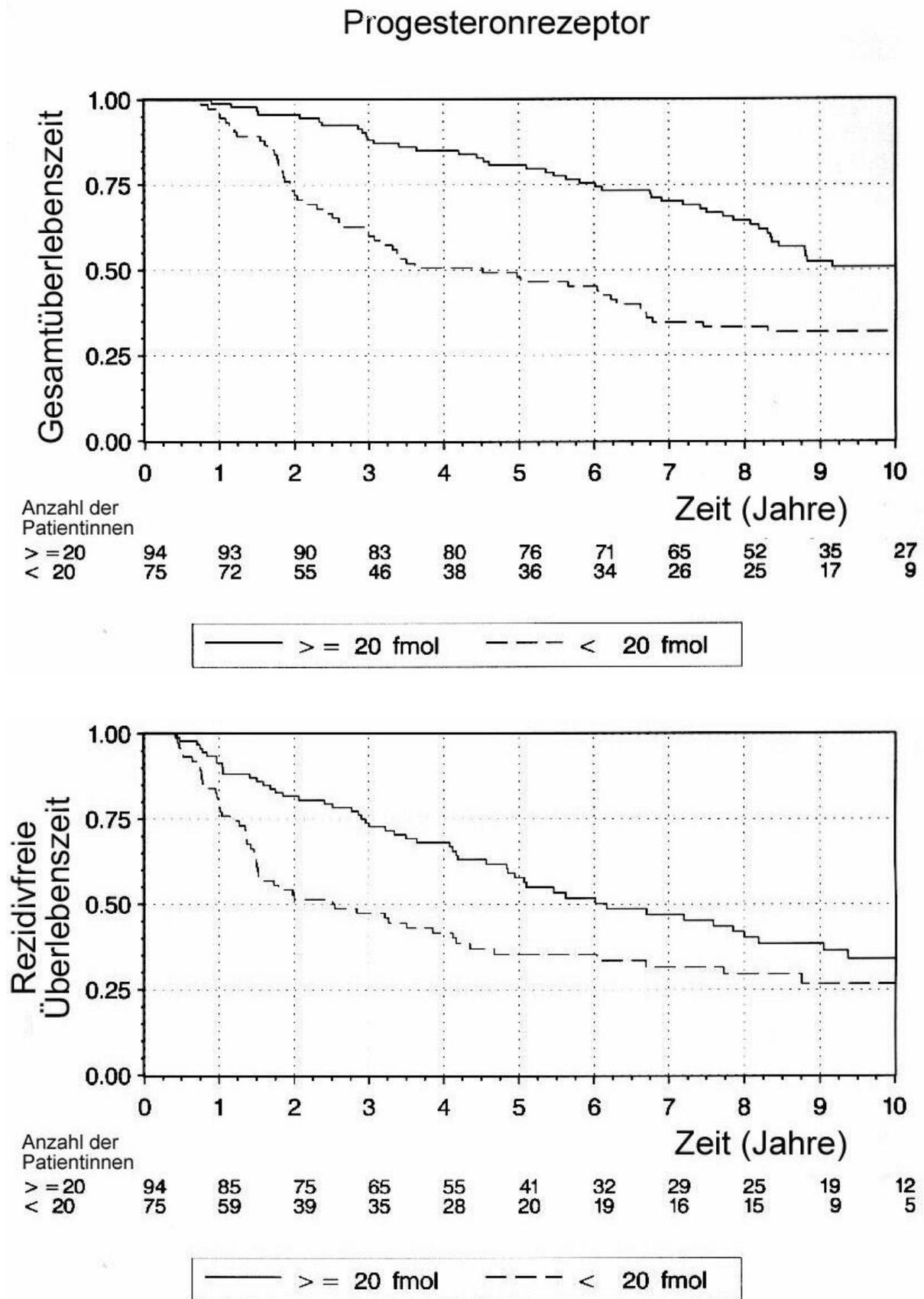


Abbildung 9: Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit für Patientinnen mit Progesteronrezeptorkonzentration ≥ 20 fmol/mg versus < 20 fmol/mg.

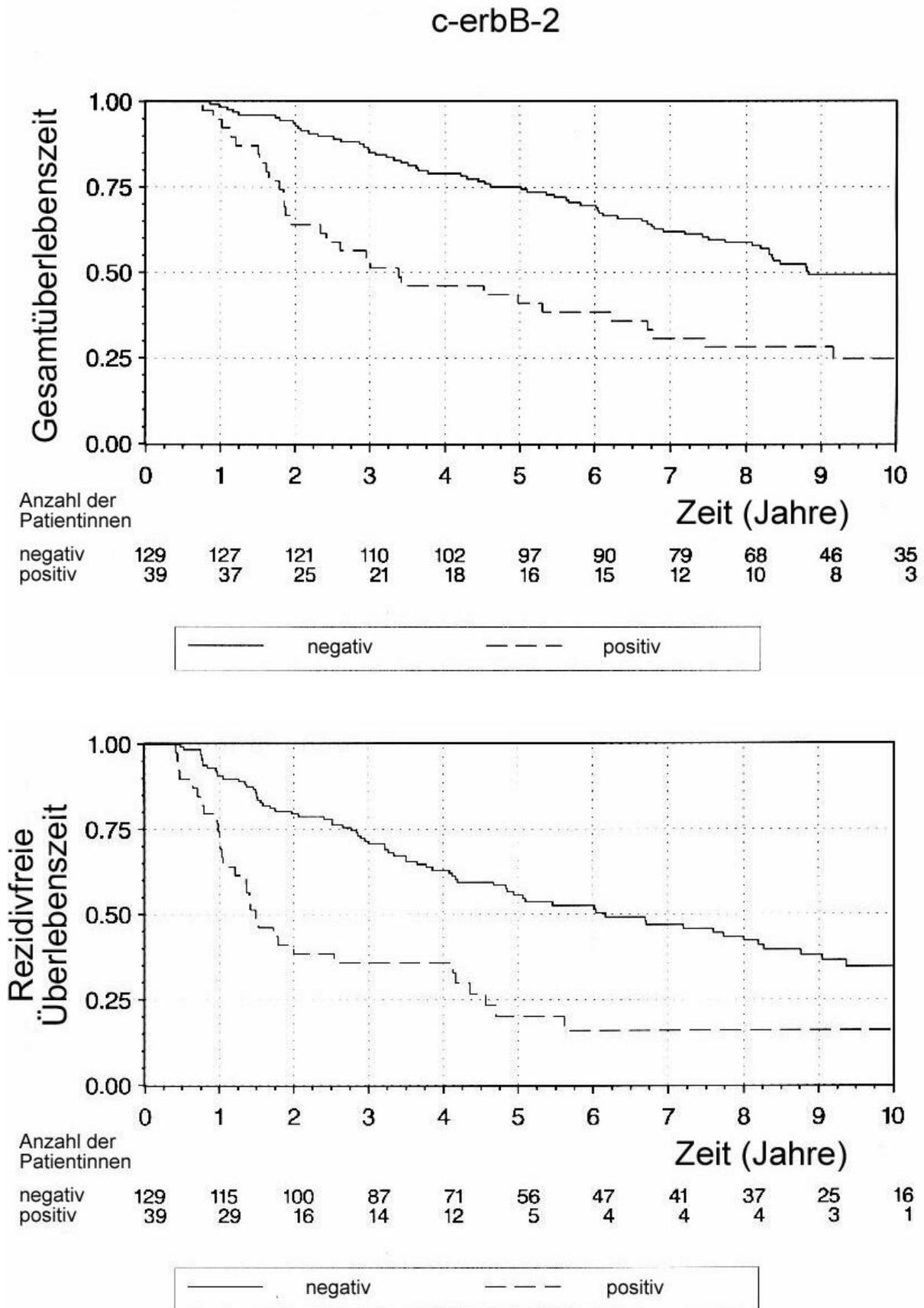


Abbildung 10: Auswirkung der c-erbB-2 Expression auf die Gesamtüberlebenszeit und die rezidivfreie Überlebenszeit.

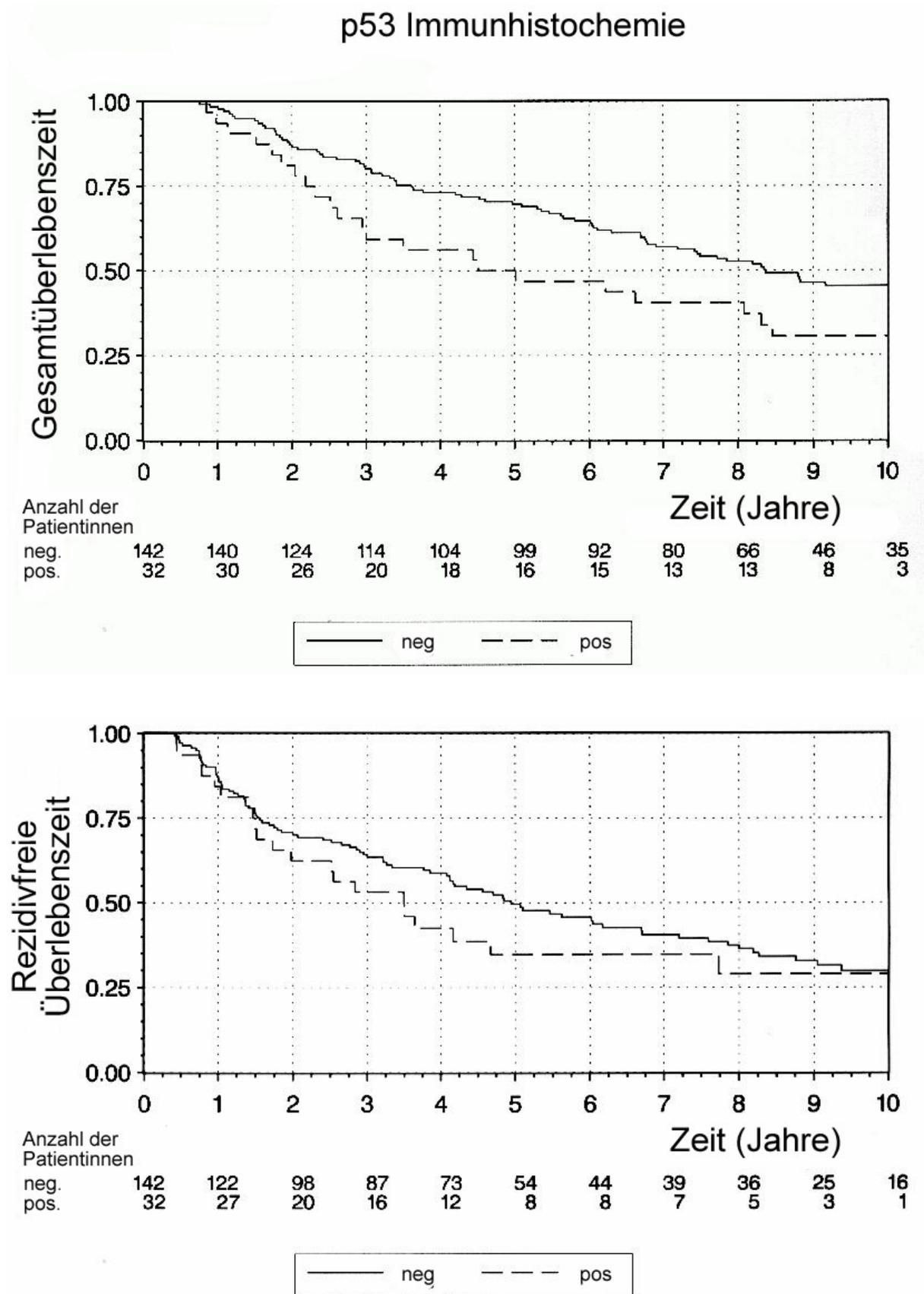


Abbildung 11: Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit für Patienten mit positivem versus negativem immunhistochemischen p53 Nachweis.

