

Aus dem Institut für Onkologische Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Bojar

Molekulare Faktoren für die Prognose von Mammakarzinomen und die  
Responsekalkulation unter Anthrazyklin - basierter Chemotherapie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tim Ripplinger

2005

2005

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

gez.: Prof. Dr. med. Wolfgang H. M. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. H. Bojar

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Schmitt

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	4
<b>2. Material und Methoden</b>	6
<b>2.1 Verwendete Abkürzungen und Symbole</b>	6
<b>2.2 Patienten</b>	7
2.2.1 Gesamtkollektiv	7
2.2.2 Neoadjuvantes Kollektiv	9
<b>2.3 Untersuchungsmaterial</b>	12
2.3.1 Entnahme und Transport des Untersuchungsmaterials	12
<b>2.4 Durchgeführte Untersuchungen</b>	13
2.4.1 Immunhistochemische Bestimmung der folgenden Prognosefaktoren durch monoklonale Antikörper:	13
- Östrogenrezeptor (ER-ICA)	
- Progesteronrezeptor (PgR-ICA)	
- P-53-Tumorsuppressorgen	
- Her2/neu-Proto-Onkogen	
- Bcl-2-Antigen	
- Nm23-Tumorsuppressorgen	
- Ki-67-Antigen	
2.4.1.1 Reagenzien	13
2.4.1.2 Immunhistochemisches Färbeverhalten	23
2.4.1.3 Auswertung	27
<b>2.5 Statistik</b>	28
<b>3. Ergebnisse</b>	29
<b>3.1 Gesamtkollektiv</b>	29
<b>3.2 Neoadjuvantes Kollektiv</b>	36
<b>4. Diskussion</b>	44
<b>5. Zusammenfassung</b>	49
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	51
<b>7. Lebenslauf</b>	54
<b>8. Danksagung</b>	55

## 1. Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Alleine in der Bundesrepublik werden jährlich 45.000 neue Erkrankungen beobachtet. In den letzten Jahrzehnten ist deutlich geworden, dass es sich bei dieser Erkrankung häufig nicht um ein lokal begrenztes, sondern um ein systemisches Geschehen handelt. Dementsprechend wendete man sich von dem zunächst rein chirurgischen Vorgehen ab, da sich auch durch eine radikalere lokal-chirurgische Sanierung die Gesamtüberlebenszeiten kaum veränderten. Es wurde versucht, andere Therapiestrategien zu entwickeln, um die Prognose der Patientinnen zu verbessern.

Sowohl das postoperative, adjuvante, als auch das neoadjuvante Therapiekonzept, bei dem sowohl prä- als auch postoperativ systemisch mit Chemotherapeutika behandelt wird, haben sich in der Vergangenheit bei der Behandlung des Mammakarzinoms etabliert und zu einem deutlichen Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen geführt.

Einer der Vorteile einer neoadjuvanten Chemotherapie besteht darin, dass durch sie häufig eine präoperative Tumorverkleinerung und somit oft eine brusterhaltende Operation erreicht werden kann.

Da in klinischen Studien keine wesentlichen Unterschiede im Gesamtüberleben zwischen den beiden Patientengruppen offenkundig wurden, kann eine neoadjuvante Therapie zusätzlich als eine „in vivo“ Chemosensitivitätstestung dienen, ohne gleichzeitig ein erhöhtes Risiko darzustellen (1,2).

Im Zuge dieser Therapien ist es immer wichtiger geworden, möglichst früh eine Aussage über das Ansprechen der Tumoren auf verschiedene Therapiemodalitäten treffen zu können. Um dies zu erreichen, versucht man Parameter zu finden, die unabhängig oder in Verbindung mit anderen Faktoren schon vor der eigentlichen Behandlung Schlussfolgerungen über den zu erwartenden Erfolg einer Therapie erlauben, um so die effizienteste Behandlung auswählen zu können.

Neben der Einteilung in die TNM-Klassifikation (13) sind die Steroidhormonrezeptoren mittlerweile als Prognosefaktoren etabliert. Es zeigte sich, dass östrogen- und progesteronpositive Tumoren insgesamt eine höhere Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit haben und dieser Effekt auch über Jahre nachweisbar bleibt (3-5).

Inzwischen haben sich weitere Faktoren herauskristallisiert, mit deren Hilfe man versucht, die Prognose vorherzusagen. Dies sind zum Beispiel tumorbiologische Faktoren, wie Proto-Onkogene oder Tumorsuppressorgene bzw. zellkinetische Parameter, zu denen unter anderem die Proliferationsmarker zählen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einerseits die Einflüsse verschiedener molekularer Faktoren auf das Gesamtüberleben der Patientinnen mit einem Mammakarzinom aufzuzeigen andererseits Parameter zu ermitteln, die anhand der Tumorbiologie vor dem Beginn der Therapie Rückschlüsse auf das Responseverhalten des jeweiligen Karzinoms unter einer neoadjuvanten Chemotherapie zulassen.

Dazu wird im zugrundeliegenden Gesamtkollektiv von insgesamt 352 Patientinnen der Einfluss der Faktoren Östrogen- , Progesteronrezeptor, p53-Tumorsuppressorgen, Her2/neu-Proto-Onkogen, nm23-Tumorsuppressorgen und Ki-67-Proliferationsmarker auf die Gesamtüberlebenschance untersucht.

Darüber hinaus haben wir in unserem neoadjuvanten Kollektiv von insgesamt 104 Patientinnen die tumorbiologischen Faktoren bcl-2, Her2/neu sowie Ki-67, die in verschiedenen anderen Arbeiten im Zusammenhang mit dem Responseverhalten unter neoadjuvanter Chemotherapie diskutiert werden, zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung durch eine Jetnadelbiopsie untersucht und mit dem histopathologischen Ergebnis bei der an die präoperativ durchgeführte Chemotherapie mit anthrazyklinhaltigen Chemotherapiekombinationen anschließenden Sanierungsoperation korreliert.

Eine weitere Frage war, ob eine Kombination der neoadjuvanten Chemotherapie mit einer präoperativen Radiotherapie zu einer Änderung des Responseverhaltens führt.

Es besteht nicht selten eine deutliche Diskrepanz zwischen der klinischen Beurteilung des Ansprechens der Tumorgröße auf eine neoadjuvante Therapie und der histologischen Remissionsrate.

In vielen Studien hat sich die histopathologisch gesicherte Komplettremission (pCR) als der zuverlässigste Indikator für ein maximales Therapieansprechen unter einer neoadjuvanten Chemotherapie erwiesen. Die Patientinnen mit einer pCR haben eine signifikant bessere Prognose als die Fälle, in denen es nicht zu einer histologischen Komplettremission kommt (2; 6-9).

Deshalb haben wir bei unserer Untersuchung des Responseverhaltens im neoadjuvanten Kollektiv die Patientinnen, deren Tumoren eine histopathologische Komplettremission aufweisen, allen anderen Responseverhalten gegenübergestellt, um dadurch ein möglichst hartes Kriterium für einen Einfluss der untersuchten Faktoren definieren zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Abkürzungen und Symbole

AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
DAB	Diaminobenzidin
ER	Östrogenrezeptor
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pCR	histopathologisch gesicherte Komplettremission
PgR	Progesteronrezeptor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

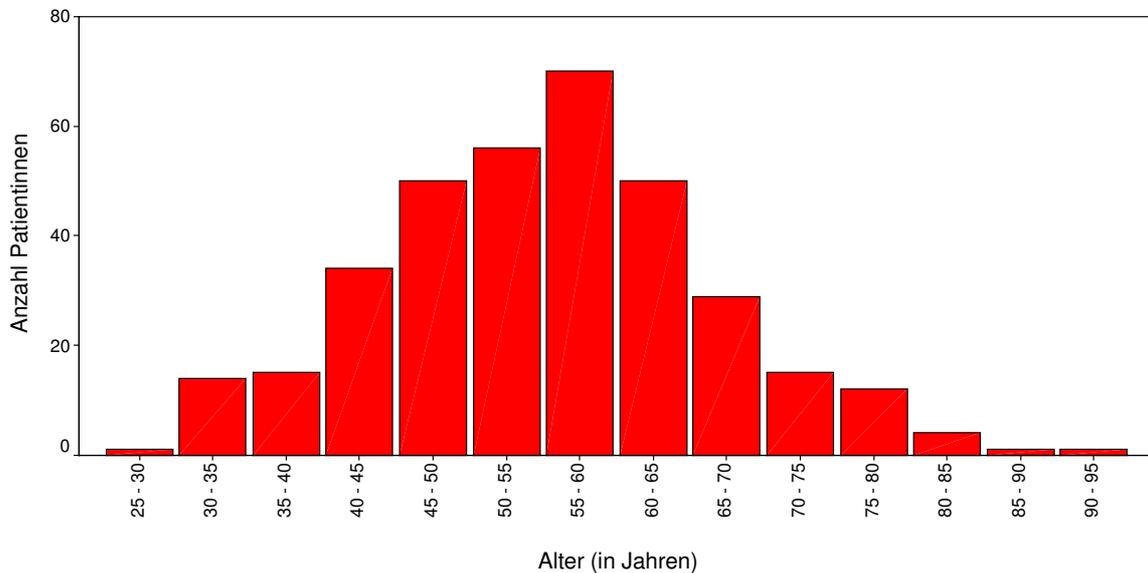
## 2.2 Patienten

Das Gesamtkollektiv dieser Arbeit setzt sich aus 352 Patientinnen zusammen, die sich zwischen dem 04.02.1985 und dem 05.10.2000 in der senologischen Klinik des Luisenkrankenhauses in Düsseldorf oder im Interdisziplinären Brustzentrum der Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf wegen eines neu diagnostizierten invasiven Mammakarzinoms einem operativen Eingriff unterzogen.

### 2.2.1 Gesamtkollektiv

Die 352 Patientinnen des Gesamtkollektivs setzen sich sowohl aus adjuvant (n=202 / 57,4%), als auch aus neoadjuvant (n=150 / 42,6%) therapierten Patientinnen zusammen.

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug für dieses Kollektiv 55,2 Jahre, die jüngste Patientin war zu diesem Zeitpunkt 28, die älteste 93 Jahre alt (Abb. 1).



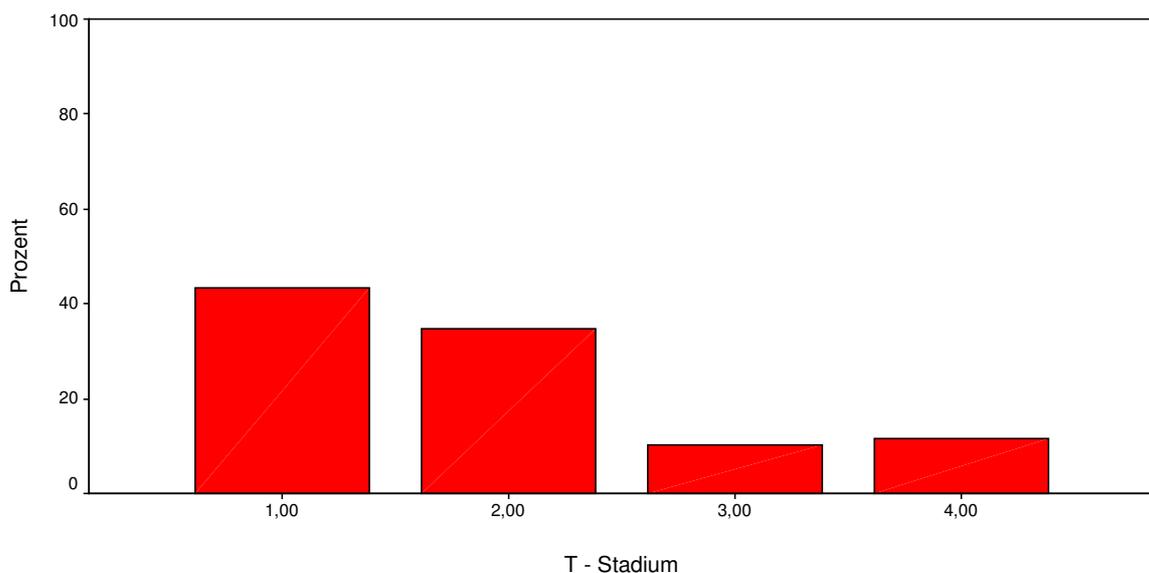
**Abb. 1** Altersverteilung im Gesamtkollektiv, Einteilung in Gruppen á 5 Jahren

Aufgrund teilweise fehlender Angaben zum Menopausenstatus wurde die Gruppe der über 55jährigen Frauen als postmenopausal (n=182 / 51,7%), die der jüngeren Frauen entsprechend als prämenopausal (n=170 / 48,3%) eingestuft.

Die Nachbeobachtungszeit der Patientinnen des Gesamtkollektivs lag im Mittel bei 43 Monaten, maximal bei 201 Monaten.