Um die Patientengruppe mit einem Histoscore zwischen 75 und 179 differenzieren zu können, wurden die Untersuchungsergebnisse in die Gruppen 1 bis 3 aufgeteilt. Gruppe 1 entspricht einem Histoscore bis 75, Gruppe 2 von 76 bis 179 und Gruppe 3 von 180 bis 500. Somit sind Gruppe 1 und 2 identisch mit der Einteilung p53 negativ und Gruppe 3 entspricht der Einteilung p53 positiv. 128 (74%) der analysierten Gewebeproben fielen in Gruppe 1, 14 (8%) in Gruppe 2 und 32 (18%) in Gruppe 3. Tabelle 6 beschreibt das Patientinnenkollektiv.

Tabelle 6: Beschreibung des Patientinnenkollektivs und des Verhältnisses zwischen Immunhistochemie für p53 und den prognostischen Standardfaktoren bzw. c-erbB-2. Gruppe 1: Histoscore bis 75, Gruppe 2: Histoscore 76 bis 179, Gruppe 3: Histoscore 180 bis 500.

Faktor		p53 Gruppe 1 (n=128)	p53 Gruppe 2 (n=14)	p53 Gruppe 3 (n=32)	Total (n=174)
Studie	2	65 (51%)	4 (29%)	12 (38%)	81 (47%)
	3	63 (49%)	10 (71%)	20 (63%)	93 (53%)
Therapieschema	3xCMF	19 (15%)	2 (14%)	2 (6%)	23 (13%)
	6xCMF	61 (48%)	4 (29%)	14 (44%)	79 (45%)
	3xCMF+TAM	12 (9%)	2 (14%)	4 (13%)	18 (10%)
	6xCMF+TAM	12 (9%)	0	4 (13%)	16 (9%)
	6xCMF+RAD	24 (19%)	6 (43%)	8 (25%)	38 (22%)
Alter (Jahre)	≤ 40	8 (6%)	1 (7%)	3 (9%)	12 (7%)
	41-60	72 (56%)	8 (57%)	18 (56%)	98 (56%)
	> 60	48 (38%)	5 (36%)	11 (34%)	64 (37%)
Anzahl der positiven Lymphknoten	1-3	76 (60%)	11 (79%)	10 (31%)	97 (56%)
	4-9	37 (29%)	1 (7%)	15 (47%)	53 (31%)
	> 9	13 (10%)	2 (14%)	7 (22%)	22 (13%)
	unbekannt	2	0	0	2
Menopause	prä	42 (33%)	4 (29%)	9 (28%)	55 (32%)
	post	86 (67%)	10 (71%)	23 (72%)	119 (68%)
Tumorgroße (mm)	≤ 20	43 (34%)	5 (36%)	5 (16%)	53 (30%)
	21-30	52 (41%)	6 (43%)	15 (47%)	73 (42%)
	>30	33 (26%)	3 (21%)	12 (38%)	48 (28%)
Histologischer Grade	I	13 (10%)	1 (7%)	1 (3%)	15 (9%)
	II	99 (77%)	8 (57%)	13 (41%)	120 (69%)
	III	16 (13%)	5 (36%)	18 (56%)	39 (22%)
Östrogenrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	86 (67%)	10 (77%)	9 (28%)	105 (62%)
	< 20	39 (31%)	3 (23%)	23 (72%)	65 (38%)
	unbekannt	3	1	0	4
Progesteronrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	80 (64%)	9 (75%)	5 (16%)	94 (56%)
	< 20	45 (36%)	3 (25%)	27 (84%)	75 (44%)
	unbekannt	3	2	0	5
c-erbB-2	Keine Überexp.	99 (80%)	9 (64%)	21 (68%)	129 (77%)
	Überexp.	24 (20%)	5 (36%)	10 (32%)	39 (23%)
	unbekannt	5	0	1	6

TAM = Tamoxifen, RAD = Radiotherapie, Überexp. = Überexpression, CMF = Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil

43% der Patienten aus Gruppe 2 hatten sechs Zyklen CMF und eine Radiotherapie erhalten. Die Altersverteilung in Gruppe 2 zeigt keine Unterschiede zu Gruppe 1 oder 3. Wie in Gruppe 1 finden sich in Gruppe 2 häufiger Patienten mit 1 bis 3 positiven Lymphknoten, während mehr als 3 positive Lymphknoten seltener vorkommen als in Gruppe 3. In Bezug auf die Tumorgöße ist Gruppe 2 mit Gruppe 1 vergleichbar. 26 bzw. 21% der Tumoren sind in Gruppe 1 und 2 größer als 30 mm, während 38% in Gruppe 3 größer als 30 mm sind. Hinsichtlich des histologischen Grades nimmt Gruppe 2 eine Mittelstellung zwischen Gruppe 1 und 3 ein. 77% der Tumoren aus Gruppe 1 haben einen Grade von II und 13% von III. In Gruppe 2 weisen 57% einen Grade von II und 36% einen Grade von III auf. In Gruppe 3 überwiegt dann einen Grade von III mit 56%. Für die Hormonrezeptorkonzentration finden sich vergleichbare Werte zwischen Gruppe 1 und 2. Diese beiden Gruppen zeigen häufiger Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentrationen über 20 fmol/mg als Gruppe 3.

Tabelle 7: Univariate Analyse des Effekts p53 Immunhistochemie auf die Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit.

Faktor		Anzahl der Patientinnen	Gesamtüberlebenszeit			Rezidivfreie Überlebenszeit		
			RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert	RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert
P53	Gruppe 1	174	1.00		0.0754	1.00		0.5426
	Gruppe 2		1.53	[0.8,3.1]		1.20	[0.6,2.4]	
	Gruppe 3		1.68	[1.0,2.7]		1.29	[0.8,2.1]	

RR = geschätztes relatives Risiko

Für die Gruppen 2 und 3 ergibt sich gegenüber Gruppe 1 kein signifikant erhöhtes Risiko zu versterben oder ein Rezidiv zu erleiden. Die Abbildung 12 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für die verschiedenen Gruppen.

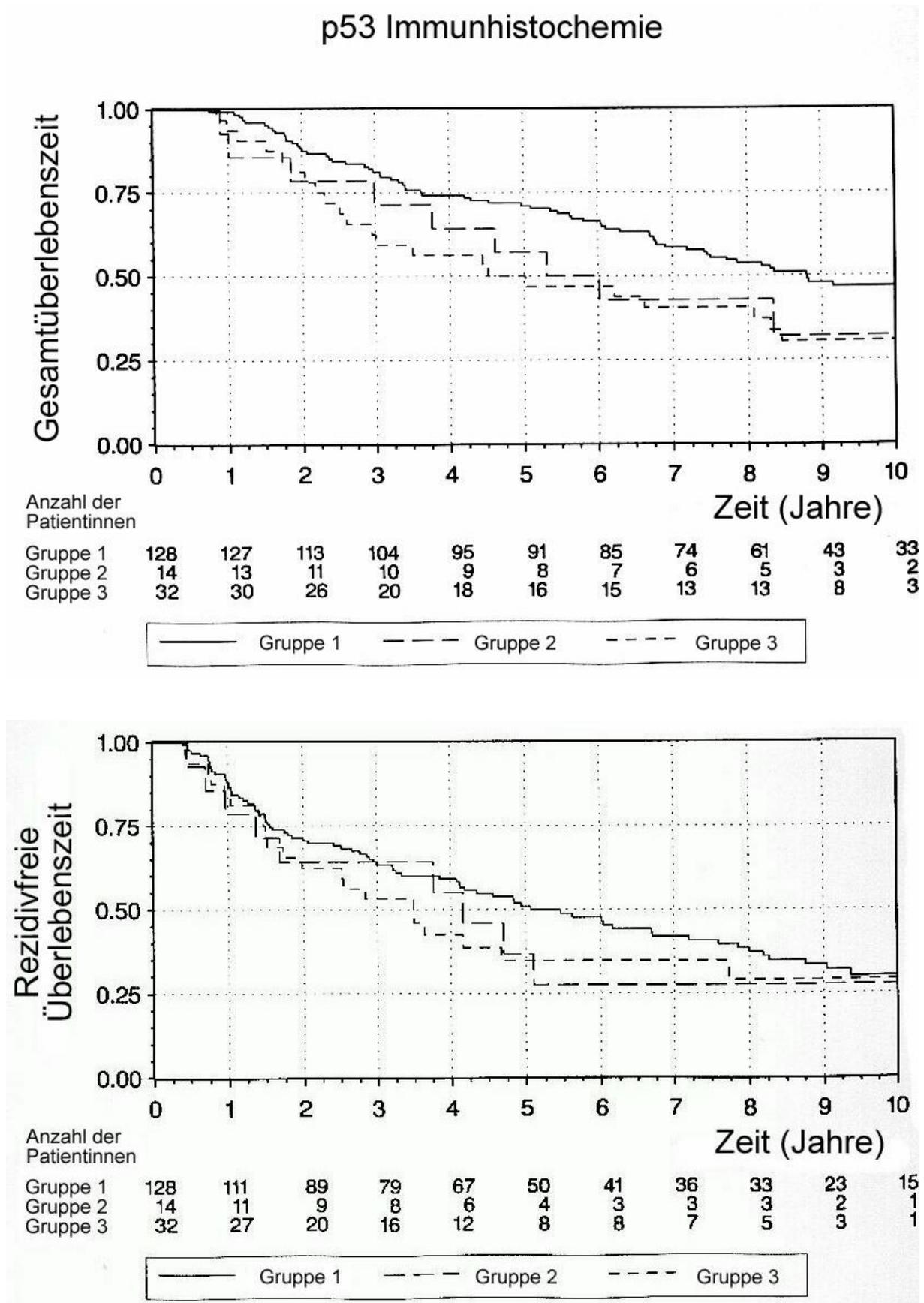


Abbildung 12: Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit für Patientinnen in Abhängigkeit vom Histoscore

3.2 Ergebnisse der LOH-Analyse

79 Gewebeproben lieferten reproduzierbare und eindeutige Ergebnisse für die LOH-Analyse. Als nicht informativ wurden Gewebeproben beurteilt, die im Normalgewebe homozygot waren, so dass keine Aussage bezüglich eines LOHs getroffen werden konnte. Tumoren mit LOH waren im Normalgewebe heterozygot und hatten im Tumorgewebe ein Allel verloren. Heterozygote Proben hatten im Tumorgewebe zwei verschieden Allele. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen beispielhaft einen heterozygoten Tumor und ein LOH.

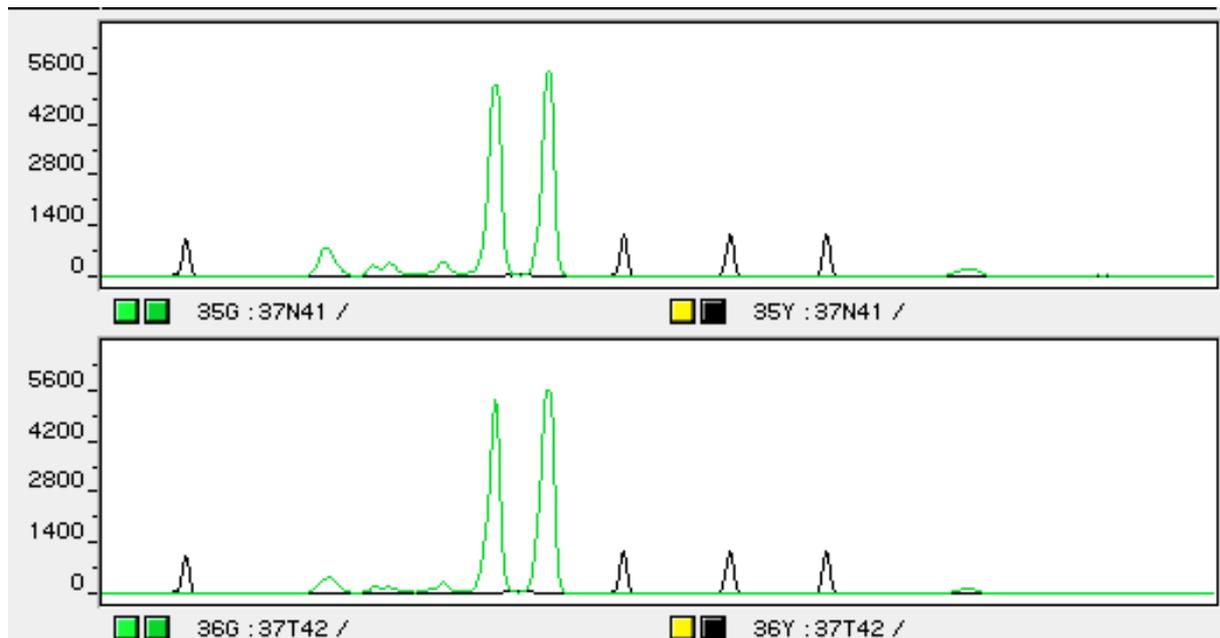


Abbildung 13: Heterozygotie im Normal- und Tumorgewebe am Beispiel des Alurep Primers

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Untersuchungsergebnisse für Normalgewebe und der untere Teil der Abbildung zeigt die Untersuchungsergebnisse für Tumorgewebe der Patientin 18-1059. Die schwarzen Spitzen sind Peaks des Längenstandards Genescan-500 Tamra. Ihre Größe liegt in der Reihenfolge von links nach rechts bei 100, 139, 150 und 160. Die beiden großen, grünen Peaks stehen für die zwei verschiedenen Allele mit der Größe 127 und 132. Da diese beiden Allele sowohl im Normalgewebe als auch im Tumorgewebe nachweisbar sind, ist der Tumor dieser Patientin für den Alurep Primer heterozygot.

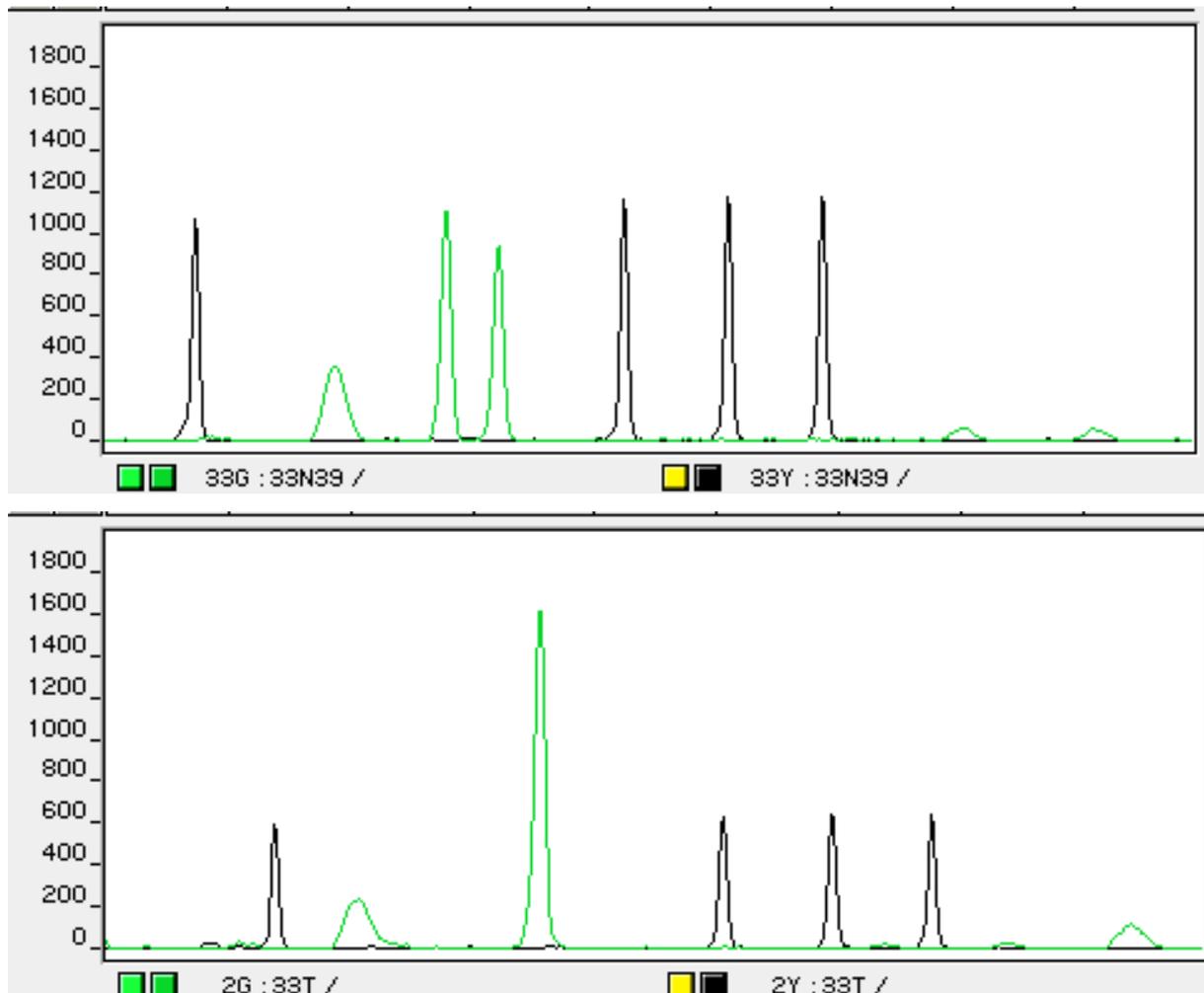


Abbildung 14: Heterozygotie im Normalgewebe und Allelverlust im Tumorgewebe (LOH) am Beispiel des Alurep Primers

Im Gegensatz zu Abbildung 13 fällt hier der Verlust eines grünen Peaks im Tumorgewebe der Patientin 18-1058 auf. Die schwarzen Peaks stehen für den selben Längenstandard wie in Abbildung 13. Während im Normalgewebe zwei Allele mit der Größe 122 und 127 zu sehen sind, lässt sich im Tumorgewebe nur noch das Allel mit der Größe 122 nachweisen. Die Peakhöhen für die Allele mit der Größe 122 und 127 betragen im Normalgewebe 1168 und 982; im Tumorgewebe beträgt die Peakhöhe 2434 für das Allel mit der Größe 122. Der Verlust der Heterozygotie wird als LOH gewertet.

Die Tabelle 8 zeigt alle Ergebnisse für die beiden Primer Alurep und Mfd 41 getrennt. In den Zeilen, in denen keine Allelgrößen eingetragen sind, waren die Untersuchungsergebnisse nicht reproduzierbar.

Klinik	Patient	Primer	Allel im Normalgewebe	Allel im Tumor	Auswertung	Ergebnis
10	512	Alurep Mfd 41	127	127 157	Homozygot	Nicht informativ
10	591	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
13	37	Alurep	127+ 132	127	LOH	LOH
13	38	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
13	39	Alurep Mfd 41	127	127 155	Homozygot	Nicht informativ
13	41	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
18	358	Alurep Mfd 41	127 157	127	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
18	687	Alurep Mfd 41	127 157+ 159	127 157	Homozygot LOH	Nicht informativ LOH
18	690	Alurep Mfd 41	127	127 157	Homozygot	Nicht informativ
18	902	Alurep Mfd 41	127 157	127	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
18	908	Alurep	127+ 132	132	LOH	LOH
18	1056	Alurep	132	132	Homozygot	Nicht informativ
18	1057	Alurep	127+ 132	132	LOH	LOH
18	1058	Alurep	122+ 127	122	LOH	LOH
18	1059	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
18	1061	Alurep	122+ 127	127	LOH	LOH
18	1102	Alurep Mfd 41	132 155+ 157	132 157	Homozygot LOH	Nicht informativ LOH
18	1104	Alurep	122+ 127	122+ 127	Heterozygot	Heterozygot
18	1107	Alurep	122+ 127	122	LOH	LOH
18	1334	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
18	1545	Alurep	122+ 132	122	LOH	LOH
18	1699	Alurep	127	127	Homozygot	Nicht informativ
18	1707	Mfd 41		155+ 157	Heterozygot	Heterozygot
18	1709	Alurep	127+ 132	132	LOH	LOH
18	1763	Alurep	127+ 132	127	LOH	LOH
201	891	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
206	1250	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
207	1424	Alurep	122+ 132	122+ 132	Heterozygot	Heterozygot
209	86	Alurep	127		Homozygot	Nicht informativ
209	1130	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
210	1004	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
210	1316	Alurep Mfd 41	127 157	127	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
210	1317	Alurep	127+ 132	127	LOH	LOH
210	1319	Alurep	127+ 132	127	LOH	LOH
210	1321	Alurep	132	132	Homozygot	Nicht informativ
210	1322	Alurep	122+ 127	122+ 127	Heterozygot	Heterozygot
210	1685	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
210	1687	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
211	102	Alurep		122+ 127	Heterozygot	Heterozygot
211	1189	Alurep	122	122	Homozygot	Nicht informativ
227	266	Alurep	122+ 127	122+ 127	Heterozygot	Heterozygot
236	546	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot

Klinik	Patient	Primer	Allel im Normalgewebe	Allel im Tumor	Auswertung	Ergebnis
236	882	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
236	1221	Alurep	127+ 132	132	LOH	LOH
236	1326	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
236	1327	Alurep	122+ 127	122	LOH	LOH
236	1331	Alurep	127	127	Homozygot	Nicht informativ
236	1332	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
251	664	Alurep Mfd 41	127 157	127	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
501	448	Alurep Mfd 41	127	127 157	Homozygot	Nicht informativ
501	526	Alurep	127	127	Homozygot	Nicht informativ
501	528	Alurep	127	127	Homozygot	Nicht informativ
503	234	Alurep	127+ 132	127	LOH	LOH
503	290	Alurep Mfd 41	127	127 157	Homozygot	Nicht informativ
503	596	Alurep	127+ 132	132	LOH	LOH
503	598	Alurep Mfd 41	127	127 157	Homozygot	Nicht informativ
503	600	Alurep Mfd 41	132	132 157+ 159	Homozygot Heterozygot	Nicht informativ Heterozygot
503	748	Alurep	127	127	Homozygot	Nicht informativ
503	749	Alurep	122+ 132	132	LOH	LOH
506	65	Mfd 41	157	157	Homozygot	Nicht informativ
506	68	Alurep Mfd 41	132	132 157	Homozygot	Nicht informativ
506	70	Alurep	122+ 127	122+ 127	Heterozygot	Heterozygot
506	71	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
515	391	Alurep	132		Homozygot	Nicht informativ
515	652	Mfd 41	157		Homozygot	Nicht informativ
515	765	Alurep Mfd 41	127 159+ 161	127 159	Homozygot LOH	Nicht informativ LOH
521	805	Alurep	127+ 132	127+ 132	Heterozygot	Heterozygot
525	325	Mfd 41	159	159	Homozygot	Nicht informativ
525	326	Alurep	122+ 132	122+ 132	Heterozygot	Heterozygot
525	328	Alurep Mfd 41	132 157+ 159	132 157	Homozygot LOH	Nicht informativ LOH
525	329	Alurep	122+ 132	122+ 132	Heterozygot	Heterozygot
525	330	Alurep Mfd 41	127 157	127 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
525	333	Alurep	127+ 132	127	LOH	LOH
525	514	Alurep Mfd 41	127 157+ 159	127 157	Homozygot LOH	Nicht informativ LOH
525	520	Alurep Mfd 41	132 157	132 157	Homozygot Homozygot	Nicht informativ Nicht informativ
527	504	Alurep Mfd 41	127+132	132 155	LOH	LOH
527	613	Alurep	127	127	Homozygot	Nicht informativ
527	621	Alurep		127+132	Heterozygot	Heterozygot
527	668	Alurep		127+ 132	Heterozygot	Heterozygot

Tabelle 8: Ergebnisse für die Primer Mfd 41 und Alurep

Auf Grund der kleinen Fallzahlen wurden für die weiteren Auswertungen die beiden Primerpaare zusammen betrachtet.