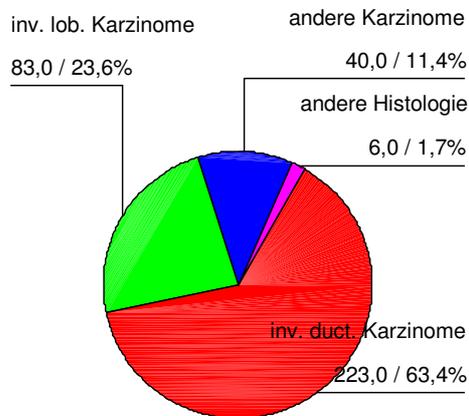
Die Tumorgröße wurde anhand der histopathologischen Angaben der Sanierungsoperation definiert, bei tumorrelevanter präoperativer Therapie sind Angaben aus apparativer Diagnostik eingeflossen, rein klinische Angaben fanden keine Berücksichtigung. Im Gesamtkollektiv betrug der mittlere Tumordurchmesser 2,6 cm mit dem kleinsten Wert von 0,3 cm und dem größten Wert von 15,0 cm.

Gemäß der TNM-Klassifikation (13) lag in 105 Fällen (29,8 %) ein T1-Stadium, in 84 Fällen (23,9 %) ein T2-Stadium, in 25 Fällen (7,1 %) ein T3-Stadium und in 28 Fällen (8,0 %) ein T4-Stadium vor. Bei 110 Patientinnen (31,3 %) gab es keine eindeutigen Informationen zum Tumorstadium.



**Abb.2** Verteilung der Tumorstadien gemäß TNM-Klassifikation in Prozent der untersuchten Fälle

Die Verteilung der verschiedenen Tumorhistologien im Gesamtkollektiv ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3).



**Abb. 3** Histologische Differenzierung der Tumoren des Gesamtkollektivs; Anzahl der Fälle / Prozentsatz der Fälle

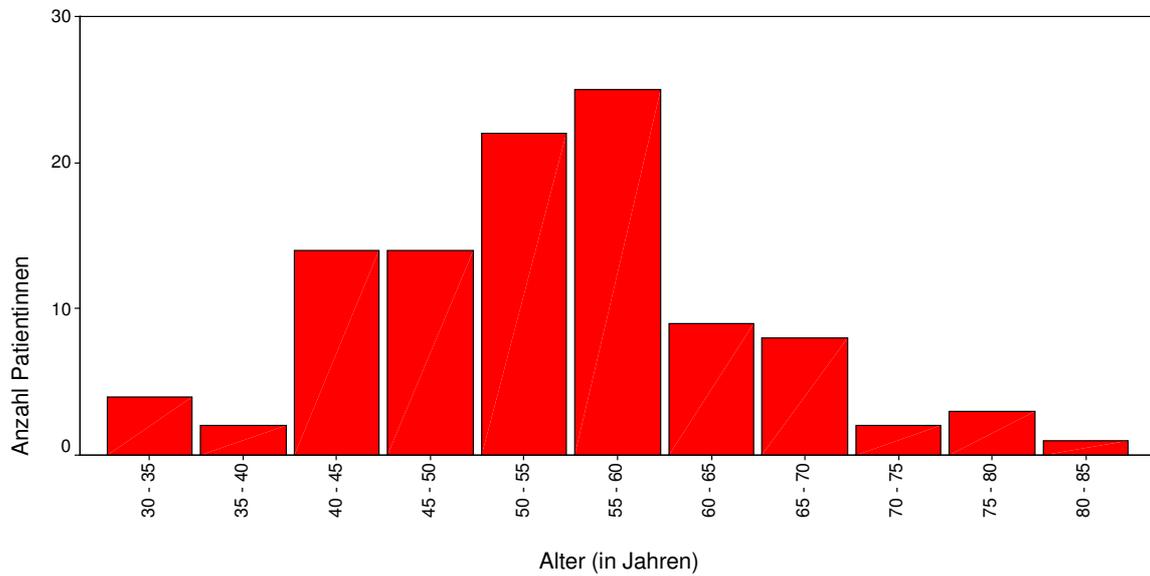
- = invasiv ductales Mammakarzinom
- = invasiv lobuläres Mammakarzinom
- = andere invasive Karzinome
- = andere Histologie

## 2.2.2 Neoadjuvantes Kollektiv

Aus den 150 neoadjuvant therapierten Patientinnen des Gesamtkollektivs erfüllten 104 Fälle die Voraussetzung, dass sie sowohl zum Zeitpunkt der Jetnadelbiopsie, die zur Diagnosesicherung vor der eingeleiteten Chemotherapie diente, als auch bei der Sanierungsoperation über genaue Angaben zur Tumorgroße verfügten. Sie wurden fast ausnahmslos präoperativ mit 4 Zyklen anthrazyklinhaltiger Chemotherapiekombinationen behandelt.

Diese Fälle bilden das neoadjuvante Kollektiv, das dadurch auch auf sein Responseverhalten auf die präoperative Chemotherapie hin untersucht werden konnte.

In dieser Patientengruppe war die jüngste Frau 32, die älteste 82 Jahre alt und das mittlere Alter lag bei 53,9 Jahren (Abb. 3).

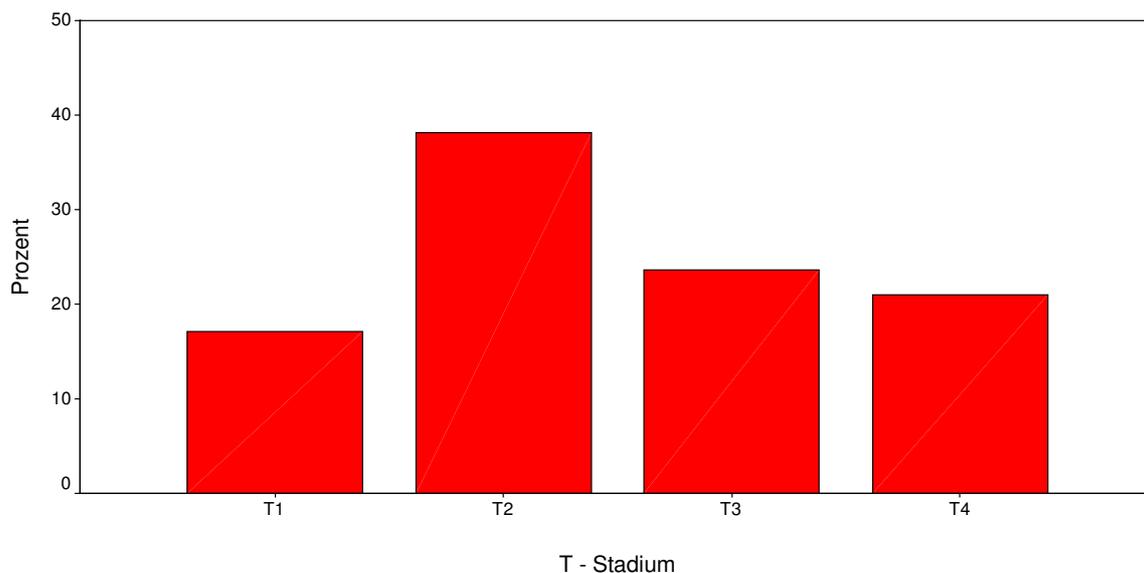


**Abb. 3** Altersverteilung im neoadjuvanten Kollektiv, Einteilung in Gruppen á 5 Jahren

Gemäß der unter Punkt 2.1.1 erläuterten Einteilung setzte sich diese Gruppe aus 48 postmenopausalen (46,2 %) und 56 prämenopausalen (53,8 %) Patientinnen zusammen.

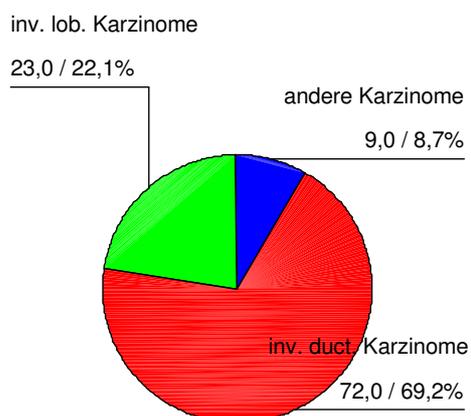
Das neoadjuvante Kollektiv wurde im Mittel 40 Monate nachbeobachtet, der maximale Wert lag bei 112 Monaten.

Die analog zu Punkt 2.1.1 durchgeführte Einteilung in die TNM-Klassifikation (13) ergab in diesem Kollektiv ein T1-Stadium bei 13 Patientinnen (12,5 %), ein T2-Stadium bei 29 Fällen (27,9 %), ein T3-Stadium bei 18 Fällen (17,3 %) und ein T4-Stadium bei 16 Patientinnen (15,4 %) (Abb. 4).



**Abb. 4** Verteilung der Tumorstadien im neoadjuvanten Kollektiv gemäß TNM-Klassifikation in Prozent der untersuchten Fälle

Die Verteilung der verschiedenen Tumorhistologien in dieser Patientengruppe zeigt die folgende Abbildung (Abb. 5).



**Abb. 5** Histologische Differenzierung der Tumoren des neoadjuvanten Kollektivs

- = invasiv ductales Mammakarzinom
- = invasiv lobuläres Mammakarzinom
- = andere invasive Karzinome

## **2.3 Untersuchungsmaterial**

Im folgenden Kapitel wird dargestellt, mit Hilfe welcher Methoden die gewonnenen histologischen Präparate untersucht und eingeteilt worden sind.

Die histopathologische Untersuchung der gewonnenen Proben durch die initiale Jetbiopsie sowie der Operationspräparate des Sanierungseingriffes wurden entweder im Pathologischen Institut des Krankenhauses Gerresheim (Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf) oder im Institut für Pathologie Dres. Westenfelder-Dücker in Neuss durchgeführt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der tumorbiologischen Faktoren fanden im Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. Die der Arbeit zugrunde liegenden Daten rekrutieren sich aus der OncoDataBase dieses Institutes sowie aus den Patientenakten der beteiligten Kliniken.

### **2.3.1 Entnahme und Transport des Untersuchungsmaterials**

#### **Gefriermaterial:**

Sofort nach der Entnahme wird das Tumormaterial unfixiert auf Flockeneis gekühlt und danach in das Institut für Pathologie der Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf bzw. in das Pathologische Institut Dres. Dücker in Neuss weitergeleitet. Unter ununterbrochener Kühlung erfolgt die Aufarbeitung des gewonnenen Materials, indem die Tumoranteile von nekrotischen Anteilen und nicht tumorösem Begleitgewebe getrennt werden. Innerhalb von dreißig Minuten nach operativer Gewinnung wird das Material auf Trockeneis tiefgefroren und an das Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geschickt. Dort wird es nach Lagerung bei  $-80\text{ °C}$  innerhalb von 14 Tagen weiterverarbeitet.

#### **Paraffinmaterial:**

Das unmittelbar nach der Entnahme in Formalin fixierte Material wird an das Institut für Pathologie der Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf am Krankenhaus in Gerresheim transportiert und dort in Paraffin eingebettet.

## **2.4 Durchgeführte Untersuchungen**

### **2.4.1 Immunhistochemische Bestimmung der folgenden Prognosefaktoren durch monoklonaler Antikörper:**

- Östrogenrezeptor (ER-ICA)
- Progesteronrezeptor (PgR-ICA)
- p53-Tumorsuppressorgen
- Her2/neu-Proto-Onkogen
- bcl-2
- nm23-Tumorsuppressorgen
- Ki-67-Antigen

#### **2.4.1.1 Reagenzien**

##### **a) Gefriermaterial**

##### **Östrogenrezeptornachweis:**

ABBOTT ER-ICA Monoklonal Kit

##### **Primärer Antikörper:**

Anti-Human-ER (Ratte, monoklonal)-AK (Mindestkonzentration 0,1 µg/ml) in Phosphatpuffer und Bakterizid

##### **Progesteronrezeptornachweis:**

ABBOTT PgR-ICA Monoklonal Kit

##### **Primärer Antikörper:**

Anti-Human-PgR (Ratte, monoklonal)-AK (Mindestkonzentration 0,1 µg/ml) in Phosphatpuffer und Bakterizid.

### **p53-Tumorsuppressorgennachweis:**

#### Primärantikörper:

Monoklonaler AK-DO-1 (Fa. DIANOVA) (Mindestkonzentration 0,1µg/ml) in Phosphatpuffer und Bakterizid.

### **Gemeinsame Reagenzien bei der immunhistochemischen Bestimmung von Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression sowie beim Nachweis des p53-Tumorsuppressorgens:**

#### Brückenbildender Antikörper:

Anti-Ratten-AK von der Ziege (Mindestkonzentration 0,1 µg/ml) in Phosphatpuffer mit Bakterizid.