22 Tumoren (28%) waren heterozygot für mindestens einen der untersuchten Primer. 29% der Proben hatten ein LOH für p53. Die 34 nicht informativen Fälle (Homozygotie im Normalgewebe) machten 43% der untersuchten Proben aus. Tabelle 9 beschreibt das Verhältnis zwischen den Ergebnissen der LOH-Analyse und der immunhistochemischen Untersuchung.

Tabelle 9: Beschreibung des Verhältnisses zwischen den Ergebnissen der LOH-Analyse und der immunhistochemischen Untersuchung

		nicht informativ (n=34)	heterozygot (n=22)	LOH (n=23)	Total (n=79)
p53- Immunhistochemie	negativ	28 (90%)	15 (75%)	14 (74%)	57 (81%)
	positiv	3 (10%)	5 (25%)	5 (26%)	13 (19%)
	unbekannt	3	2	4	9

26% der Tumoren mit einem LOH für p53 waren in der immunhistochemischen Untersuchung positiv. Bei den restlichen 74% der Tumoren mit einem LOH fiel die immunhistochemische Untersuchung negativ aus. 75% der heterozygoten Tumoren zeigten keine p53-Akkumulation. 90% der nicht informativen Proben hatten einen negativen immunhistochemischen Untersuchungsbefund.

Tabelle 10: Univariate Analyse des Effektes eines LOHs auf die rezidivfreie Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit

Faktor		Anzahl der Patientinnen	Gesamtüberlebenszeit			Rezidivfreies Überlebenszeit		
			RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert	RR	95% Konfidenzintervall	p-Wert
p53	nicht informativ	79	1.00		0.5686	1.00		0.5961
	heterozygot		0.86	[0.4,1.7]		0.84	[0.4,1.7]	
	LOH		0.69	[0.3,1.4]		0.68	[0.3,1.4]	

RR = geschätztes relatives Risiko

Für Tumoren mit mindestens einem LOH finden sich keine signifikant erhöhten relativen Risiken.

Die Kaplan-Meier-Methode wurde mit den Zielparametern Gesamtüberlebenszeit und rezidivfreie Überlebenszeit durchgeführt (siehe Abbildung 15 und 16). Es ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der LOH-Untersuchung und der Überlebenszeit.

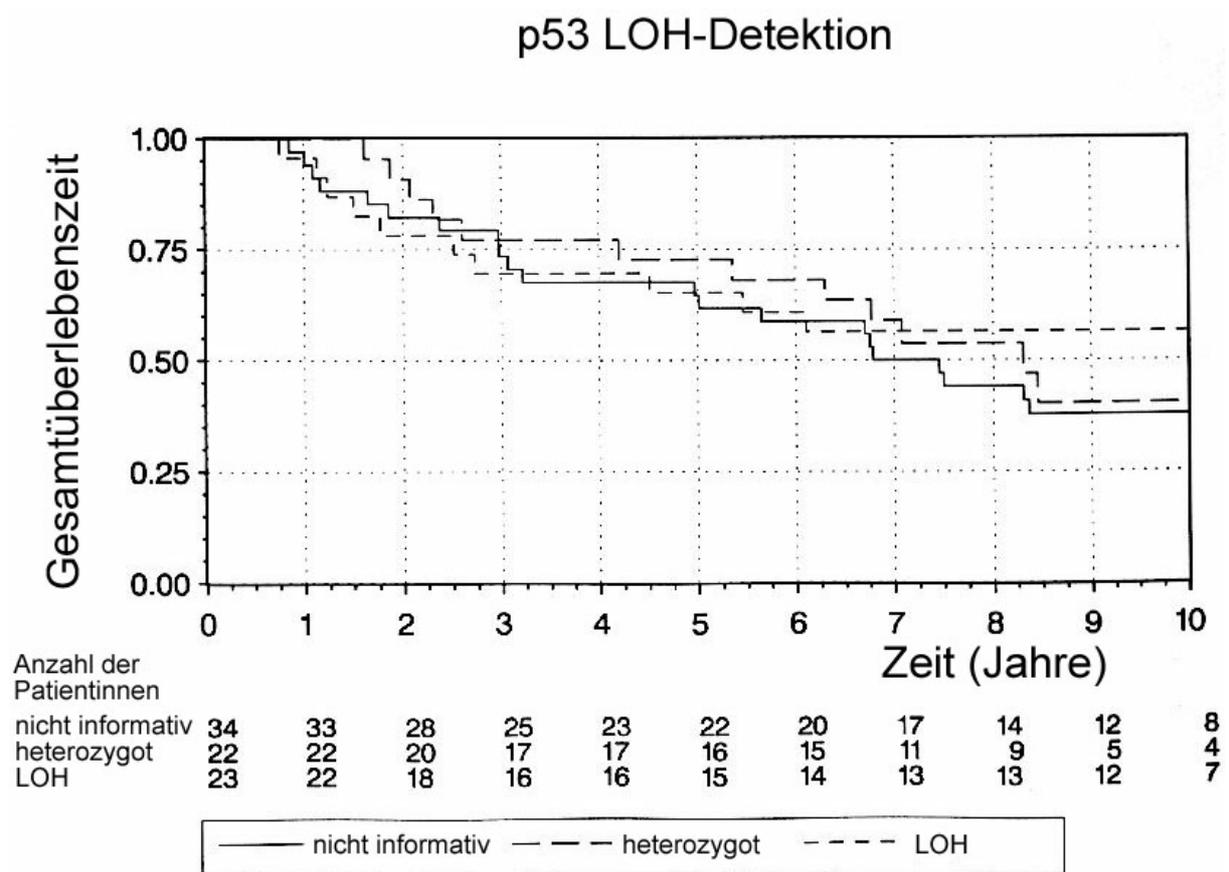


Abbildung 15: Auswirkung des LOH-Status auf die Gesamtüberlebenszeit

p53 LOH-Detektion

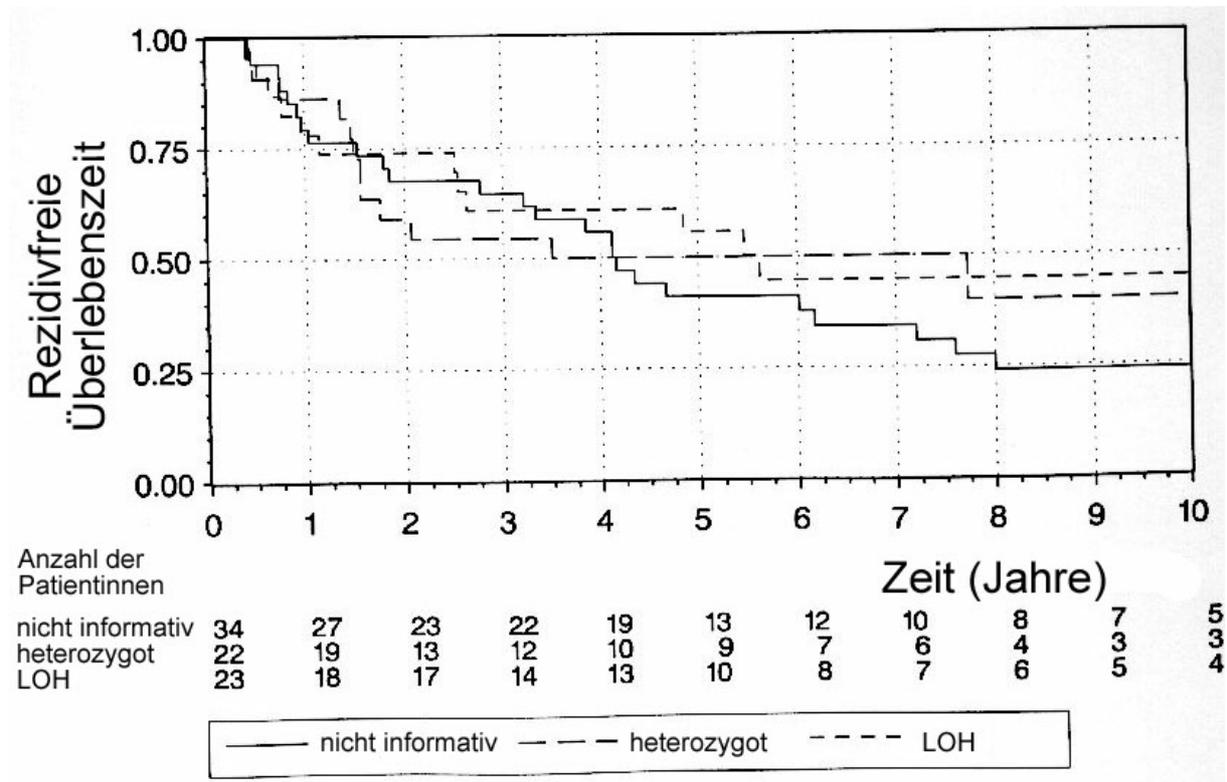


Abbildung 16: Auswirkung des LOH-Status auf die rezidivfreie Überlebenszeit

4 Diskussion

Mit Hilfe zusätzlicher prognostischer und diagnostischer Faktoren wird seit langem versucht, eine adäquate risikoadaptierte Therapiestrategie zu finden. Ziel dieser Überlegungen ist es, nur den Anteil der Patientinnen zu bestimmen, der von einer adjuvanten Behandlung profitiert und eine unnötige Therapie der Patientinnen zu vermeiden, die schon durch den chirurgischen Eingriff kurativ behandelt sind. Solche prognostischen Faktoren müssen in großen Patientenkollektiven bei ausreichend langen Nachbeobachtungszeiten auf ihre unabhängige Bedeutung geprüft werden. Eine andere interessante Fragestellung ist, ob einige Faktoren eine Chemoresistenz oder verminderte Radiosensitivität vorhersagen können. Mit ihrer Hilfe könnte die adjuvante Therapie des Mammakarzinoms weiter optimiert und individualisiert werden.

Viele Prognosefaktoren, wie z.B. die Hormonrezeptorkonzentration, werden bei Mammakarzinompatientinnen bereits routinemäßig durchgeführt. Sie dienen als Entscheidungshilfe für das Therapieregime und sollen Risikopatientinnen mit schlechter bzw. guter Prognose identifizieren. Das „College of American Pathologists Consensus Statement“ nennt als prognostische Faktoren erster Ordnung Tumorgröße, TNM Staging, histologischer Grade, Lymphknotenstatus, histologischer Tumortyp, mitotische Aktivität und Hormonrezeptorstatus. In der vorliegenden Arbeit wurden Alter, Lymphknotenstatus, Menopausenstatus, Tumorgröße, Grade und Hormonrezeptorstatus als Standardfaktoren definiert. Faktoren erster Ordnung hätten einen bewiesenen prognostischen Effekt. Zu den Faktoren zweiter Ordnung gehören z. B. HER2/neu, MIB-1, Ki-67, S-Phase-Fraktion und p53. Hier werden zur Validierung dieser Faktoren umfangreichere Studien gefordert. Die dritte Kategorie beinhaltet Aneuploidie, Tumorangio-genese, epidermal growth factor-Rezeptor, transforming growth factor-Rezeptor, bcl-2, pS2 und Cathepsin D. Die Bedeutung dieser Faktoren müsse erst noch in großen Studien verdeutlicht werden (Fitzgibbons et al., 2000). Viele Studien sehen davon den axillären Lymphknotenstatus als den stärksten alleinstehenden Prädiktor für die rezidivfreie Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit (Fisher et al., 1993; Fitzgibbons et al., 2000). Welche der neueren Faktoren die Prognose des Mammakarzinoms entscheidend verbessern werden, ist noch abzuwarten.

Einer dieser Faktoren, der Gegenstand vieler Studien ist, ist das Tumorsuppressorgen p53. Veränderungen des p53 können durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Als

Beispiele seien die Sequenzierung des p53-Gens, die SSCP-Untersuchung (single-strand-conformation polymorphism), FISH (fluorescence in-situ hybridization), die LOH-Analyse und die Immunhistochemie genannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Tumormaterial von 174 Patientinnen aus den prospektiven multizentrischen Therapiestudien 2 und 3 der German Breast Cancer Study Group (GBSG) untersucht. Insgesamt umfassten die Studien der GBSG 1710 Mammakarzinompatientinnen, von denen 1048 eine Beteiligung der axillären Lymphknoten aufwiesen. Unser Kollektiv setzte sich ausschließlich aus nodalpositiven Patientinnen zusammen. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug bezüglich des rezidivfreien Überlebens 9 Jahre und bezüglich des Gesamtüberlebens 10 Jahre. An nahezu demselben Kollektiv ist in dem Institut der Onkologischen Chemie eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis der HER2/neu Amplifikation durchgeführt worden. Da es sich in beiden Fällen nicht um eine Zufallsstichprobe aus dem Gesamtkollektiv der GBSG Studien handelt, musste ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Patientinnen keiner prognostisch besonders günstigen oder ungünstigen Gruppe angehören. Für die Standardfaktoren (Alter, Menopausenstatus, Anzahl der positiven Lymphknoten, Tumorgröße, histologischer Grade und Steroidrezeptorkonzentration) und den histologischen Tumortyp ergaben sich gute Übereinstimmungen zwischen dem untersuchten und nicht untersuchten Kollektiv. Auch die Überlebensraten waren ähnlich, so dass nicht von einer systematischen Selektion ausgegangen werden kann. Durch das statistische Zentrum der Therapiestudien wurde sichergestellt, dass das untersuchte Kollektiv ausreichend repräsentativ für das Gesamtkollektiv der Therapiestudien 2 und 3 war (Bente, noch nicht veröffentlicht). Weiterhin ist die Verteilung der Standardfaktoren in unserem Kollektiv der anderer Studien ähnlich (Tabelle 11). Thor et al. (1998) untersuchten wie wir ausschließlich ein nodal positives Patientinnengut. Auch hier ist kein Hinweis für eine Selektion unseres Kollektivs zu finden.

Tabelle 11: Vergleich der Zusammensetzung zwischen unserem Kollektiv und dem Kollektiv von Thor et al. (1998)

Faktor		Vorliegende Arbeit (n=174)	Thor et al., 1998 (n=1572)
Anzahl der positiven Lymphknoten	1-3	97 (56%)	927 (59%)
	4-9	53 (31%)	456 (29%)
	> 9	22 (13%)	175 (11%)
	unbekannt	2	14
Menopause	prä	55 (32%)	673 (43%)
	post	119 (68%)	879 (56%)
Tumorgroße (mm)	≤ 20	53 (30%)	555 (35%)
	21-30	73 (42%)	} 994 (63%)
	>30	48 (28%)	
Histologischer Grade	I	15 (9%)	Nicht bestimmt
	II	120 (69%)	
	III	39 (22%)	
Östrogenrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	105 (62%)	1006 (64%)
	< 20	65 (38%)	527 (34%)
	unbekannt	4	39
Progesteronrezeptor (fmol/mg)	≥ 20	94 (56%)	844 (54%)
	< 20	75 (44%)	645 (41%)
	unbekannt	5	83

In vielen menschlichen Tumoren ist eine p53 Überexpression mit histologischen und biologischen Parametern assoziiert, die auf einen aggressiven Tumor deuten. Beim invasiven Mammakarzinom findet sich meistens eine p53 Überexpression in Verbindung mit einer großen Tumormasse, duktalem Karzinom, Verlust von Steroidhormonrezeptoren, hoher Proliferationsaktivität, EGFR-Expression und Aneuploidie. Deshalb könnte die immunhistochemische Untersuchung von p53 beim Mammakarzinom einen bedeutenden prognostischen Wert haben. Trotzdem kommen viele Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen, die sich auf Grund methodischer und technischer Unterschiede schlecht vergleichen lassen (Barbareschi, 1996).

Wir haben 174 Patientinnen mit dem Antikörper DO-1 immunhistochemisch auf eine p53 Akkumulation untersucht. 32 Proben (18%) waren für p53 positiv. Barbareschi (1996) berichtet in seinem Übersichtsartikel, der 37 Studien analysiert und mehr als 9.800 nodal positive und nodal negative Patienten umfasst, von 9% bis 52% positiven Fällen. Cunningham et al. (1994) und Gasparini et al. (1995) finden in einem ausschließlich nodal positivem Patientenkollektiv in 16% bzw. 19% der Fälle eine p53 Überexpression. Thorlacius et al. (1995) beschreiben in 21% eine p53 Überexpression. In dieser Studie wurden 106

Mammakarzinompatientinnen mit dem gleichen monoklonalen Antikörper (DO-1) untersucht, den auch wir verwendet haben. Die in unserer Untersuchung beobachteten 18% liegen somit innerhalb der Norm.

Verschiedene Studien zeigen eine positive Korrelation zwischen p53 Akkumulation und negativen Steroidrezeptoren (Stenmark-Askmal et al., 1995; Midulla et al., 1999; Bertheau et al., 1998; Friedrichs et al., 1993; Seshahadri et al., 1996). Auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein statistischer Test z.B. auf generelle Assoziation durchgeführt worden ist, fällt eine deutliche Häufung zwischen p53 Überexpression und negativen Östrogenrezeptor (72%) bzw. negativen Progesteronrezeptor (84%) auf. Weiterhin gingen p53 positive Tumoren in unserer Studie mit einem größerem Tumor und einem höherem Grade einher. Die Untersuchungen von Stenmark-Askmal et al. (1995) und Bertheau et al. (1998) bestätigen diese Beobachtung. Midulla et al. (1999) berichtet über eine Korrelation ($p = 0.0001$) zwischen p53 Überexpression und befallenen Lymphknoten. In der vorliegenden Arbeit sind p53 positive Tumoren häufiger mit einer erhöhten Anzahl positiver Lymphknoten verbunden. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Stenmark-Askmal et al. (1995) und Seshahadri et al. (1996) findet sich in unserem Kollektiv keine Verbindung zwischen positiven immunhistochemischen p53 Status und Alter < 50 Jahren.

Mit Hilfe des Coxschen Regressionsmodells wurde die univariate und multivariate Bedeutung der Standardfaktoren und p53 untersucht. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten kann auch in unserem Patientengut als starker prognostischer Faktor beobachtet werden (Fisher et al., 1993; Friedrichs et al., 1993). Weiterhin hatten Tumorgröße und Progesteronrezeptor eine statistische signifikante Assoziation für das rezidivfreie Überleben ($p = 0.0003$ bzw. 0.0002) und das Gesamtüberleben ($p = 0.0009$ bzw. 0.0083). Nur für das Gesamtüberleben ergab sich eine signifikante Bedeutung der Faktoren Östrogenrezeptor ($p = 0.0031$) und histologischer Grade ($p = 0.0118$). In der multivariaten Analyse fand sich eine signifikante Korrelation zum rezidivfreien Überleben und zum Gesamtüberleben für Alter ≤ 40 Jahre, Anzahl der positiven Lymphknoten, Tumorgröße und Progesteronrezeptor. Die wichtige Bedeutung dieser Standardfaktoren wird auch von anderen Autoren beschrieben (Kato et al., 2000; Seshadri et al., 1996; Friedrichs et al., 1993; Thor et al., 1998).

p53 Überexpression kann in dieser Studie nicht als unabhängiger Faktor in der multivariaten Analyse bestätigt werden. Ein signifikanter Wert ergibt sich nur in der univariaten Analyse für das Gesamtüberleben. Eine p53 Überexpression scheint demnach mit den stärkeren

Prognoseparametern assoziiert zu sein, so dass für p53 kein signifikanter Wert in der multivariaten Analyse erreicht wird.

In der Literatur wird die Rolle des p53-Überexpression kontrovers diskutiert. Während einige Studien keinen signifikanten prognostischen Wert für p53 erkennen (Rozaan et al., 1998; Ostrowski et al., 1991; Haerslev et al., 1995; Lipponen et al., 1993; Rosen et al., 1995) sehen andere Arbeiten p53 Überexpression als signifikanten prognostischen und prädiktiven Faktor (Barnes et al., 1992a; Friedrichs et al., 1993; Gasparini et al., 1994; Isola et al., 1992; MacGrogan et al., 1995; Silvestrini et al., 1993; Thor et al., 1992). Gasparini et al. (1994) beobachten in einem Kollektiv von 254 nodal negativen Patientinnen, dass p53 ein unabhängiger prognostischer Indikator für einen frühen Rückfall sei. Im Gegensatz dazu waren Rozaan et al. (1995) nicht in der Lage, in einer retrospektiven Studie von 440 nodal negativen Patientinnen und einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 119 Monaten, diese Assoziation zwischen p53 und ungünstiger Prognose zu bestätigen. Andere Studien wiederum beschreiben p53 als „borderline“ Prognosefaktor (Cunningham et al., 1994; Gasparini et al., 1995; Kato et al., 2000). So berichten Thor et al. (1998) in ihrem Kollektiv von über 900 Patientinnen über eine signifikante Bedeutung von p53 in der univariaten Analyse für das Gesamtüberleben. Dieser Effekt verliert sich aber – wie auch in unserer Arbeit beschrieben – in der multivariaten Analyse. Auch Seshadri et al. (1996) können für p53 nur in der univariaten Analyse einen Effekt auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben nachweisen.

Letztendlich kann in dieser Studie der prognostische Wert der immunhistochemischen Bestimmung von p53 nicht eindeutig geklärt werden. p53 zeigt sich in unserem Kollektiv zwar in der univariaten Analyse als signifikanter Faktor für das Gesamtüberleben, kann sich aber nicht in der multivariaten Analyse gegen den Progesteronrezeptor, die Anzahl der betroffenen Lymphknoten und die Tumorgröße behaupten.

Im Gegensatz dazu ist p53 in der Datenbank des Institutes für Onkologische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) ein hoch signifikanter Marker für das Überleben. Die Datenbank umfasst 1399 nodal positive und nodal negative Mammakarzinompatientinnen, deren p53 Status immunhistochemisch bestimmt worden ist. Betrachtet man nur die Gruppe der nodal positiven Patientinnen, so ergibt sich für p53 auch in diesem Kollektiv eine signifikante prognostische Bedeutung ($p < 0.0001$). In der Gruppe der nodal negativen Patientinnen ist das Signifikanzniveau hinsichtlich der Gruppentrennung

durch p53 geringer (von der Haar, 2000). An diesem Gesamtkollektiv von 1399 Mammakarzinompatientinnen ist auch die von uns gebrauchte Schwelle von 180 für den Histoscore bestätigt worden. Ein Histoscore < 180 wurde als negativ, ein Histoscore ≥ 180 als positiv gewertet. Da diese Umwandlung einer kontinuierlichen Variablen in ein dichotomes Scoring-System einen erheblichen Informationsverlust beinhaltet, wurde unser Kollektiv zusätzlich in mehrere Fallgruppen aufgeteilt. Ein Score bis 75 wurde als Gruppe 1, von 76 bis 179 als Gruppe 2 und ab 180 als Gruppe 3 definiert. Diese Unterteilung brachte keinen Vorteil gegenüber der dichotomen Einteilung. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung ist die kleine Patientinnenzahl in der Gruppe 2. Trotz des viel größeren Kollektives der Datenbank des Institutes der Onkologischen Chemie kann aber auch hier keine sinnvolle Abwandlung der dichotomen Trennung durch Abgrenzung zusätzlicher Risikogruppen gefunden werden. (von der Haar, 2000). Die Prognose der Patientinnen mit einem Histoscore von 76 bis 179 kann weder einem besonders günstigen noch ungünstigen Verlauf zugeordnet werden und führt zu keiner schärferen Risikoabgrenzung.