#### Blockierendes Reagenz:

Normales Ziegenserum in Phosphatpuffer mit Bakterizid.

#### Kontrollantikörper:

Normaler Ratten-AK (Mindestkonzentration 0,1 µg/ml) in Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator und Bakterizid.

#### Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) - Komplex:

Peroxidase (Meerrettich)-anti-Peroxidase (Ratte)- Komplex (Mindestkonzentration 0,1 µg/ ml) in TRIS-Puffer mit Proteinstabilisator und Bakterizid.

#### Farbstoff:

DAB-Tabletten (Diaminobenzidin · 4 HCl (Fa. ABBOT))

5ml Substratlösung mit einer Spatelspitze Kobaltchlorid, nach vollständiger Lösung: Zugabe von DAB.

#### Substratreagenz:

Citrat-Phosphat-Puffer mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Bakterizid

#### Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

1 Tbl. /100ml (Fa. OXOID); pH 7,4

#### Gewebskleber:

Proteinlösung mit Bakterizid (Fa. ABBOT)

Natriumhypochlorid-Lösung (0,05 %):

1 ml Clorox™ und 100ml H<sub>2</sub>O

Hämatoxylin-Kontrastfärbemittel:

1 ml Harris Hämatoxylin mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen

Aufbewahrungsmedium:

42,8 g Saccharose und 0,7 g Mg Cl<sub>2</sub>, in 250 ml PBS lösen, 250 ml Glycerin hinzufügen und gründlich mischen. Bei -10 bis -20 °C lagern.

**Her2/neu-Proto-Onkogen-Nachweis:**

Primärantikörper:

Anti-Human-c-erbB-2 (Maus, monoklonal) -AK 1:20 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK 1:25 in PBS (Fa. DAKO)

Blockierendes Reagenz:

Hitzeinaktiviertes Humanserum 1:10 in PBS

Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) - Komplex:

Peroxidase(Meerrettich)-anti-Peroxidase (Maus, monoklonal)-IgG-Komplex (FA. DAKO) 1:100

**bcl-2-Antigen:**

Primärantikörper:

Anti-Human-bcl-2 (Maus, monoklonal)-AK (Fa. DAKO) 1:40 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK 1:25 in PBS (Fa. DAKO)

Blockierendes Reagenz:

Hitzeinaktiviertes Humanserum 1:10 in PBS

Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) - Komplex:

Peroxidase (Meerrettich)-anti-Peroxidase (Maus, monoklonal)-IgG-Komplex (FA. DAKO) 1:100

**nm23-Tumorsuppressorgen:**

Primärantikörper:

Anti-Human-nm23 (Maus, monoklonal)-AK (Fa. CALBIOCHEM) 1:20 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK 1:25 in PBS (Fa. DAKO)

Blockierendes Reagenz:

Kaninchenserum 1: 10 in PBS

**Gemeinsame Reagenzien bei der immunhistochemischen Bestimmung der Expression des Her2/neu-Proto-Onkogens, des bcl-2-Antigens und des nm23-Tumorsuppressorgen:**

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

1 Tablette /100ml (Fa. OXOID); pH 7,4

Farbstoff:

DAB-Tabletten (Diaminobenzidin · 4 HCl (Fa. ABBOT))

5ml Substratlösung mit einer Spatelspitze Kobaltchlorid, nach vollständiger Lösung: Zugabe von DAB.

Acetat-Puffer Stammlösung:

46,9 ml konzentrierte Essigsäure (1,05 g/ml) und 24,5 g Natriumacetat · 3 H<sub>2</sub>O mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Acetat-Puffer pH 4,0 Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung mit 400 ml Aqua dest. verdünnen.

Ethylgrün:

0,4 g Ethylgrün (Sigma M-6776), 100ml Acetat-Puffer pH 4,0

n-Butanol

Xylol

**Ki-67-Antigen:**

Primärantikörper:

Anti-Human Ki-67 (Maus, monoklonal)-AK 1:30 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK 1:25 in PBS (Fa. DAKO)

Blockierendes Reagenz:

Kaninchenserum 1: 10 in PBS

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

1 Tablette /100ml (Fa. OXOID); pH 7,4

Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) - Komplex:

Peroxidase (Meerrettich): Anti-Peroxidase (Ratte)- Komplex (Mindestkonzentration 0,1 µg/ml) in TRIS- Puffer mit Proteinstabilisator und Bakterizid.

Farbstoff:

DAB-Tabletten (Diaminobenzidin · 4 HCl (Fa. ABBOT))

5ml Substratlösung mit einer Spatelspitze Kobaltchlorid, nach vollständiger Lösung: Zugabe von DAB.

Acetat-Puffer Stammlösung:

46,9 ml konzentrierte Essigsäure (1,05 g/ml) und 24,5 g Natriumacetat · 3 H<sub>2</sub>O mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Acetat-Puffer pH 4,0 Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung mit 400 ml Aqua dest. verdünnen.

Ethylgrün:

0,4 g Ethylgrün (Sigma M-6776), 100ml Acetat-Puffer pH 4,0

n-Butanol

Xylol

## **b) Paraffinmaterial**

**Reagenz, das bei allen immunhistochemischen Bestimmungen aus Paraffinmaterial zusätzlich benötigt wird:**

Citratpuffer:

14,7g 10mM Tri-Na-Citrat-Dihydrat mit Aqua dest. auf 5000 ml auffüllen, pH auf 6,0 einstellen

**Östrogenrezeptor:**

Primärantikörper:

Anti-Human-ER-Klon 1D5 (Maus, monoklonal) -IgG-AK (Fa. DAKO) 1: 100 in PBS

**Progesteronrezeptor:**

Primärantikörper:

Anti-Human-PgR636 (Maus, monoklonal)-IgG-AK (Fa. DAKO) 1:50 in PBS

**p53-Tumorsuppressorgen:**

Primärantikörper:

ELISA Dia 0301 E (Fa. DIANOVA) 1:100 in PBS

**Gemeinsame Reagenzien bei der immunhistochemischen Bestimmung von Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression sowie beim Nachweis des p53-Tumorsuppressorgens:**

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-F(ab')<sub>2</sub>-AK (Fa. DAKO) 1:350 in BSA/TRIS

Blockierendes Reagenz:

Hitzeinaktiviertes Humanserum

ABC-Komplex:

Streptavidin (Streptomyces avidinii)-Peroxidase (Meerrettich)-Komplex (Fa. DAKO) 1:100

Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) - Komplex:

Peroxidase (Meerrettich): Anti-Peroxidase (Ratte)- Komplex (Mindestkonzentration 0,1 µg/ml) in TRIS- Puffer mit Proteinstabilisator und Bakterizid

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

1 Tablette /100ml (Fa. OXOID); pH 7,4

Farbstoff:

DAB-Tabletten (Diaminobenzidin · 4 HCl (Fa. ABBOT))

5ml Substratlösung mit einer Spatelspitze Kobaltchlorid, nach vollständiger Lösung: Zugabe von DAB.

Acetat-Puffer Stammlösung:

46,9 ml konzentrierte Essigsäure (1,05 g/ml) und 24,5 g Natriumacetat · 3 H<sub>2</sub>O mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Acetat-Puffer pH 4,0 Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung mit 400 ml Aqua dest. verdünnen.

Ethylgrün:

0,4 g Ethylgrün (Sigma M-6776), 100ml Acetat-Puffer pH 4,0

TRIS-Puffer:

8,4g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 1,2g NaCl mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,4 einstellen.

TRIS-HCl:

7,88g Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, 8,77g NaCl und 100µl Triton (0,01%) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,6 einstellen.

2,5 % BSA/TRIS:

TRIS-Puffer 2,5g/100ml TRIS-Puffer und 100mg Na-Acid mit TRIS-HCl auf pH 7,4 einstellen.

n-Butanol

Xylol

**Her2/neu-Proto-Onkogen:**

Primärantikörper:

Anti-Human-c-neu (Maus, monoklonal)-AK (Fa. CALBIOCHEM) 1:60 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK 1:50 in PBS (Fa. DAKO)

Blockierendes Reagenz:

Hitzeinaktiviertes Humanserum 1:1 in PBS

Die übrigen Reagenzien sind analog zu denen, die beim immunhistochemischen Nachweis des Her2/neu-Proto-Onkogens an Gefriermaterial verwendet werden (siehe Punkt 2.4.1.1.a), Seite 15)

**bcl-2-Antigen:**

Primärantikörper:

Anti-Human-bcl-2 (Maus, monoklonal)-AK (Fa. DAKO) 1:20 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-F(ab')<sub>2</sub>-AK (Fa. DAKO) 1:350 in TRIS-HCl

Blockierendes Reagenz:

Hitzeinaktiviertes Humanserum 1:1 in PBS

ABC-Komplex:

Streptavidin (Streptomyces avidinii)-Peroxidase (Meerrettich)-Komplex (Fa. DAKO) 1:100

TRIS-Puffer:

8,4g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 1,2g NaCl mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,4 einstellen.

TRIS-HCl:

7,88g Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, 8,77g NaCl und 100µl Triton (0,01%) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,6 einstellen.

2,5 % BSA/TRIS:

TRIS-Puffer 2,5g/100ml TRIS-Puffer und 100mg Na-Acid mit TRIS-HCl auf pH 7,4 einstellen.

Die übrigen Reagenzien sind analog zu denen, die beim immunhistochemischen Nachweis des bcl-2 an Gefriermaterial verwendet werden (siehe Punkt 2.4.1.1.a), Seite 15 u. 16 )

**nm23-Tumorsuppressorgen:**

Primärantikörper:

Anti-Human-nm23 (Maus, monoklonal)-AK (Fa. CALBIOCHEM) 1:20 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-IgG-AK 1:50 in PBS (Fa. DAKO)

Blockierendes Reagenz:

Hitzeinaktiviertes Humanserum 1:1 in PBS

Die übrigen Reagenzien sind analog zu denen, die beim immunhistochemischen Nachweis des nm23-Tumorsuppressorgens an Gefriermaterial verwendet werden (siehe Punkt 2.4.1.1.a), Seite 16 )

**Ki-67-Antigen:**

Primärantikörper:

Anti-Human-Ki67 (Maus, monoklonal)-AK (Fa. DIANOVA) 1:20 in PBS

Brückenantikörper:

Kaninchen-anti-Maus-F(ab')<sub>2</sub>-AK (Fa. DAKO) 1:350 in TRIS-HCl

Blockierendes Reagenz:

Hitzeinaktiviertes Humanserum 1:1 in PBS

ABC-Komplex:

Streptavidin (Streptomyces avidinii)-Peroxidase (Meerrettich)-Komplex (Fa. DAKO) 1:100

TRIS-Puffer:

8,4g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 1,2g NaCl mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,4 einstellen.

TRIS-HCl:

7,88g Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, 8,77g NaCl und 100µl Triton (0,01%) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,6 einstellen.

2,5 % BSA/TRIS:

TRIS-Puffer 2,5g/100ml TRIS-Puffer und 100mg Na-Acid mit TRIS-HCl auf pH 7,4 einstellen.

Die übrigen Reagenzien sind analog zu denen, die beim immunhistochemischen Nachweis des Ki-67-Antigens an Gefriermaterial verwendet werden (siehe Punkt 2.4.1.1.a), Seite 17 u. 18)

### **2.4.1.2 Immunhistochemisches Färbeverfahren**

#### **a) Gefriermaterial**

##### **Östrogenrezeptor:**

Zuerst werden die 5 µm dicken Gefrierschnitte fixiert. Nach zweimaliger 5-minütiger Inkubation mit PBS wird die endogene Peroxidase mit dem Ziegen Serum 15 Minuten lang in einer feuchten Kammer blockiert. Es folgt dann das Auftropfen des Anti-Human-ER (Ratte, monoklonal)-AK mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten in einer feuchten Kammer. Anschließend werden zwei jeweils 5-minütige PBS-Bäder durchgeführt. Nachdem der brückenbildende Antikörper aufgetropft ist, folgt eine 30-minütige Inkubation des Materials in der feuchten Kammer und anschließend erneut zwei Wäschen im PBS-Bad jeweils über 5 Minuten. Nach Zugabe des PAP-Komplexes wird erneut 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. PBS-Bäder werden wie oben beschrieben durchgeführt. Danach erfolgt die Farbentwicklung mit Chromogensubstratlösung mit einer Inkubationszeit von 6 Minuten und dem anschließenden Absaugen der überschüssigen Lösung mit Natriumhypochlorid.

Nachdem das Untersuchungsmaterial 5 Minuten mit destilliertem Wasser abgespült ist, erfolgt die 5-minütige Gegenfärbung mit verdünntem Hämatoxylin. Abschließend wird das Untersuchungsmaterial 5 Minuten mit Leitungswasser gespült.

Die Fixierung erfolgt jeweils über 2 Minuten mit 95%igem Ethanol, absolutem Ethanol, Xylol und Fixiermedium.