An annähernd dem gleichen Patientengut der Therapiestudien 2 und 3 der GBSG ist zur gleichen Zeit am Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf die Bedeutung des HER2/neu Onkogens untersucht worden. Die Studie ermittelt HER2/neu als starken unabhängigen Prognosefaktor bei CMF-therapierten nodal positiven Mammakarzinompatientinnen. Sowohl für die Amplifikation des Gens als auch für die Überexpression konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. Das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben war beim Vorliegen einer HER2/neu Amplifikation und Überexpression in der univariaten und multivariaten Analyse signifikant verkürzt. Diese Ergebnisse sind, auch wenn kein direkter Beweis im Rahmen dieser Studien erbracht werden konnte, mit der Vorstellung einer Assoziation des HER2/neu Status und einer CMF-Resistenz vereinbar (Bente, 2000, Stal et al., 1995). Auch p53 ist mit einer erhöhten CMF-Resistenz in Verbindung gebracht worden (Koechli et al., 1994; Dowell et al., 1995). Dagegen konnte Makris et al. (1995) in einer Studie von 956 nodal positiven Mammakarzinompatientinnen keinen Zusammenhang zwischen p 53 Überexpression und das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie oder endokrine Therapie entdecken.

Da wir fast dasselbe Patientinnengut auf die Relevanz der immunhistochemischen p53 Expression untersucht haben, kann die Bedeutung von p53 und HER2/neu in diesem nodal positiven Kollektiv miteinander verglichen werden: HER2/neu stellt sich als unabhängiger, hoch signifikanter Prognosefaktor dar, der die Aussagekraft der p53 Überexpression

übertrifft. Weiterhin kann HER2/neu eher in Zusammenhang mit einer CMF-Resistenz in Verbindung gebracht werden als p53. Inwiefern diese Beobachtungen auf alle Mammakarzinompatientinnen übertragbar sind, muss noch in größeren Studien geklärt werden.

Seit mehr als 20 Jahren wird p53 immunhistochemisch untersucht (Cattoretti et al., 1988). Trotzdem existieren bis heute keine einheitlichen Methoden und Auswertungssysteme. Einer der wichtigsten Gründe für die schlechte Vergleichbarkeit vieler Studien, ist der Gebrauch unterschiedlicher technischer und methodischer Ansätze. Zum einen werden verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Epitopenspezifitäten verwendet und zum anderen werden verschiedene Scores und „cut off“ Werte zur Klassifizierung der immunhistochemischen p53 Reaktion genutzt (Barbareschi, 1996). Halle und Lane (1994) messen dem quantitativen Aspekt der p53 Expression einen bedeutenden Wert zu. Sie vermuten, dass die Schwelle, die zwischen positiver und negativer p53 Expression unterscheidet, die Studienergebnisse entscheidend mitbestimmt. Dabei ist die Definition des Schwellenwertes von zentraler Bedeutung. Wird dabei die Schwelle zu niedrig gesetzt besteht die Möglichkeit, dass lediglich rasch proliferierendes Normalgewebe nachgewiesen wird und somit eine falsch positives Ergebnis die Folge ist. Andere Autoren machen die verschiedenen Studiendesigns für die Tatsache, dass die klinische Relevanz von p53 nach wie vor kontrovers diskutiert wird, verantwortlich. Da noch nach 10 Jahren beim Mammakarzinom Rezidive auftreten können, ist die Studiendauer von außerordentlicher Bedeutung. Die Nachbeobachtungsdauer könnte zusätzlich relevant sein, da eine p53 Überexpression das Kurzzeit- und Langzeitüberleben der Mammakarzinompatientinnen unterschiedlich beeinflussen könnte (Barbareschi, 1996). Dowell et al. (1995) vermuten, dass die statistische Aussagekraft von p53 auch von der Anzahl der Studienpatientinnen abhängt. Zusätzlich unterscheiden viele Studien nicht zwischen nodal positiven und nodal negativen Patientinnen. Eine derartige Unterteilung ist aber wichtig, da p53 bei nodal positiven Tumoren von größerer prognostischer Bedeutung zu sein scheint. Ein weiterer Grund, der die Aussagekraft einiger Studien einschränkt, sind die unterschiedlichen statistischen Methoden. So verzichten einige Autoren auf multivariate Analysen und betrachten die prognostische Bedeutung des p53 nur univariat. Wie bei jedem neuen prognostischen Marker ist es aber notwendig, den prognostischen Wert der p53 Überexpression gegen die etablierten Standardfaktoren zu testen (Barbareschi, 1996).

In unserer Arbeit wird die Gesamtüberlebenszeit als Zeitraum zwischen Mastektomie und Tod der Patientinnen definiert. In den meisten Fällen wurde das statistische Zentrum der Therapiestudien durch das Einwohnermeldeamt über das Versterben der Patientinnen informiert. Aufgrund dieses allgemein üblichen Vorgehens ist die Todesursache häufig unbekannt. Deshalb erscheinen auch Patientinnen in der Statistik, die nicht an den Folgen des Mammakarzinoms verstorben sind. Gerade bei älteren Patientinnen sind andere Todesursachen denkbar. Da wir ein relativ kleines Kollektiv von 174 Patientinnen untersucht haben, könnten schon wenige Patientinnen, deren Tod nicht durch das Mammakarzinom verursacht wurde, einen Effekt auf die Studienergebnisse haben. Die prognostische Bedeutung von p53 würde in dieser Situation geringer ausfallen, als wenn nur Patientinnen, die an Brustkrebs verstorben sind, in die Analysen aufgenommen würden. Im Nachhinein konnte nicht mehr geklärt werden wie viele der Patientinnen am Mammakarzinom verstorben sind und wie viele nicht. Folglich können wir nur vermuten, dass diese Tatsache die schwache prognostische Bedeutung der p53 Überexpression in unserer Arbeit mitbedingt.

Wildtyp p53 ist ein zelluläres Protein mit einer kurzen Halbwertszeit. Die meisten Mutationen im p53-Gen sind „missense“ Mutationen, die ein stabilisiertes mutiertes p53-Protein mit einer verlängerten Halbwertszeit hervorbringen. Das mutierte p53 akkumuliert im Zellkern und inaktiviert Wildtyp p53. Mutationen eines Allels des p53-Gens sind häufig assoziiert mit einem Verlust des Wildtyp p53, und führen so zu einem Verlust der Heterozygotie (LOH). Normalerweise ist Wildtyp p53 im Zellkern langsam proliferierender Zellen immunhistochemisch auf Grund der kurzen Halbwertszeit nicht nachweisbar. Hingegen ist mutiertes p53 der immunhistochemischen Untersuchung zugänglich (Iggo et al., 1990; Bodner et al., 1992). Deshalb wird angenommen, dass eine p53 Überexpression ein indirekter Indikator für das Vorliegen einer Mutation im p53 Gen sei (Bodner et al., 1992). Trotzdem gilt es Vorsicht zu bewahren. Nicht jede p53 Mutation führt zu einer p53 Überexpression (Casey et al., 1996) und auch eine p53 Überexpression ist nicht immer das Resultat einer p53 Mutation (Marchetti et al., 1993). p53 akkumuliert auch, wenn inaktive Komplexe mit viralen Produkten oder endogenen Proteinen gebildet werden (Marchetti et al., 1995; Hall and Lane, 1994). Genotoxische Insulte oder spontane endogene genetische Fehler können eine physiologische Erhöhung der p53 Konzentration auslösen, die unter Umständen die immunhistochemische Nachweisgrenze erreichen können. Eine andere Ursache einer p53 Akkumulation kann ein verzögerter Abbau des p53 Proteins sein (Barbareschi, 1996). In diesem Zusammenhang wird deutlich wie wichtig der quantitative Aspekt der p53

Akkumulation ist (Hall und Lane, 1994). Doglioni et al. (1995) vermuten, dass nur einige stark positive Zellen ein normal arbeitendes p53 System widerspiegeln. Im Gegensatz dazu ist eine sehr starke Überexpression in der Mehrzahl der Tumorzellen ein Hinweis auf eine p53 Mutation (Baas et al., 1994). Barnes et al. (1992b) berichten über onkologische Patienten mit hohen p53 Expressionen ohne zugrundeliegende p53 Mutationen. Ein Beispiel ist die massive p53 Überexpression bei nasopharyngealen Tumoren, die mit einer EBV Infektion einhergehen, bei Abwesenheit von p53 Mutationen (McCormick et al., 1993). Eine p53 Überexpression muss also nicht notwendigerweise mit einer Mutation im p53 Gen einhergehen. Neben falsch positiven Resultaten, können auch falsch negative Ergebnisse vorkommen, denn nicht jede Mutation stabilisiert das p53-Protein. Am häufigsten sind zwar Punktmutation, die meistens das Protein stabilisieren; Deletionen, Frameshifts oder Nonsense Mutationen führen aber in den meisten Fällen nicht zu einer Proteinstabilisierung, so dass diese der Immunhistochemie verborgen bleiben (Wallace-Brodeur und Lowe, 1999).

Viele Studien berichten von einer positiven Korrelation zwischen LOH in Tumorsuppressorgenen und klinischen Parametern, die für eine gesteigerte Tumormalignität sprechen (Nagai et al., 1995; Kelsell et al., 1996; Beckmann et al., 1996; Stratton et al., 1995). Chen et al. (1991) beschreiben, dass ein LOH innerhalb p53 mit einer geringen Differenzierung des Mammakarzinoms korreliert. Mikrosatelliten-Instabilität auf dem Chromosom 17 sei zusätzlich mit aggressivem Verhalten und einer Progression des Tumors assoziiert (Yang et al., 1997). Hampl et al. (1999) berichten über eine signifikant verkürzte Überlebenszeit bei Brustkrebspatientinnen mit einem LOH im Primärtumor und in einer Metastase. Im Gegensatz dazu finden Lizard-Nacol et al. (1997) lediglich eine Korrelation zwischen einem LOH innerhalb p53 und negativen Östrogenrezeptorstatus. Wir haben 79 Gewebeproben aus unserem Kollektiv auf ein LOH untersucht. Um den Anteil nicht informativen Proben zu verringern, haben wir zwei Marker für polymorphe Mikrosatelliten verwendet: zum einen einen Alurep Primer, der innerhalb des Intron 1 des p53-Gens liegt, und zum anderen D17S261. Shaw et al. (1996) vermuten, dass Mikrosatelliten-Instabilitäten frühe Ereignisse in der Tumorgenese des Mammakarzinoms sind. Beide Primerpaare erreichten eine Heterozygotenhäufigkeit im Normalgewebe von 57%. 29% (23) der 79 Patientinnen, bzw. 49% (23) der informativen Fälle, hatten für mindestens einen Primer ein LOH. Beim Mammakarzinom variiert die LOH Häufigkeit für verschiedene Loci zwischen 20% und 79% (Niederacher et al., 1997). Wir konnten weder einen Effekt des LOHs auf die Gesamtüberlebenszeit noch auf die rezidivfreie Überlebenszeit feststellen.

Thoralcius et al. (1995) beschreiben an 106 Brustkrebspatientinnen, dass 71% der Tumoren, die p53 überexprimierten, auch ein LOH aufwiesen. Für 39% der Tumoren mit LOH konnte allerdings keine p53 Überexpression nachgewiesen werden. In unserer Untersuchung fand sich keine Übereinstimmung zwischen einem LOH und der immunhistochemischen p53 Überexpression mit DO-1. Auffallend war lediglich, dass entgegen unseren Erwartungen nicht informative LOH Analysen häufiger mit einem immunhistochemisch negativen p53 Status einhergingen, als heterozygote Tumoren und Tumoren mit einem LOH. Diese Beobachtung lässt sich aber auf die kleinen Fallzahlen in den einzelnen Untergruppen zurückführen. Auch Thompson et al. (1992) konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen p53 Überexpression und einem LOH eruieren. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, dass fast jede Studie andere Antikörper für die Immunhistochemie und verschiedene Orte für die LOH-Detektion wählt.

Zusammenfassend erscheint in dieser Studie die nukleäre p53 Expression von größerer prognostischer Relevanz zu sein, als die LOH-Analyse.

5 Literaturverzeichnis

Baas IO, Mulder JW, Offerhaus JA, Vogelstein B, Hamilton SR (1994). An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms.

J. Pathol. **172**, 5-12

Baker JF (1996). A review of the importance of the p53 gene in cancer research.

<http://members.aye.net/~jfbaker/p53.html>

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B (1989). Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas.