##### **Progesteronrezeptor:**

Analog zum Östrogenrezeptor mit entsprechendem Primärantikörper.

##### **p53-Tumorsuppressorgen:**

Analog zum Östrogenrezeptor mit entsprechendem Primärantikörper.

##### **Her2/neu-Proto-Onkogen-Expression:**

Zuerst werden die 5 µm dicken Gefrierschnitte fixiert. Nach zweimaliger 5-minütiger Inkubation mit PBS wird die endogene Peroxidase 15 Minuten lang mit einer Wasserstoffperoxidlösung blockiert.

Danach werden unspezifische Bindungsstellen mit hitzeinaktiviertem Humanserum 15 Minuten lang abgebunden. Nun wird der Primärantikörper aufgetropft und anschließend bei 4 °C eine Stunde lang inkubiert. Nach anschließender Spülung folgt die 30-minütige Inkubation mit dem Brückenantikörper bei Raumtemperatur. Nach den zweimaligen, jeweils 5 Minuten dauernden, PBS-Spülungen, wird der PAP-Komplex aufgetropft und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen wiederum zwei PBS-Spülungen mit einer Dauer von jeweils 5 Minuten. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgt das Anfärben mit dem Farbstoff DAB über 10 Minuten.

Um eine sichtbare immunocytochemische Färbung zu erlangen, wird auf die Präparate die Chromogen-Substrat-Lösung DAB gebracht. Die Reaktion der Peroxidase mit Wasserstoffperoxid wandelt DAB in ein unlösliches rötlich-braunes Produkt um. Sowohl brückenbildende Antikörper als auch PAP-Komplex und Enzymreaktionsprodukte bewirken eine Signalverstärkung, so dass die Anfärbung lichtmikroskopisch erkannt werden kann. Nach der Färbung wird die überschüssige Farbe zweimal mit Aqua dest. abgespült. Die Gegenfärbung erfolgt nach Zugabe von Acetatpuffer mit Ethylgrün über 10 Minuten und anschließender dreimaliger Spülung mit Aqua dest. Anschließend wird die Dehydrierung jeweils dreimal mit n-Butanol (je 30 Sekunden) und Xylol durchgeführt.

Zum Schluss wird das Untersuchungsmaterial in Entellan eingedeckelt.

### **bcl-2-Antigen:**

Analog zum Her2/neu-Proto-Onkogen mit entsprechendem Primärantikörper.

### **nm23-Tumorsuppressorgen:**

Analog zum Her2/neu-Proto-Onkogen mit entsprechendem Primärantikörper.

### **Ki-67-Antigen:**

Analog zum Her2/neu-Proto-Onkogen mit entsprechendem Primärantikörper.

## **b) Paraffinmaterial**

### **Östrogenrezeptor:**

Nach dem Schneiden wird das Präparat über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet und dann 20 Minuten bei 70°C nachgetrocknet. Die Dehydratation der Paraffinschnitte erfolgt in 5 bis 10 Minuten 4mal in Xylol und dann in einer absteigenden Acetonreihe, jeweils zweimal mit 100%, 70% und 40% Aceton. Danach wird mit Aqua dest. 4mal (5 bis 10 Minuten) gespült. Es erfolgt eine Mikrowellenbehandlung (Micromat/ AEG) mit 450ml Citratpuffer und Auffüllen mit Aqua dest. bei 700 Watt 2mal je 5 Minuten. Nach Abkühlen über mindestens 30 Minuten und PBS-Spülungen, 2mal 5 Minuten, wird die endogene Peroxidase mit einer 0,3%igen Wasserstoffperoxidlösung blockiert. Danach werden unspezifische Bindungsstellen mit hitzeinaktiviertem Humanserum 15 Minuten lang abgebunden. Es folgt dann das Auftropfen des Primärantikörpers. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C. Danach folgt eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Brückenantikörper. Anschließend folgen zweimalige PBS-Spülungen jeweils über 5 Minuten. Danach wird der ABC-Komplex aufgetropft. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten und wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Die erneuten zwei PBS-Spülungen dauern wieder je 5 Minuten. Das Anfärben der Schnitte erfolgt mit DAB als Farbstoff und dauert 10 Minuten. Nach der Färbung wird die überschüssige Farbe zweimal mit Aqua dest. abgespült. Die Gegenfärbung erfolgt nach Zugabe von Acetatpuffer mit Ethylgrün über 10 Minuten und anschließender dreimaliger Spülung mit Aqua dest.. Dann wird die Dehydrierung jeweils dreimal mit n-Butanol (je 30 Sekunden) und Xylol durchgeführt.

Zum Schluss wird das Untersuchungsmaterial in Entellan eingedeckelt.

### **Progesteronrezeptor:**

Analog zum Östrogenrezeptor mit entsprechendem Primärantikörper;

Ausnahme Mikrowelle: 400 ml Citratpuffer, 4 mal 5 Minuten bei 600 Watt

### **p53-Tumorsuppressorgen:**

Analog zum Östrogenrezeptor mit entsprechendem Primärantikörper;

Ausnahme Mikrowelle: 400 ml Citratpuffer, 4 mal 5 Minuten bei 600 Watt

### **Her2/neu-Proto-Onkogen:**

Zunächst werden von dem in Paraffin eingebetteten Tumormaterial mit Hilfe eines Mikrotoms 5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese dann in ein auf 17°C aufgewärmtes Wasserbecken gelegt. Anschließend werden die Schnitte auf Super Frost Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37°C im Brutschrank getrocknet und dann 30 Minuten bei 70°C nachgetrocknet. Damit die eigentliche immun-histochemische Färbung durchgeführt werden kann, muss zunächst das Paraffin aus den Schnitten herausgelöst werden. Die Dehydratation der Paraffinschnitte erfolgt in 5 bis 10 Minuten 4fach in Xylol und dann in einer absteigenden Acetonreihe, jeweils 2fach mit 100%, 96% und 70% Aceton, an deren Ende eine Spülung in PBS-Puffer steht. Nach Durchlaufen der Entparaffinierungsreihe und PBS-Spülungen 2 mal 5 Minuten werden die Präparate für 30 Minuten in 3%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelegt. Ziel dieses Schrittes ist die Blockierung der Aktivität der endogenen Peroxidase. Anschließend erfolgt noch einmal eine zwei mal 5-minütige Spülung in PBS-Puffer.

Zur Verminderung unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers werden die Schnitte anschließend für 15 Minuten mit hitzeinaktiviertem Humanserum bei Raumtemperatur inkubiert.

Erst dann folgt die Beschichtung mit dem Primärantikörper. Die Präparate werden nun in einer feuchten Kammer bei 4° C über Nacht inkubiert. Nach erneuter Spülung in PBS-Puffer (zwei mal 5 Minuten) werden die Präparate mit dem Brückenantikörper beschichtet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem PAP-Komplex, ebenfalls für 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Wie auch zuvor werden die Schnitte zwischen und im Anschluss an diese beiden Schritte zwei mal 5 Minuten in PBS-Puffer gespült, um überschüssige, nicht gebundene Anteile der verwendeten Reagenzien zu entfernen.

Das Anfärben erfolgt mit DAB als Farbstoff über 10 Minuten (Prinzip: siehe Beschreibung unter Punkt 2.4.1.2.a), Seite 23 u. 24). Zum Schluss wird das Untersuchungsmaterial in Entellan eingedeckelt.

### **bcl-2-Antigen:**

Analog zum Östrogenrezeptor mit entsprechendem Primärantikörper;

Ausnahme Mikrowelle: 400 ml Citratpuffer, 4 mal 5 Minuten bei 600 Watt

### **nm23-Tumorsuppressorgen:**

Analog zum Östrogenrezeptor mit entsprechendem Primärantikörper und PAP-Komplex;

Ausnahme Mikrowelle: 400 ml Citratpuffer, 4 mal 5 Minuten bei 600 Watt

### **Ki-67-Antigen:**

Analog zum Östrogenrezeptor mit entsprechendem Primärantikörper

Ausnahme Mikrowelle: 6 mal 5 Minuten bei 720 Watt

### **2.4.1.3 Auswertung**

### **Östrogen- und Progesteronrezeptor:**

#### Semiquantitative Analyse:

Die gefärbten Schnitte werden entsprechend des prozentualen Anteils angefärbter Tumorzellkerne und der Färbungsintensität beurteilt. Die Färbungsintensität wird folgendermaßen bewertet:

0 = keine Färbung; 1 = schwache Färbung; 2 = schwache – mittlere Färbung; 3 = mittlere Färbung;

4 = mittlere – starke Färbung; 5 = starke Färbung

Aus dem Produkt der angefärbten Tumorzellkerne und deren Färbungsintensität ergibt sich der histochemische Score, der dementsprechend Werte zwischen 0 und 500 annehmen kann.

In unserer Studie wird ein Score von 0 – 10 als „Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor negativ“ und analog ein histochemischer Score von größer 10 als „Rezeptor positiv“ eingestuft.

### **p53-Tumorsuppressorgen:**

Analog zur Einteilung des Östrogen- bzw. Progesteronrezeptors ergibt sich der histochemische Score.

Im weiteren Verlauf der Arbeit gilt ein Score von größer bzw. gleich 180 als „p53 positiv“; ein Wert von kleiner 180 ist dementsprechend „p53 negativ“; diese Einteilung beruht auf den Ergebnissen vorangegangener Studien des Instituts für Onkologische Chemie der Universität Düsseldorf (13).

### **Her2/neu-Proto-Onkogen:**

Die Klassifikation des Her2/neu-Proto-Onkogen-Nachweises erfolgt gemäß der Färbung der Plasmamembran bei der immunhistochemischen Untersuchung:

0 = keine membranständige Färbung; 1 = sichtbare membranständige Färbung

Daraus ergibt sich die Einteilung in eine „Her2/neu negative“ und eine „Her2/neu positive“ Gruppe.

### **bcl-2-Antigen:**

Analog zur Klassifikation der Östrogen- bzw. Progesteronrezeptors ergibt sich der histochemische Score, der auch hier wieder Werte von 0 bis 500 annehmen kann.

Ein Score von größer 180 gilt in der Folge als „bcl-2 positiv“; ein Wert von kleiner bzw. gleich 180 ist demnach „bcl-2 negativ“.

### **nm23-Tumorsuppressorgen:**

Analog zur Klassifikation der Östrogen- bzw. Progesteronrezeptors ergibt sich beim Tumorsuppressorgen nm23 ein histochemische Score zwischen 0 und 500.

Bei diesem tumorbiologischen Faktor liegt die Grenze zwischen „nm23 positiver“ und „nm23 negativer“ Gruppe bei einem Score von 50.

### **Ki-67-Antigen:**

Der angegebene Wert für die Proliferationsaktivität entspricht dem Prozentsatz der angefärbten Zellkerne (Anteil, der sich außerhalb der G0-Phase befindet). Die Färbungsintensität findet keine Berücksichtigung.

Ein Wert von größer oder gleich 7% gilt für unsere Studie als „Ki-67 positiv“.

## **2.5 Statistik**

Zur Erfassung der Daten wurde das Programm ACCESS 97®, zur statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurde das Programm SPSS®, Version 11.0, für WINDOWS® verwendet.

Vergleiche zweier Kollektive hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung wurden über Kreuztabellen mit anschließender Signifikanztestung im Chi-Quadrat-Test nach Pearson angestellt.

Die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten erfolgte nach der Methode von Kaplan- Meier. Zur Einschätzung der Signifikanz der erhaltenen Werte wurden Log- Rank- Tests durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

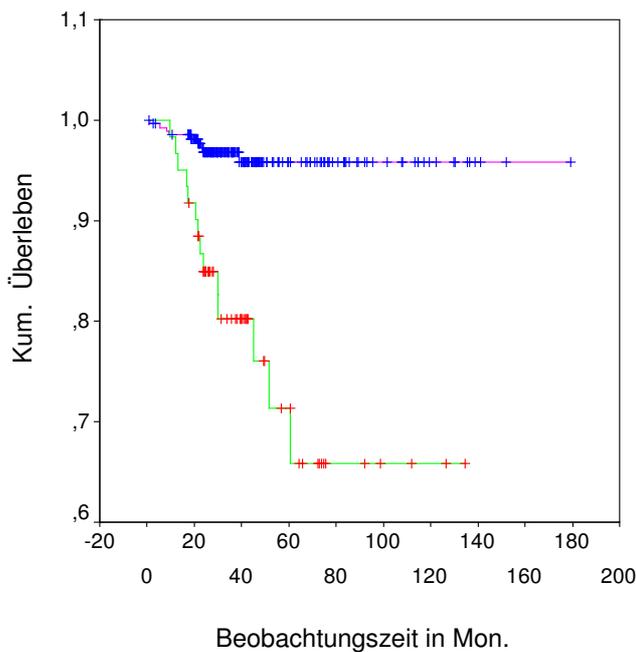
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gesamtkollektiv

Bei 334 Patientinnen (94,9 %) des Gesamtkollektivs wurde ein immunhistochemischer Östrogenrezeptornachweis des Tumors durchgeführt; 273 Proben (81,7 %) werden aufgrund ihres immunhistochemischen Scores als „rezeptorpositiv“, 61 Proben (18,3 %) analog als „rezeptornegativ“ eingestuft.