Science **244**, 217-221

Balz V (1997). Parallele Mutationsanalyse der Tumorsuppressorgene BRCA1, p53 und TSG101 für Mammakarzinomfamilien.

Naturwissenschaftliche Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Barbareschi M (1996). Prognostic value of the immunohistochemical expression of p53 in breast carcinomas.

Appl. Immunohistochem. **4**, 106-116

Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Mills RR (1992a). Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma. An important new independent indicator of prognosis?

Hum. Pathol. **24**, 469-476

Barnes DM, Hanby AM, Gillett CE, et al. (1992b). Abnormal expression of wild type p53 protein in normale cells of a cancer family patient.

Lancet **340**, 259-263

Beckmann MW, Picard F, An HX, van Roeyen CR, Dominik SI, Mosny DS, Schnurch HG, Bender HG, Niederacher D (1996). Clinical impact of detection of loss of heterozygosity of BRCA1 and BRCA2 markers in sporadic breast cancer.

Br. J. Cancer **73**, 1220-1226

Bente C (noch nicht veröffentlicht).

Medizinische Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ (1997). C-erbB-2, p53, and nm23 gene product expression in breast cancer in young women: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation.

Hum. Pathol. **29**, 323-329

Bodner S, Minna JD, Jensen SM, D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Fedorko I, Buchhagen DL, Nau MM, Gazdar AF (1992). Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation.

Oncogene **7**, 743-749

Bojar H, Schmoor C, Sauerbrei A, Zumschilde A, Struse K, Schumacher M, Bastert G (noch nicht veröffentlicht). Prognostic impact of HER2/neu overexpression in node-positive breast cancer patients treated with CMF – results of a standardized GBSG trial.

Brachmann DG, Beckett M, Graves D, Haraf D, Vokes E, Weichselbaum RR (1993). p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines.

Cancer Res. **53**, 3667-3669

Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M, Karlan B, Slamon DJ (1996). DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical analysis are required to detect all known p53 alterations in human malignancies.

Oncogene **13**, 1971-1981

Catoretto S, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D (1988). P53 expression in breast cancer.

Int. J. Cancer **41**, 178-183

Chen LC, Neubauer A, Kurisu W et al. (1991). Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 17 is associated with high proliferative capacity and DNA aneuploidy in primary human breast cancer.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**, 3874-3851

Chumakov PM et al. (1991). New nucleotide sequence data on the EMBL File Server.

Nucl. Acid Res. **19**, 4804

Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, van den Broek L, Sahmond TM, van de Vijver MJ (1998). p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer.

J. Clin. Oncol. **16**, 121-127

Cote RJ, Esrig D, Groshen S, Jones PA, Skinner DG (1997). p53 and treatment of bladder cancer.

Nature **385**, 123-125

Cunningham JM, Ingle JN, Jung SH, Cha SS, Wold LE, Farr G, Witzig TE, Kroog JE, Wieand HS, Kovach JS (1994). P53 gene expression in node-positive breast cancer: relationship to DNA ploidy and prognosis.

J. Natl. Cancer Inst. **86**, 1871-1873

Dahm-Daphi J (2000). p53: biology and role of cellular radiosensitivity.

Strahlenther. Onkol. **176**, 278-285

Daly MJ, Lincoln SE, Lander ES (1991). „Primer“, unpublished software, Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research.

Erhältlich unter <http://www-genom.wi.edu/pub/software/primer05>.

DeLeo AB, Jay G, Apella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ (1979). Detection of transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76**, 2420-2424

Dogliani C, Barbareschi M, Pelosio P (1995). Immunohistochemistry on tumor suppressor gene products.

Surg. Pathol. **6**, 129-146

Dowell SP, Hall PA (1995). The p53 tumour suppressor gene and tumour prognosis: is there a relationship?

J. Pathol. **177**, 221-224

Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M (1984). Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells.

Nature **312**, 646-649

Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**, 8763-8767

Fields S, Jang SK (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53.

Science **249**, 1046-1049

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation.

Cell **57**, 1083-1093

Fisher ER, Anderson S, Redmont C, Fisher B (1993). Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project protocol B-06: 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants.

Cancer **71**, 2507-2514

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ (2000). Prognostic factors in breast cancer.

Arch. Pathol. Lab. Med. **124**, 966-978

Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W (1993). Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer.

Cancer **72**, 3641-3647

Futreal PA, Barrett JC, Wiseman RW (1991). An Alu polymorphism intragenic to the TP53 gene.

Nucl. Acids Res. **19**, 6977

Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Palma PD, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F (1994). Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma.

J. Clin. Oncol. **12**, 454-466

Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C, Palma PD, Mauri FA, Boracchi P, Bevilacqua P, Caffo O, Morelli L, Verderio P (1995). Expression of Bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node-positive breast cancer.

Clin. Cancer Res. **1**, 189-198

Girod SC, Kaupe M, Pfeiffer P, Pape HD (1998). p53 als Biomarker in der Radiotherapie der Mundhöhlenkarzinome.

Mund Kiefer Gesichts Chir. **2**, 11-13

Haerslev T, Jacobsen GK (1995). An immunohistochemical study of p53 protein with correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen, and prognosis.

Hum. Pathol. **26**, 295- 301

Hall PA, Lane DP (1994). P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?-revisted!

J. Pathol. **172**, 1-4

Hampel M, Hampel JA, Reiss G, Schackert G, Saeger H-D, Schackert HK (1999). Loss of heterozygosity accumulation in primary breast carcinomas and additionally in corresponding distant metastases is associated with poor outcome.

Clin. Cancer Res. **5**, 1417-1425

Hinds PW, Finlay CA, Frey AB, Levine AJ (1987). Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc 70, in p53-plus-ras-transformed cell lines.

Mol. Cell. Biol. **7**, 2863-2869

Hinds PW, Finlay CA, Levine AJ (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation.

J. Virol. **63**, 739-746

Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53.

Cell **71**, 875-886

Hupp TR (1999). Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways.

Cell. Mol. Life Sci. **55**, 88-95

Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL (1990). Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer.

Lancet **335**, 675- 679

Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP (1992). Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients.

J. Natl. Cancer Inst. **84**, 1109-1114

Jacquemier J, Molès JP, Penault-Llorca F, Adélaide J, Torrente M, Viens P, Bierbaum D, Theillet C (1994). p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results.

Br. J. Cancer **69**, 846-852

Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmüller L, Grosse F, Deppert W (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity.

Cell. Mol. Life Sci. **55**, 12-27

Jenkins JR, Rudge K, Currie GA (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53.

Nature **312**, 651-654

Kato T, Kimura T, Miyakawa R, Fujii A, Yamamoto K, Kameoka S, Nishikawa T, Kasajima T (2000). Clinicopathologic study associated with long-term survival in Japanese patients with node-negative breast cancer.

Br. J. Cancer **82**, 404-411

Kelsell DP, Spurr NK, Barnes DM, Gusterson B, Bishop DT (1996). Combined loss of BRCA1/BRCA2 in grade 3 breast carcinomas.

Lancet **347**, 1554-1555

Koechli OR, Schaer GN, Seifert B, Hornung R, Haller U, Eppenberger U, Mueller H (1994). Mutant p53 protein associated with chemosensitivity in breast cancer specimen.

Lancet **344**, 1647-1648

Kovach JS, Hartmann A, Blaszyk H, Cunningham J, Schaid D, Sommer SS (1996). Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**, 1093-1096

Kreienberg (2000). Einführung.

Onkologie **23**, Suppl. 2, 1-2

Lane DP, Crawford L (1979). T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells.

Nature **278**, 261-263

Lane DP, Ben-Chimol S (1990). p53: oncogene or anti-oncogene?

Genes Dev. **4**, 1-8

Lane DP (1992). p53, Guardian of the genome.
Nature **358**, 15-16

Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991). The p53 tumour suppressor gene.
Nature **351**, 453-456

Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Wu M, Welsh D (1994). The 1993 Walter Huber Lecture: the role of p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis.
Br. J. Cancer **69**, 409-416

Levine AJ (1995). The p53 tumour suppressor gene.
Helix, Amgen's Magazine of Biotechn. **2**, 18-25

Linzer DIH, Levine AJ (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.
Cell **17**, 43-52

Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, Syriänen S, Syriänen K (1993). p53 protein expression in breast cancer as related to histopathologic characteristics and prognosis.
Int. J. Cancer **55**, 51-56

Lizard-Nacol S, Riedinger JM, Lizard G, Glasser A-L, Coudray N, Chaplain G, Guerrin J (1997). Loss of heterozygosity at the tp53 gene: independent occurrence from genetic instability events in node-negative breast cancer.
Int. J. Cancer **72**, 599-603

Louis DN, von Deimling A, Seizinger BR (1992). A (CA)_n dinucleotide repeat assay for evaluating loss of allelic heterozygosity in small and archival human brain tumor specimens.
Am. J. Pathol. **141**, 777-782

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents.
Cell **74**, 957-967

MacGrogan G, Boinchon F, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Aurill A, Coindre JM (1995). Prognostic value of p53 in breast invasive ductal carcinoma: an immunohistochemical study on 942 cases.

Breast Cancer Res. Treat. **36**, 71-81

Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Allred C (1995). p53 protein overexpression and chemosensitivity in breast cancer.

Lancet **345**, 1181-1182

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friens SH (1990). Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms.

Science **250**, 1233-1238

Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Diella F, Camani D, Cecchetti D, Squartini F, Callahan R, Bistocchi M (1993). p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma.

Cancer Res. **53**, 4665-4669

Marchetti A, Buttitta F, Girlando S, Dalla Palma P, Pellegrini S, Fina P, Doglioni C, Benlacqua G, Barbareschi M (1995). Mdm2 gene alterations and mdm2 protein overexpression in breast carcinomas.

J. Pathol. **175**, 31-38

Martius G, Breckwoldt M, Pfleiderer A (1996). Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage, 534-545

McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA (1993). The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantitation of cell proliferation associated antigens.

Histopathology **22**, 543-548

Midulla C, de Iorio P, Nagar C, Pisani T, Cenci M, Valli C, Nofroni I, Vecchione A (1999). Immunohistochemical expression of p53, nm23-H1, Ki67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer.

Anticancer Res. **19**, 4033-4038

Nagai MA, Medeiros AC, Brentani MM, Brentani RR, Marque LA, Mazoyer S, Mulligan LM (1995). Five distinct deleted regions on chromosome 17 defining different subsets of human primary breast tumors.

Oncology **52**, 448-453

Niederacher D, Picard F, van Roeyen C, An H-X, Bender HG, Beckmann MW (1997). Patterns of allelic loss on chromosome 17 in sporadic breast carcinomas detected by fluorescent-labeled microsatellite analysis.

Genes Chromosomes Cancer

Oren M, Rotter V (1999). Introduction: p53 – the first twenty years.

Cell. Mol. Life Sci. **55**, 9-11

Oren M, Levine AJ (1983). Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**. 56-59

Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, Hennesy C, Lennard TJW, Angus B, Horne CHW (1991). p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study.

J. Pathol. **164**, 75-81

Ozbun MA, Butel JS (1995). Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis.

Adv. Cancer Res. **66**, 71-141

Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V (1984). Cooperation between the gene encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation.

Nature **312**, 649-651

Petty DR, Cree AI, Sutherland AL, Hunter ME, Lane PD, Preece EP, Andreotti EP (1994). Expression of the p53 tumor suppressor gene product is a determinant of chemosensitivity.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **199**, 264-270

Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjänen K (1995).

Expression of p53 protein has no independent prognostic value in breast cancer.

J. Pathol. **177**, 225-232

Remmele W, Stenger HE (1986). Immunohistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (ERICA) in Mammakarzinomgewebe: Vorschlag zur einheitlichen Formulierung des Untersuchungsbefundes.

Dtsch. Ärztebl. **83**, 3362-3364

Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L (1995). p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis.

J. Clin. Oncol. **13**, 821-830

Rozan S, Vincent –Salomon A, Zafrani B, Validire P, De Cremoux P, Bernoux A, Nieruchalski M, Fourquet A, Clough K, Dieras V, Pouillart P, Sastre-Garau X (1998). No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer.