Zur Darstellung der prognostischen Bedeutung des Östrogenrezeptors wird zunächst die Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Beobachtungszeit mit Hilfe der Methode nach

Kaplan – Meier, bei einer dichotomen Einteilung in die oben erwähnten „rezeptorpositiven“ bzw. „rezeptornegativen“ Gruppen, dargestellt (Abb. 6). Diese Einteilung ergibt einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ) der beiden Gruppen in Bezug auf ihre Überlebenswahrscheinlichkeit:



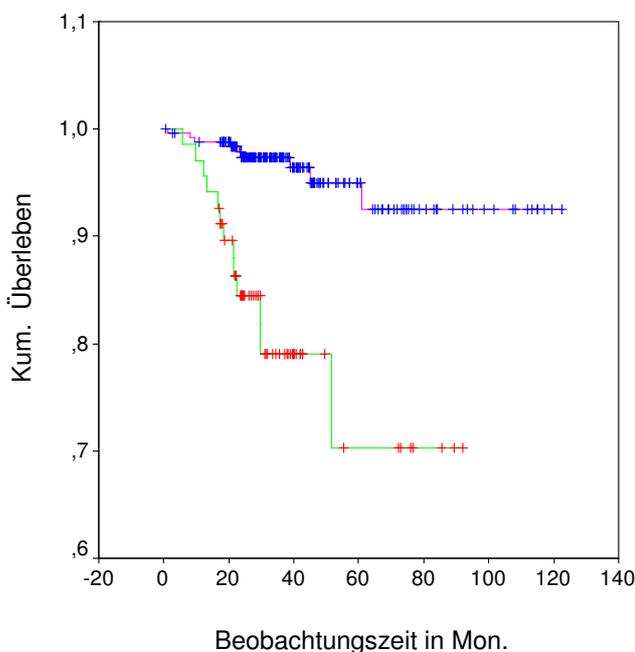
**Abb. 6** Einfluss des Östrogenrezeptorstatus auf die Überlebenswahrscheinlichkeit im Gesamtkollektiv

+	rezeptornegativ	Anzahl der Patientinnen:	334
+	rezeptorpositiv	davon verstorben:	23 (6,9 %)
		Signifikanz:	$p < 0,0001$

Aus dieser Grafik (Abb.6) lässt sich erkennen, dass die Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus eine deutlich bessere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als die Frauen in der Gruppe mit negativem Östrogenrezeptorstatus.

Der Progesteronrezeptorstatus wurde analog zum Östrogenrezeptor bei 323 Patientinnen (91,8 %) ermittelt und unterteilt. Bei diesem Parameter befinden sich 253 Proben (78,3 %) in der Gruppe der „rezeptorpositiven“ und folglich sind 70 Proben (21,7 %) „rezeptornegativ“.

Auch hier ist nachfolgend die Überlebenswahrscheinlichkeit in Bezug auf die Beobachtungszeit mit Hilfe der Methode nach Kaplan – Meier, bei einer dichotomen Einteilung in „rezeptorpositive“ bzw. „rezeptornegative“ Proben, dargestellt (Abb. 7). Wiederum ergibt sich eine hohe Signifikanz für den Einfluss des Rezeptorstatus ( $p < 0,001$ ):

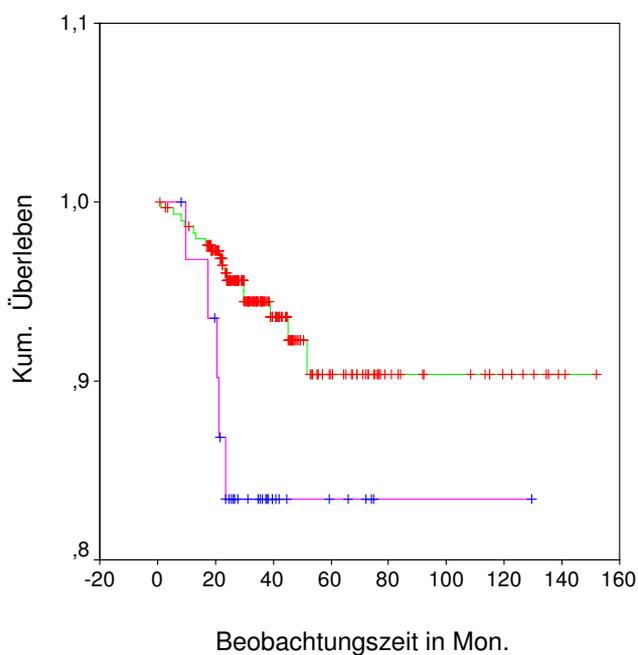


**Abb. 7** Einfluss des Progesteronrezeptorstatus auf die Überlebenswahrscheinlichkeit im Gesamtkollektiv

<p>+ : rezeptornegativ</p> <p>+ : rezeptorpositiv</p>	<p>Anzahl der Patientinnen: 323</p> <p>davon verstorben: 23 (6,9 %)</p> <p>Signifikanz: <math>p &lt; 0.0001</math></p>
---	--

Auch Abb. 7 zeigt einen deutlichen Einfluss des Progesteronrezeptorstatus auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen. Wie bereits beim Östrogenrezeptor wirkt sich auch hier ein positiver Rezeptorstatus günstig aus.

Bei 328 Patientinnen liegen Daten über den p53-Tumorsuppressorgenstatus vor. Fälle, die aufgrund ihres immunhistochemischen Scores als „p53 positiv“ (n = 32 / 9,8%) eingestuft werden, stehen den „p53 negativen“ Fällen (n = 296 / 90,2%) gegenüber. Wertet man diese beiden Gruppen mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode aus, so ergibt sich wiederum ein signifikanter Unterschied (p = 0,0366) in der Überlebenswahrscheinlichkeit (Abb. 8):

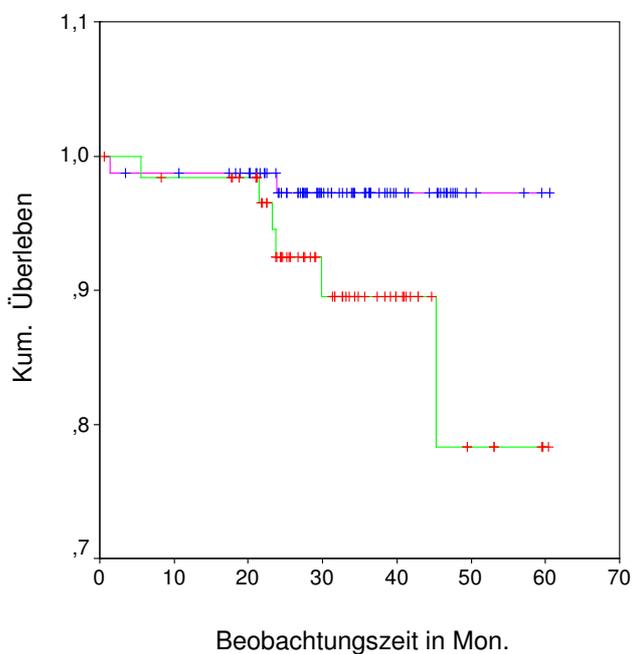


**Abb. 8** Einfluss des p53-Tumorsuppressorgenstatus auf die Überlebenswahrscheinlichkeit im Gesamtkollektiv

+	p53 negativ	Anzahl der Patientinnen:	328
+	p53 positiv	davon verstorben:	22 (6,7 %)
		Signifikanz:	p = 0.0366

Diese Abbildung (Abb. 8) zeigt, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit einer Patientin in der p53 negativen Gruppe signifikant höher ist als die einer p53 positiven Patientin.

In 143 Fällen lagen Daten zur Expressierung von bcl-2 vor. Anhand der Anfärbung der Tumorzellkerne und des daraus abgeleiteten Scores ließ sich auch bei diesem Faktor eine „bcl-2 positive“ (81 Pat.) und eine „bcl-2 negative“ (62 Pat.) Gruppe unterscheiden. Betrachtet man diese zwei Patientengruppen in Bezug auf ihre Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit, ergibt sich bei relativ kleiner Fallzahl folgendes Ergebnis ( $p=0,052$ ) (Abb. 9):

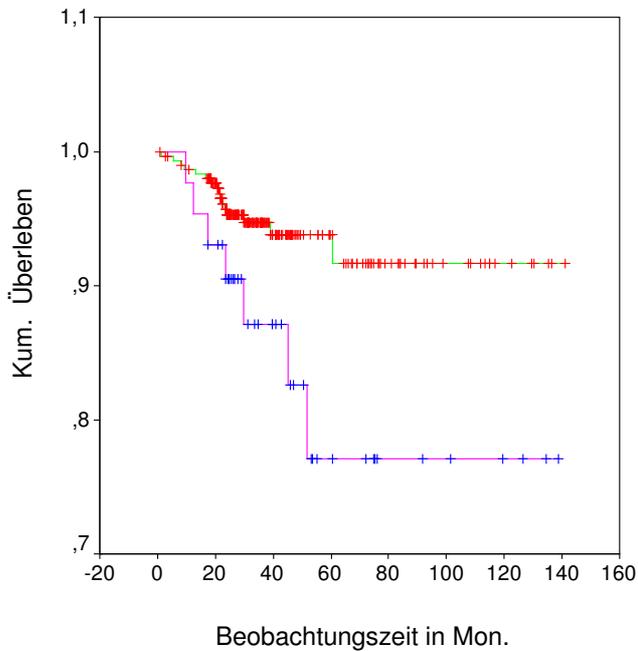


**Abb. 9** Einfluss des bcl-2-Proteins auf die Überlebenswahrscheinlichkeit

+	bcl-2 negativ	Anzahl der Patientinnen:	143
+	bcl-2 positiv	davon verstorben:	8 (5,6 %)
		Signifikanz:	$p = 0.052$

Die Tumoren, die das bcl-2-Protein exprimieren, haben mit eine deutlich bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als die übrigen Patientinnen (Signifikanz grenzwertig:  $p = 0.052$ ) (Tab. 9).

Bei 342 Patientinnen (97,2 %) wurde das Her2/neu-Proto-Onkogen bestimmt, das jeweilige Färbeverhalten der Plasmamembran führt zur Einteilung in 43 „Her2/neu positive“ (12,6%) und 299 „Her2/neu negative“ Proben (87,4 %). Nach Kaplan – Meier aufgeschlüsselt ergibt sich abermals ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0253$ ) (Abb. 10):

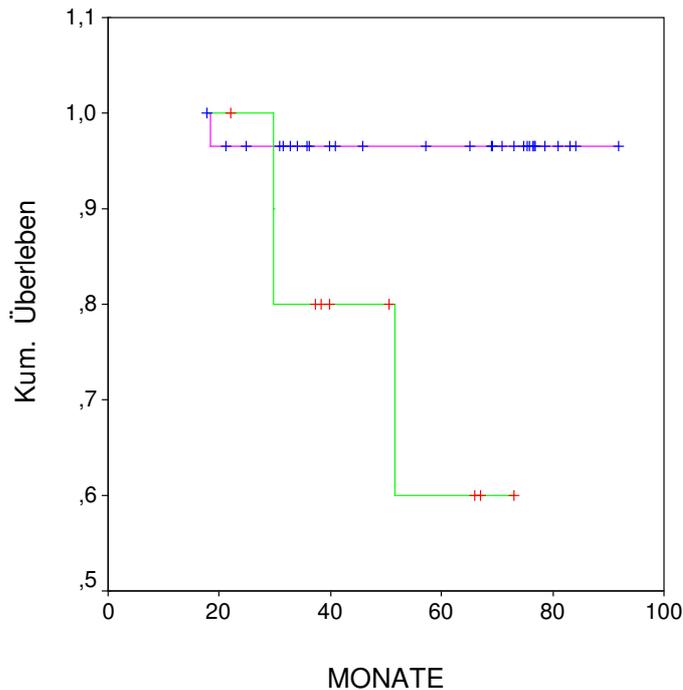


**Abb. 10** Einfluss der Expression des Proto-Onkogens Her2/neu auf die Überlebenschance

+	Her2/neu positiv	Anzahl der Patientinnen:	342
+	Her2/neu negativ	davon verstorben:	23 (6,7%)
		Signifikanz:	$p = 0.0253$

Patientinnen, die das Proto-Onkogen Her2/neu exprimieren, haben laut Abb. 10 eine signifikant schlechtere Prognose als die Gruppe ohne Expression.

Die Untersuchung der Expression des Tumorsuppressorgens nm23 erfolgte nur bei 39 Proben (11,1%). In diesem kleinen Kollektiv erfolgte die Einteilung wiederum durch einen immunhistochemischen Score in „nm23 negativ“ (10 Pat. = 25,6 %) und „nm23 positiv“ (29 Pat. = 74,4 %) Tumoren. Trotz der relativ kleinen Fallzahl ergibt sich ein signifikanter Einfluss ( $p = 0,0129$ ) dieses Faktors auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen (Abb. 11):

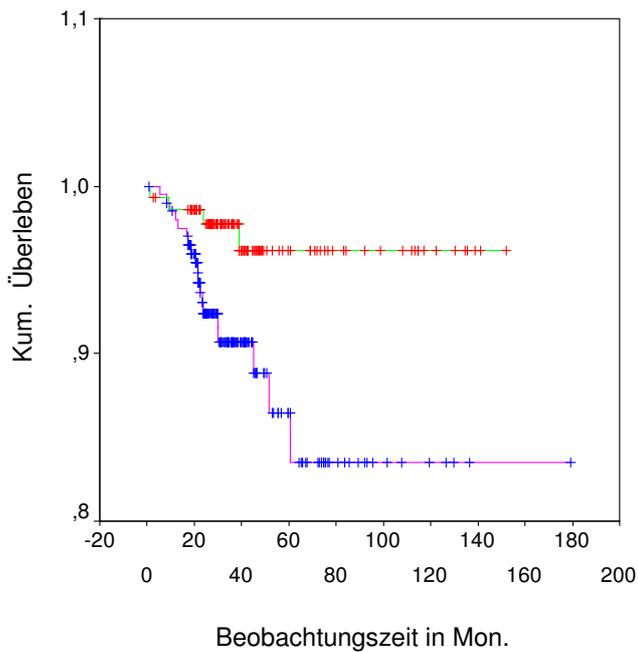


**Abb. 11** Einfluss des Tumorsuppressorgens nm23 auf die Überlebenswahrscheinlichkeit

+	nm23 negativ	Anzahl der Patientinnen:	39
+	nm23 positiv	davon verstorben:	4 (10,3 %)
		Signifikanz:	$p = 0.0129$

In dem in Abb. 11 gezeigten Kollektiv zeigt sich trotz der geringen Anzahl der Fälle eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit zu überleben, wenn die Patientinnen nm23 positive Tumoren haben.

Der Proliferationsmarker Ki-67 wurde bei 343 der 352 Patientinnen des Gesamtkollektivs untersucht, dies entspricht einem Prozentsatz von 97,4 %. Auch dieser Parameter wird mit Hilfe seines immunhistochemischen Scores in eine „Ki-67 positive“ (201 Pat. = 58,6 %) und eine „Ki-67 negative“ (142 Pat. = 41,4 %) Gruppe unterteilt und nach Kaplan – Meier dargestellt (Abb. 12); hier ergibt sich wiederum eine hohe Signifikanz für den Unterschied der beiden Gruppen ( $p = 0,0119$ ):



**Abb. 12** Einfluss des Proliferationsmarkers Ki-67 auf die Überlebenswahrscheinlichkeit

+	Ki-67 negativ	Anzahl der Patientinnen:	343
+	Ki-67 positiv	davon verstorben:	23 (6,7 %)
		Signifikanz:	$p = 0.0119$

In Abb. 12 wird klar, dass ein Tumor mit niedriger Proliferationsaktivität eine deutlich bessere Überlebenswahrscheinlichkeit hat als ein stark proliferierender Tumor.

### 3.2 Neoadjuvantes Kollektiv

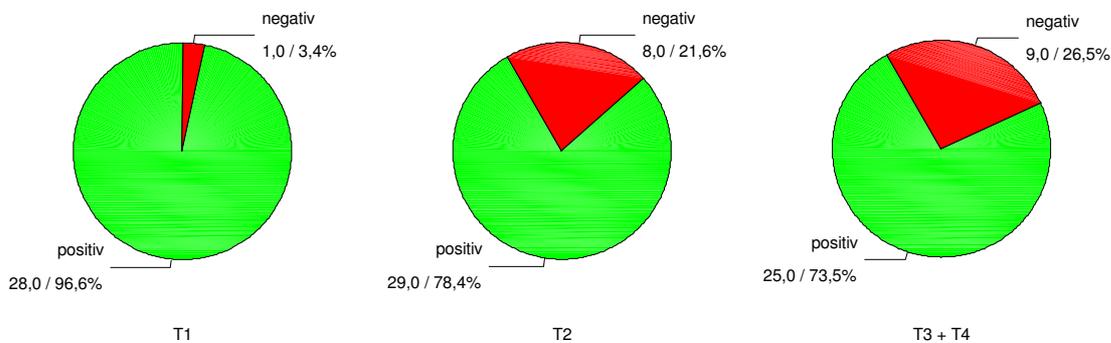
Dieses Kollektiv besteht aus 104 neoadjuvant therapierten Patientinnen des Gesamtkollektivs die sowohl zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung durch eine Jetnadelbiopsie als auch bei der Sanierungsoperation über genaue Angaben zur Tumorgröße verfügen. Fast alle Patientinnen dieser Gruppe sind präoperativ mit 4 Zyklen anthrazyklinhaltiger Chemotherapiekombinationen therapiert worden.

Betrachtet man zunächst auch in diesem Kollektiv die Faktoren Östrogen-, Progesteronrezeptorstatus, p53, Her2/neu, bcl-2, nm23 und Ki-67, ergeben sich grundsätzlich ähnliche Einflüsse auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen. Diese erreichen aber wegen der niedrigen Fallzahlen im neoadjuvanten Kollektiv noch keine statistische Relevanz.

Im neoadjuvanten Kollektiv werden nun zusätzlich die Einflüsse verschiedener tumorbiologischer Faktoren im Rahmen der neoadjuvanten Therapie untersucht.

In den folgenden Tabellen wird die Verteilung der einzelnen Faktoren auf die Tumorstadien gemäß TNM-Klassifikation (13) dargestellt, um das neoadjuvante Kollektiv näher zu beschreiben.

Betrachtet man zunächst den Östrogenrezeptorstatus, zeigt sich folgendes Bild (Abb. 13):

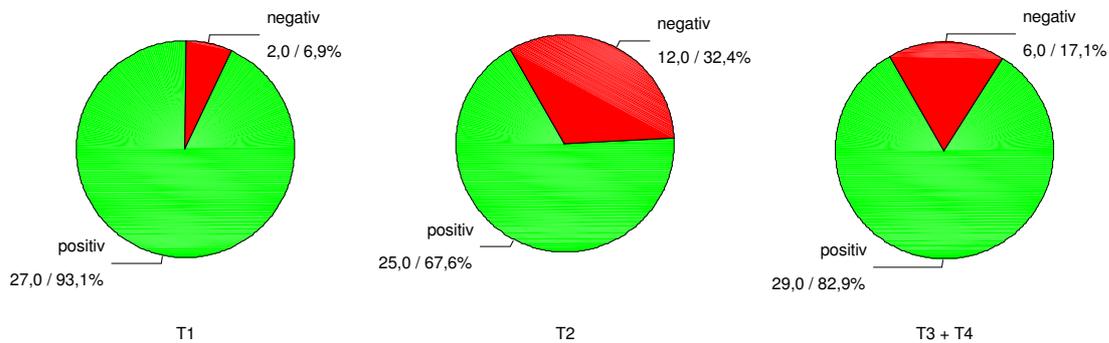


**Abb. 13** Verteilung des Östrogenrezeptorstatus auf die Tumorstadien gemäß TNM-Klassifikation (T3 und T4 zusammengefasst)

- : negativer Rezeptorstatus
- : positiver Rezeptorstatus

Es zeigt sich in Abbildung 13, dass der Anteil östrogenrezeptornegativer Tumoren im T1-Stadium deutlich kleiner ist als bei den größeren Malignomen.

Beim Progesteronrezeptorstatus lässt sich diese Verteilung erkennen (Abb.14):

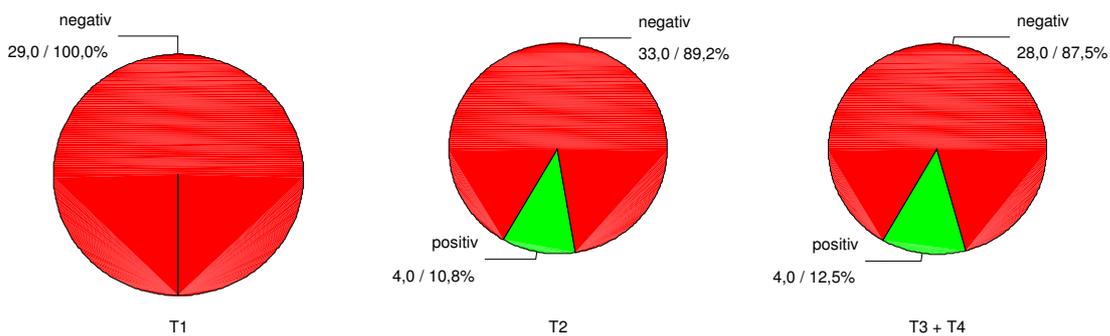


**Abb. 14** Verteilung des Progesteronrezeptorstatus auf die Tumorstadien gemäß TNM-Klassifikation (T3 und T4 zusammengefasst)

■ : negativer Rezeptorstatus      ■ : positiver Rezeptorstatus

Auch beim Progesteronrezeptor hat das T1 – Stadium den geringsten Anteil an rezeptornegativen Tumoren (Abb.14).

Beim p53-Tumorsuppressorgenstatus sind die beiden Gruppen in den verschiedenen Tumorstadien wie folgt vertreten (Abb. 15):

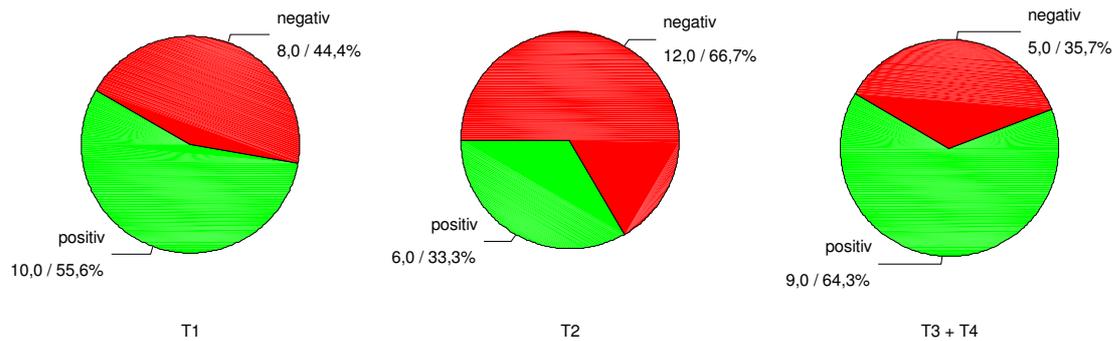


**Abb. 15** Verteilung des p53-Tumorsuppressorgenstatus auf die Tumorstadien gemäß TNM-Klassifikation (T3 und T4 zusammengefasst)

■ : negativer Rezeptorstatus      ■ : positiver Rezeptorstatus

Aus Abbildung 15 wird ersichtlich, dass der Anteil p-53 positiver Tumoren in den Stadien T2 – T4 deutlich höher ist als im Stadium T1.

Analysiert man die bcl-2 Exprimierung der Tumoren in Abhängigkeit vom Tumorstadium, ergibt sich folgende Verteilung (Abb. 16):

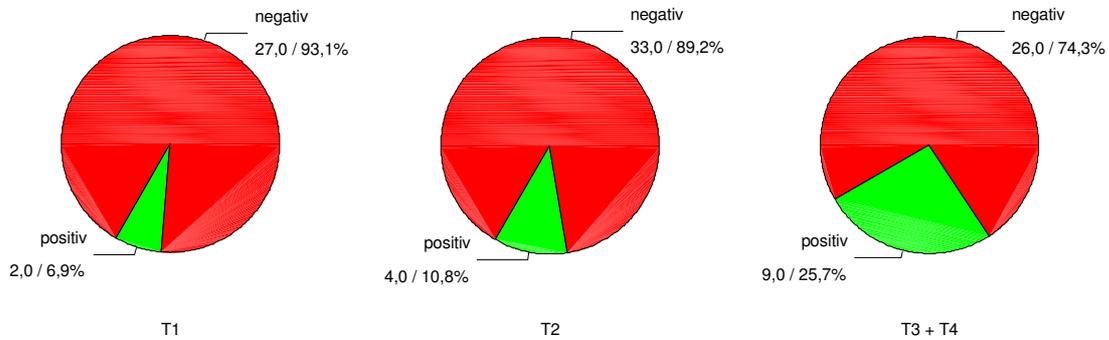


**Abb. 16** Verteilung der bcl-2 Exprimierung auf die Tumorstadien gemäß TNM-Klassifikation (T3 und T4 zusammengefasst)

- : bcl-2 negativ
- : bcl-2 positiv

Auch hier zeigt sich, dass im T1 – Stadium ein kleinerer Anteil von „bcl-2 negativen“ Tumoren als im T2 – Stadium zu finden ist (Abb.16). Bei einer sehr geringen Fallzahl im Tumorstadium T3 und T4 lässt sich dieser Trend dort nicht beobachten.