Int. J. Cancer **79**, 27-33

Schauer A, Marx D, Schauer M, Binder C, Kuhn W, Meden H (1998). Breast preserving surgery decision making.

Anticancer Res. **18**, 2107-2138

Schlegel U (1994). p53: Wichtigstes oder am meisten überschätztes Tumorgen?

Laryngo-Rhino-Otol. **73**, 651-653

Schünemann, Possinger, Scheidel, Willich (1995). Gynäkologische Malignome, Tumorthherapie und Nachsorge bei Mamma- und Genitalmalignomen.

W. Zuckschwerdt Verlag, München 6. Auflage

Shaulsky G, Ben-Ze'ev A, Rotter V (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle.

Oncogene **5**, 1707-1711

Shaw JA, Walsh T, Chapell SA, Carey N, Johnson K, Walker RA (1996). Microsatellite instability in early sporadic breast cancer.

Br. J. Cancer **73**, 1393-1397

Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, Veneroni S, Boracchi P, Capeeletti V, di Fronzo G, Veronesi V (1993). p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative cancer patients.

J. Natl. Cancer Inst. **85**, 965-970

Seshadri R, Leong AS-Y, McCaul K, Firgaira FA, Setlur V, Horsfall DJ (1996). Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis.

Int. J. Cancer **69**, 135-141

Stal O, Sullivan S, Wingren S, Skoog L, Carstensen JM, Nordenskjöld B (1995). c-erbB-2 expression and benefit from adjuvant chemotherapy and radiotherapy of breast cancer.

Europ. J. Cancer **31A**, 2185-2190

Stenmark-Askmal M, Stal O, Olsen K, Nordenskjöld B and the south-east sweden breast cancer group (1995). P53 as a prognostic factor in stage I breast cancer.

Br. J. Cancer **72**, 715-719

Stratton MR, Collins N, Lakhani S, Sloane J (1995). Loss of heterozygosity in ductal carcinoma in situ of the breast.

J. Pathol. **175**, 195-201

Struse K, Audretsch W, Rezai M, Pott G, Bojar H (2000). The estrogen receptor paradox in breast cancer: association of high receptor concentrations with reduced overall survival.

Breast J. **6**, 115-125

Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, Prosser J, Chetty U, Carter DC, Evans HJ, Steel CM (1992). p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinic-pathological parameters.

Int. J. Cancer **50**, 528-532

Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, Barcos M, Cirrincione C, Edgerton S, Allred C, Norton L, Edison TL (1998). erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer.

J. Natl. Cancer Inst. **90**, 1346-1360

Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Lynch HT, Marcus JN, Schwarz L, Chen LC, Mayall BH (1992). Accumulation of p53 tumor suppressor protein: an independent marker in breast cancers.

J. Natl. Cancer **84**, 845-855

Thorlacius S, Thorgilsson B, Björnsson J, Tryggvadottir L, Börresen A-L, Ögmundsdottir HM, Eyfjörd JE (1995). TP53 mutations and abnormal p53 protein staining in breast carcinomas related to prognosis.

Europ. J. Cancer **11**, 1856- 1861

Tumorzentrum München. Projektgruppe Mammakarzinom: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge (1998).

Schriftenreihe des Tumorzentrum München, 7. Auflage

Von der Haar J (2000). Das Tumorsuppressorgen p53 beim Mammakarzinom - seine prognostische Bedeutung und sein möglicher prädiktiver Wert für die Strahlentherapie. Medizinische Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Wallace-Brodeur RR, Lowe SW (1999). Clinical implications of p53.

Cell. Mol. Life Sci. **54**, 64-75

Wang Y, Reed M, Wang P, Stenger JE, Mayr G, Anderson ME, Schwedes JF, Tegtmeyer P (1993). p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding sites.

Genes Dev. **7**, 2575-2586

Weber JL, Kwitek AE, May PE, Wallace R, Collins FS, Ledbetter DH (1990). Dinucleotide repeat polymorphisms at the D17S250 and D17S261 loci.

Nucl. Acids Res. **18**, 4640

Yang X, Russo IH, Huang Y, Russo J (1997). Microsatellite instability of D17S513 on chromosome 17 is associated with progression of breast cancer.

Int. J. Oncol. **11**, 41-46

6 Lebenslauf

Persönliche Daten	Nina Lüttgen Rolander Weg 9 40629 Düsseldorf geboren am 8. Juni 1974 in Düsseldorf	
Schulbildung	1980-1984	St. Franziskus-Grundschule, Düsseldorf
	1984-1993	Leibniz-Gymnasium, Düsseldorf
Hochschulbildung	1993-2000	Studium der Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Famulaturen	1996	Praxis Dr. med. K. Wegner, Düsseldorf Arzt für Innere Medizin, Lungen- und Bronchialheilkunde
	1996	Gynäkologie und Geburtshilfe Addington Hospital, Durban, Südafrika
	1997	Anästhesiologie, Operative Intensiv- und Schmerztherapie Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
	1998	Augenheilkunde Marien-Hospital Düsseldorf
Praktisches Jahr	1999-2000	
	1. Tertial	Neurologie Klinikum Krefeld
	2. Tertial	Innere Medizin Klinikum Krefeld
	3. Tertial	Chirurgie Victoria Hospital, Kapstadt, Südafrika
Prüfungen	1995	Ärztliche Vorprüfung
	1996	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	1999	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	2000	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Ärztliche Tätigkeit	2000-2002	ÄIP Neurologie Klinikum Krefeld
	seit 2002	Assistenzärztin Neurologie, Klinikum Krefeld

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bojar danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und Betreuung der Arbeit.

Bei Frau Dr. Balz möchte ich mich für die großzügige Unterstützung, zahlreichen Anregungen und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit herzlich bedanken.

Mein Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern des Instituts für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des weiteren danke ich Frau Dr. Schmoor vom Institut für Medizinische Biometrie und Medizinische Informatik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, für die statistische Auswertung der Daten.

Noch vielen anderen ist zu danken. Sie sind hier eingeschlossen.

8 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Bedeutung des Tumorsuppressorgens p53 mittels Immunhistochemie und LOH-Detektion (loss of heterozygosity) untersucht.

Die immunhistochemische Untersuchung wurde mit dem monoklonalem Antikörper DO-1 durchgeführt. Es wurde Paraffin-eingebettetes Gewebe von 174 nodal positiven Mammakarzinompatientinnen der Therapiestudien 2 und 3 der German Breast-Cancer Study Group (GBSB) analysiert. Alle Patientinnen erhielten nach einer modifizierten radikalen Mastektomie nach Patey mit axillärer en bloc Lymphknotendisektion drei oder sechs Zyklen CMF (500 mg/m² Cyclophosphamid, 40 mg/m² Methotrexat, 600 mg/m² Fluorouracil). Einige Patientinnen wurden zusätzlich mit Tamoxifen oder einer Strahlentherapie behandelt. Die mittlere Nachbeobachtungszeit bezüglich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens betrug zehn beziehungsweise neun Jahre.

Eine p53 Überexpression (nukleare Akkumulation) konnte in 18% (32 von 174) der Mammakarzinome beobachtet werden. Auffällig häufig war eine p53 Überexpression mit negativem Östrogenrezeptor (72%) und negativem Progesteronrezeptor (84%) assoziiert. Weiterhin beobachteten wir eine p53 Überexpression häufiger bei großen Tumoren, ungünstigem Grade und hoher Anzahl befallener Lymphknoten. Bei univariater Analyse fand sich eine statistisch schwach signifikante, negative Korrelation zum Gesamtüberleben ($p=0.0487$). Eine unabhängige prognostische Bedeutung einer p53 Überexpression konnte jedoch nicht gefunden werden. Nach der Adjustierung für die Standardfaktoren (Alter der Patientin, Menopausenstatus, Anzahl befallener Lymphknoten, Tumorgroße, histologischer Grade, Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor) bestand weder zur rezidivfreien noch zur Gesamtüberlebenszeit eine signifikante Beziehung. Als unabhängige prognostische Faktoren zeigten sich nur das Alter (mit einem Schwellenwert von 40 Jahren), die Anzahl der befallenen Lymphknoten, die Tumorgroße und der Progesteronrezeptorstatus.

Für die LOH-Detektion wurden zwei Primerpaare für polymorphe Mikrosatelliten verwendet: ein Alurep Primer, der innerhalb des Intron 1 des p53-Gens liegt und D17S261. Es wurden 79 Proben auf ein LOH durchmustert. Bei 49% (23) der informativen Fälle konnte mindestens ein LOH nachgewiesen werden. Ein Effekt des LOHs auf die Gesamtüberlebenszeit oder rezidivfreie Überlebenszeit konnte nicht festgestellt werden. Es fand sich auch keine Beziehung zwischen LOH und p53 Überexpression.

In dieser Studie von 174 nodal positiven, mit CMF therapierten Mammakarzinompatientinnen erwiesen sich die etablierten Standardfaktoren von größerer prognostischer Bedeutung als LOH und immunhistochemischer p53 Status.

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Bedeutung des Tumorsuppressorgens p53 mittels Immunhistochemie und LOH-Detektion (loss of heterozygosity) untersucht.

Die immunhistochemische Untersuchung wurde mit dem monoklonalem Antikörper DO-1 durchgeführt. Es wurde Paraffin-eingebettetes Gewebe von 174 nodal positiven Mammakarzinompatientinnen der Therapiestudien 2 und 3 der German Breast-Cancer Study Group (GBSB) analysiert. Alle Patientinnen erhielten nach einer modifizierten radikalen Mastektomie nach Patey mit axillärer en bloc Lymphknotendisektion drei oder sechs Zyklen CMF (500 mg/m² Cyclophosphamid, 40 mg/m² Methotrexat, 600 mg/m² Fluorouracil). Einige Patientinnen wurden zusätzlich mit Tamoxifen oder einer Strahlentherapie behandelt. Die mittlere Nachbeobachtungszeit bezüglich des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens betrug zehn beziehungsweise neun Jahre.

Eine p53 Überexpression (nukleare Akkumulation) konnte in 18% (32 von 174) der Mammakarzinome beobachtet werden. Auffällig häufig war eine p53 Überexpression mit negativem Östrogenrezeptor (72%) und negativem Progesteronrezeptor (84%) assoziiert. Weiterhin beobachteten wir eine p53 Überexpression häufiger bei großen Tumoren, ungünstigem Grade und hoher Anzahl befallener Lymphknoten. Bei univariater Analyse fand sich eine statistisch schwach signifikante, negative Korrelation zum Gesamtüberleben ($p=0.0487$). Eine unabhängige prognostische Bedeutung einer p53 Überexpression konnte jedoch nicht gefunden werden. Nach der Adjustierung für die Standardfaktoren (Alter der Patientin, Menopausenstatus, Anzahl befallener Lymphknoten, Tumorgroße, histologischer Grade, Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor) bestand weder zur rezidivfreien noch zur Gesamtüberlebenszeit eine signifikante Beziehung. Als unabhängige prognostische Faktoren zeigten sich nur das Alter (mit einem Schwellenwert von 40 Jahren), die Anzahl der befallenen Lymphknoten, die Tumorgroße und der Progesteronrezeptorstatus.

Für die LOH-Detektion wurden zwei Primerpaare für polymorphe Mikrosatelliten verwendet: ein Alurep Primer, der innerhalb des Intron 1 des p53-Gens liegt und D17S261. Es wurden 79 Proben auf ein LOH durchmustert. Bei 49% (23) der informativen Fälle konnte mindestens ein LOH nachgewiesen werden. Ein Effekt des LOHs auf die Gesamtüberlebenszeit oder rezidivfreie Überlebenszeit konnte nicht festgestellt werden. Es fand sich auch keine Beziehung zwischen LOH und p53 Überexpression.

In dieser Studie von 174 nodal positiven, mit CMF therapierten Mammakarzinompatientinnen erwiesen sich die etablierten Standardfaktoren von größerer prognostischer Bedeutung als LOH und immunhistochemischer p53 Status.