Die folgende Abbildung (Abb. 17) zeigt den Anteil der Tumoren mit starker Her2/neu-Expression in den verschiedenen T –Stadien:

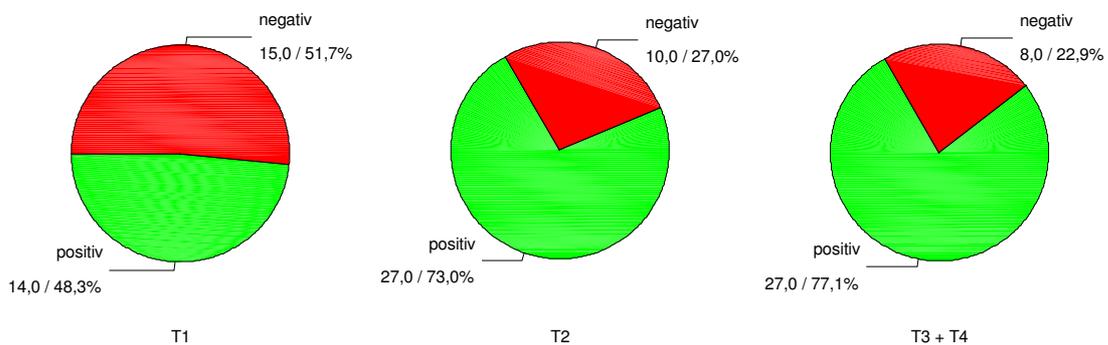


**Abb. 17** Verteilung der Tumoren in Abhängigkeit ihrer Her2/neu-Expression

- : Her2/neu negativ
- : Her2/neu positiv

Tumoren, die das Proto-Onkogen Her2/neu stark exprimieren, sind in den höheren Tumorstadien anteilig deutlich häufiger vertreten (Abb.17).

Schließlich ergibt auch die Analyse des Ki-67 Proliferationsmarkers eine ähnliche Verteilungscharakteristik (Abb. 18):



**Abb. 18** Verteilung der Tumoren in Abhängigkeit ihrer Ki-67-Antigen-Expression

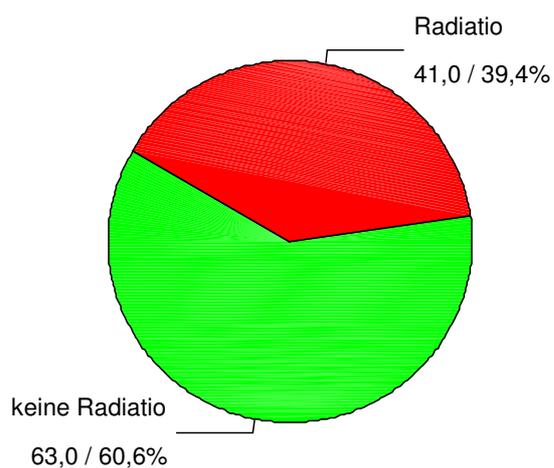
- : Ki-67 negativ
- : Ki-67 positiv

Aus Abbildung 18 ist ersichtlich, dass der Anteil Ki-67 positiver Tumoren in den höheren Tumorstadien zunimmt, d.h. bei den größeren Tumoren sind anteilig mehr Malignome, die den Proliferationsmarker stark exprimieren.

In der Folge werden nun zusätzlich die Einflüsse der verschiedenen tumorbiologischen Faktoren auf das Responsverhalten der Tumoren im Rahmen der neoadjuvanten Therapie untersucht.

Zu diesem Zweck werden die histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) den übrigen Fällen gegenübergestellt.

Um die Ergebnisse richtig einschätzen zu können, ist es wichtig zu erwähnen, dass präoperativ zusätzlich zu den oben genannten 4 Zyklen anthrazyklinhaltiger Chemotherapiekombinationen bei einem Teil der Patientinnen eine Radiatio durchgeführt wurde (Abb. 19):



**Abb. 19** Anteil der präoperativ bestrahlten Patientinnen am neoadjuvanten Kollektiv

- = präoperative Radiatio
- = keine präoperative Radiatio

Das folgende Diagramm zeigt, dass sich pCR nicht nur ungleichmäßig in den Gruppen der bestrahlten bzw. nicht bestrahlten Patientinnen verteilen, sondern in diesem Kollektiv sogar ein signifikanter Zusammenhang zwischen präoperativer Bestrahlung und der Rate der pCR besteht ( $p=0,006$ ) (Tab. 1):

Anzahl		präoperative Radiatio		Gesamt
		nein	ja	
Response	pCR	2	8	10
	andere	61	33	94
Gesamt		63	41	104

**Tab. 1** Responseverhalten der Tumoren in Abhängigkeit einer präoperativ durchgeführten Radiatio

■ :	keine präoperative Radiatio	Anzahl der Patientinnen:	104
■ :	präoperative Radiatio	Anzahl der PCR:	10
		Signifikanz :	$p = 0,006$

Man erkennt in Tabelle 1, dass in der präoperativ bestrahlten Patientinnengruppe der Anteil der histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) signifikant höher ist.

Im nächsten Diagramm wird die Expression des bcl-2-Proteins, unterteilt in eine „bcl-2 positive“ (25 Pat.) und eine „bcl-2 negative“ Gruppe (25 Pat.), mit einer dichotomen Einteilung des Responseverhaltens, in pCR und übrige Fälle, in einer Kreuztabelle verglichen (Tab. 2).

Anzahl		bcl-2		Gesamt
		negativ	positiv	
Response	pCR	4	0	4
	andere	21	25	46
Gesamt		25	25	50

**Tab. 2** Responseverhalten der Tumoren in Abhängigkeit ihrer bcl-2 Expressierung

■ :	bcl-2 negativ	Anzahl der Patientinnen:	50
■ :	bcl-2 positiv	Anzahl der PCR:	4
		Signifikanz :	$p = 0,037$

Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, dass es bei keiner Patientin, die das bcl-2-Protein einen Inhibitor der Apoptose stark exprimiert, zu einer Komplettremission kommt ( $p = 0,037$ ).

Stellt man die „Her2/neu positiven“ (14 Pat. = 13,7 %) den anderen Fällen (88 Pat. = 86,3 %) gegenüber und unterscheidet mit Hilfe einer Kreuztabelle erneut die Komplettresponder von den übrigen Patientinnen, kommt man auch hier zu einem signifikanten Ergebnis ( $p = 0,011$ ) (Tab. 3).

Anzahl		Her2/neu		Gesamt
		negativ	positiv	
Response	pCR	6	4	10
	andere	82	10	92
Gesamt		88	14	102

**Tab. 3** Responseverhalten der Tumoren in Abhängigkeit ihrer Her2/neu-Expression

■	: Her2/neu positiv	Anzahl der Patientinnen:	102
■	: Her2/neu negativ	Anzahl der pCR:	10
		Signifikanz:	$p = 0,011$

Vergleicht man die Anzahl der histopathologischen Komplettremissionen in der Patientengruppe, die deutlich Her2/neu positive Tumoren haben, mit den übrigen Fällen (Tab. 3), so zeigt sich unter der neo-adjuvanten Therapie ein signifikant höherer Anteil von Komplettrespondern bei den stark Her2/neu positiven Tumoren.

Schließlich zeigt auch das Ki-67-Antigen in einer dichotomen Einteilung von „Ki-67 positiven“ (69 Pat. = 67,6 %) und „Ki-67 negativen“ Tumoren (33 Pat. = 32,4 %) einen Einfluss auf das Responseverhalten der Tumoren unter neoadjuvanter Chemotherapie, der aber in der dichotomen Unterscheidung von Komplettremissionen zu den „übrigen Fällen“ nicht signifikant ist ( $p = 0,379$ ) (Tab. 4).

Anzahl		Ki-67		Gesamt
		negativ	positiv	
Response	pCR	2	8	10
	andere	31	61	92
Gesamt		33	69	102

**Tab. 4** Responseverhalten der Tumoren in Abhängigkeit ihrer Ki-67-Antigen-Expression

■	: Ki-67 negativ	Anzahl der Patientinnen:	102
■	: Ki-67 positiv	Anzahl der pCR:	10
		Signifikanz:	$p = 0,379$

Die Patientinnen mit einem stark proliferierenden Tumor sprechen, wie in Tabelle 4 zu sehen, in einem höheren Prozentsatz auf die präoperative Chemotherapie an. In diesem Kollektiv erreicht die univariate Analyse des Ki-67-Antigens in Bezug auf die Rate der Komplettremissionen allerdings kein signifikantes Niveau.

Die übrigen untersuchten Faktoren aus dem Gesamtkollektiv: Östrogen-, Progesteronrezeptorstatus, p53 und nm23 weisen in diesem Kollektiv keine statistisch signifikante Korrelation zur Gruppe der histologisch gesicherten Komplettremissionen auf.

#### 4. Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war es, im Gesamtkollektiv tumorbiologische Faktoren zu finden, die schon vor Therapiebeginn eine Aussage über die Überlebenswahrscheinlichkeit beim invasiven Mammakarzinom zulassen, unabhängig davon, ob anschließend eine adjuvante oder eine neoadjuvante Behandlung mit Anthrazyklin bzw. einer zusätzlichen Radiatio eingeleitet wurde.

Dazu wurden bei insgesamt 371 Patientinnen mit einem neu diagnostizierten invasiven Mammakarzinom die vorhandenen Daten der Faktoren Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptorstatus, p53-Tumorsuppressorgenexpression, Expression des Proto-Onkogens Her2/neu, nm23-Tumorsuppressorgenexpression und die Aktivität des Proliferationsmarkers Ki-67 erfasst. Nachdem diese Faktoren jeweils in eine „positive“ und eine „negative“ Gruppen eingeteilt worden sind, wurden sie auf ihren Einfluss auf die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit hin untersucht.

Unser neoadjuvantes Kollektiv besteht aus 104 Patientinnen des Gesamtkollektivs, die sowohl zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung durch eine Jetnadelbiopsie als auch bei der Sanierungsoperation über genaue Angaben zur Tumorgöße verfügten. Fast alle Patientinnen dieser Gruppe sind präoperativ mit 4 Zyklen eines Anthrazyklin-haltigen Chemotherapieregimes behandelt worden.

Eine Analyse der selben Faktoren in Bezug auf ihren Einfluss der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit im neoadjuvanten Kollektiv ergab auf Grund der kleinen Fallzahlen keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Im Gesamtkollektiv zeigen sich sowohl für die Tumoren mit „positivem“ Östrogen- als auch für die mit „positivem“ Progesteronrezeptorstatus in der univariaten Analyse eine signifikant bessere Überlebenswahrscheinlichkeit (s. Abb. 6 u. Abb. 7). Diese Beobachtung stimmt mit vielen anderen Studien überein, in denen die positive Steroidhormonrezeptorexpression beim Mammakarzinom als ein starker, prognostisch günstiger Faktor angesehen wird (1; 3-5; 10-11).

P53 ist ein Tumorsuppressorgen, das an der Einleitung der Apoptose nach irreversibler DNA-Schädigung beteiligt ist (14).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit derjenigen Patientinnen unseres Gesamtkollektivs, die sich in der „p53 negativen“ Gruppe befinden, ist signifikant höher als die einer „p53 positiven“ Patientin (s. Abb. 8). Dieses in der Literatur oft beschriebene Phänomen beruht wohl auf der Beobachtung, dass einer Überexpression des Tumorsuppressorgens p53 eine Mutation zu Grunde liegt und es so seine eigentliche Funktion, nämlich die Apoptose nach irreversiblen Zellschaden einzuleiten, nicht mehr ausführen kann. Daher gilt ein p53 positiver Tumor allgemein als prognostisch ungünstig (14-17).

Bcl-2 ist ein Apoptose-Regulatorgen, das in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptor exprimiert wird und die Apoptose hemmt (18-20). Die Expressierung von bcl-2 wird in der Literatur mit anderen prognostisch günstigen Faktoren assoziiert, wie zum Beispiel gut differenzierten Tumoren und positivem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie mit fehlender p53- und Her2/neu-Überexpressierung (15;22-23).

Dieser Zusammenhang erklärt wohl die Tatsache, dass, obwohl bcl-2 die Apoptose hemmt und damit den programmierten Zelltod inhibiert, die Patientinnen, deren Tumor das bcl-2-Protein exprimieren, mit nahezu statistischer Signifikanz eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als die übrigen Patientinnen des Gesamtkollektivs (s. Abb. 9).

Näher betrachtet ist bcl-2 ein Todesrepressor-Molekül, das Zellen gegen oxidativen Stress schützt. Die bcl-2-Expression ist positiv mit dem intrazellulären Glutathion (GSH) – Spiegel gekoppelt und könnte darüber die Apoptose, den programmierten Zelltod beeinflussen. Es spielt eine Schlüsselrolle beim Abfangen toxischer freier Radikale, im Rahmen des oxidativen Stress und bei der Entgiftung von xenobiotischen Substanzen.

Anthrazykline wirken nicht nur über eine Hemmung der Topoisomerase II, eine Interkalation in der DNA-Doppelhelix, sondern auch über die Generierung von Superoxiden, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen.

Erhöhte bcl-2-Spiegel modulieren die Apoptose durch Erhöhung der intrazellulären Glutathion (GSH) - Spiegel und Relokalisation von GSH aus dem Zytoplasma in den Zellkern. Im Kern erzeugen sie ein hoch reduktives Milieu, das die o. g. Radikale und Oxide abfängt und darüber die oxidativ stressinduzierte Apoptose verhindert. Einer der frühen Ereignisse bei der Apoptose ist eine erhöhte Generierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch die Mitochondrien. Durch direkte Detoxifikation kann eine Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffverbindungen verhindert werden.

Nach den bisherigen Erfahrungen reagieren bcl-2-positive Mammakarzinome weniger häufig auf eine (neoadjuvante) anthrazyklinhaltige Chemotherapie (EC) im Sinne einer Komplettremission.

Ein bcl-2-induzierter Anstieg des Glutathionspiegels führt außerdem zu einer erhöhten Gefahr einer Resistenz gegenüber Cyclophosphamid und anderen Oxazaphosphorinen, wie z. B. Ifosfamid (21-23).

In der Auswertung des Responseverhaltens im neoadjuvanten Kollektiv zeigt sich statistisch eindeutig ( $p = 0,037$ ), dass es bei keiner der Patientinnen mit einem bcl-2 positiven Tumor zu einer histopathologischen Komplettremissionen (pCR) kommt (Tab.2).

Auch eine andere Studie kommt bei einer univariaten Analyse zu dem Ergebnis, dass es bei Tumoren, die das bcl-2 Gen nicht exprimieren, statistisch signifikant häufiger unter neoadjuvanter Anthrazyklintherapie zu einer histopathologisch gesicherten Komplettremission (pCR) kommt (9).

Die Wirkmechanismen des bcl-2 Gens und deren Veränderungen auf molekularer Ebene unter Chemotherapie sollten in Zukunft näher untersucht werden, um so ein besseres Verständnis der Regulation und einer möglichen Resistenz gegen verschiedene Chemotherapeutika zu bekommen. Dadurch ließen sich im Idealfall bereits vor Einleitung einer neoadjuvanten Chemotherapie diejenigen Patientinnen herausfiltern, die von dieser Therapieform keinen Nutzen hätten..

Das Her2/neu Proto-Onkogen codiert für einen Rezeptor aus der Familie der Wachstums-Rezeptoren. Eine Überexpression des Proteins ist mit einem erhöhten onkogenen Potential und mit einer ungünstigen Prognose verbunden (15; 24-25).

Im Gesamtkollektiv haben Patientinnen, die das Proto-Onkogen Her2/neu überexprimieren, eine signifikant schlechtere Prognose ( $p = 0.0253$ ) als die Gruppe ohne Überexpression (s. Abb.10).

Bei diesem tumorbiologischen Faktor ergibt sich eine gegenläufige Tendenz, wenn man die Verteilung der Komplettremissionen auf die verschiedenen Gruppen betrachtet; die im Gesamtkollektiv prognostisch ungünstigen, Her2/neu überexprimierenden Tumoren zeigen einen deutlich höheren Anteil ( $p = 0,011$ ) histopathologisch gesicherter Komplettremissionen (pCR) unter der präoperativen Chemotherapie mit Anthrazyklin.

Die Beobachtung, dass Patientinnen mit einem Her2/neu positiven Tumor ein signifikant besseres Ansprechen und eine höhere Rate an histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) unter einer präoperativen Anthrazyklintherapie zeigen, wurde auch in anderen Studien gemacht (7;26-27).

Allerdings gibt es in der Literatur auch einige Arbeiten, deren Ergebnisse keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Her2/neu positiven Tumoren und einem verbesserten Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie mit Anthrazyklin aufzeigen (28-30).

In einer anderen Studie wird Her2/neu bei neoadjuvanter Anthrazyklintherapie als prädikativer Faktor für ein besseres rezidivfreies Überleben diskutiert (31).

Auf Grund des deutlich höheren Anteils der pCR in der Gruppe der Her2/neu positiven Tumoren (Tab. 3) unseres relativ kleinen Kollektivs von 102 Patientinnen unter neoadjuvanter Anthrazyklintherapie sollte in weiteren Studien überprüft werden, ob eine Her2/neu-Expression als prädikativer Faktor für ein besseres Responseverhalten dienen kann.

Nm23 ist ein antimetastatisches Gen, von dem einige Autoren berichten, dass mit einer hohen Expression eine verbesserte Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit verbunden sei. Desweiteren korreliert es eng mit anderen positiven Faktoren, wie besserem Differenzierungsgrad, positivem Steroidhormonrezeptorstatus, niedriger Proliferationsaktivität und fehlenden axillären Lymphknotenmetastasen (32-33).

Wir konnten im Gesamtkollektiv unserer Studie ebenfalls einen statistisch signifikanten Einfluss der nm23-Expression auf die Prognose nachweisen: Patientinnen mit einem nm23 exprimierenden Tumor haben eine deutlich bessere Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit ( $p = 0.0129$ ) als die mit niedriger oder fehlender nm23-Expression (Abb. 11).

Ki-67 ist ein Antigen, das nur in Zellen detektiert werden kann, die sich außerhalb der G<sub>0</sub>-Phase befinden. Daher eignet es sich, um die Proliferationsaktivität eines Tumors zu bestimmen.

Eine hohe Aktivität des Proliferationsmarkers Ki-67 wird in fast allen Arbeiten als ein prognostisch ungünstiger Faktor für die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit eingestuft, da diese für eine hohe Teilungsrate und damit für ein schnelles Tumorwachstum steht. Sie ist darüber hinaus oft mit einem geringen Differenzierungsgrad und einem negativen Steroidhormonrezeptorstatus vergesellschaftet (34-35).

Auch in unserem Gesamtkollektiv stellt ein Ki-67 positiver Tumor einen prädikativen Faktor für eine schlechtere Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen dar ( $p = 0.0119$ ) (Abb.12).

In Bezug auf das Responseverhalten unter neoadjuvanter Anthrazyklintherapie stellen viele Studien allerdings fest, dass es bei Tumoren mit einer hohen Ki-67-Proliferationsaktivität in einem signifikant größeren Teil zu einer histopathologisch gesicherten Komplettremission (pCR) kommt (7;28).

Diese Beobachtung lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass Tumoren, die sich in der Proliferationsphase befinden, sensibler für eine Chemotherapie sind, die strukturelle Schäden während der DNA-Synthese verursacht (36-37).

In unserem neoadjuvanten Kollektiv zeigt sich auch der Trend, dass es bei Patientinnen mit einem Ki-67 positiven Tumor häufiger zu einer pCR kommt. Bei der relativ niedrigen Fallzahl wird aber kein Signifikanzniveau erreicht (Tab.4).

Um die Bedeutung dieser Biomarker für das Responseverhalten unter neoadjuvanter Therapie richtig einordnen zu können, ist es wichtig zu wissen, dass sich in der Analyse der Daten auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer präoperativ durchgeführten Radiotherapie und der Zahl der histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) ergibt ( $p = 0,006$ ). Es zeigt sich, dass die Patientinnen, die vor der Operation bestrahlt wurden, deutlich häufiger eine pCR in der histologischen Untersuchung aufwiesen (Tab. 1).

Die Beobachtung, dass es unter einer präoperativ durchgeführten kombinierten Radio-Chemotherapie zu einer deutlich höheren Rate an histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) kommt, als unter einer neoadjuvanten Chemotherapie alleine, zeigt sich auch in anderen Studien (38-39).

Untersucht man in den Gruppen der präoperativ radio-chemotherapierten bzw. nicht therapierten Patientinnen die einzelnen Biomarker in Bezug auf die Verteilung der pCR, so ergeben sich bei allerdings sehr kleinen Fallzahlen in der Gruppe der nicht präoperativ radio-chemotherapierten Patientinnen signifikante Zusammenhänge:

Alle histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) dieser Gruppe sind Her2/neu-positiv ( $p < 0,001$ ), p53-positiv ( $p < 0,001$ ) und Progesteronrezeptor-negativ ( $p = 0,005$ ).

Zusammenfassend konnte in meiner Arbeit damit ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen bereits etablierten Prognosefaktoren (Östrogen-, Progesteronrezeptorstatus), aktuellen Biomarkern (p53, Her2/neu, bcl-2, Ki-67, nm23) sowie einer präoperativen Radiatio und dem Gesamtüberleben herausgearbeitet werden.

Besondere Bedeutung bei der zukünftigen Selektion von Patientinnen für eine neoadjuvante Therapie mit anthrazyklinhaltigen Zytostatikakombinationen könnte der Expression des Her2/neu - Onkogens und vor allem des bcl-2 – Tumorsuppressorgens zukommen, falls sich die Ergebnisse meiner Arbeit in zukünftigen prospektiven Studien mit größeren Patientinnenkollektiven bestätigten.

Bestätigte sich in weiteren prospektiven Studien die Beobachtung, dass es unter einer kombinierten präoperativen Radio-Chemotherapie deutlich häufiger zu histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) kommt, als bei einer neoadjuvanten Chemotherapie alleine, wäre dies ein Grund in Zukunft die Indikation für einen solchen Therapieansatz zu erweitern.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte in einem Gesamtkollektiv von 371 Patientinnen mit einem neu diagnostizierten invasiven Mammakarzinom die tumorbiologischen Faktoren Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptorstatus, p53-Tumorsuppressorgenexpression, Expression des Proto-Onkogens Her2/neu, nm23-Tumorsuppressorgenexpression und die Aktivität des Proliferationsmarkers Ki-67 und deren Einfluss auf die Gesamtüberlebenschancen. Dabei stellte sich heraus, dass die Prognose für diejenigen Patientinnen deutlich besser war, die östrogen- ( $p < 0.0001$ ) bzw. progesteronrezeptorpositiv ( $p < 0.0001$ ), p53 negativ ( $p = 0.0366$ ), bcl-2 positiv ( $p = 0.052$ ), Her2/neu negativ ( $p = 0.0253$ ), nm23 positiv ( $p = 0.0129$ ) und Ki-67 negativ ( $p = 0.0119$ ) waren.

In einem neoadjuvanten Subkollektiv, das aus 104 Patientinnen des Gesamtkollektivs bestand, die sowohl zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung durch eine Jetnadelbiopsie als auch bei der Sanierungsoperation über genaue Angaben zur Tumorgroße verfügten und die fast alle präoperativ mit 4 Zyklen eines Anthrazyklin-haltigen Chemotherapierregimes behandelt worden waren, wurde der Einfluss der oben genannten tumorbiologischen Faktoren auf das Responseverhalten der jeweiligen Tumoren untersucht.

Bei keiner der Patientinnen, deren Tumor das Todesrepressor-Molekül bcl-2 exprimiert, kam es zu einer histopathologischen Komplettremission (pCR) ( $p = 0,037$ ).

Die im Gesamtkollektiv prognostisch ungünstigen, Her2/neu exprimierenden Tumoren zeigten einen deutlich höheren Anteil ( $p = 0,011$ ) histopathologisch gesicherter Komplettremissionen (pCR) unter der präoperativen Chemotherapie mit Anthrazyklin.

Darüber hinaus ließ sich der Trend beobachten, dass es bei Patientinnen mit einem Ki-67 positiven Tumor häufiger zu einer pCR kam. Bei der relativ niedrigen Fallzahl wurde aber kein Signifikanzniveau erreicht.

Die Patientinnen, bei denen eine präoperative Radiatio durchgeführt worden war, hatten eine deutlich höhere Rate an histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) ( $p = 0,006$ ).

In dem von mir untersuchten Patientenkollektiv mit primären Mammakarzinomen konnte damit ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen bereits etablierten Prognosefaktoren (Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptorstatus) sowie aktuellen Biomarkern (p53, Her2/neu, bcl-2, Ki-67, nm23) und dem Gesamtüberleben herausgearbeitet werden.

Besondere Bedeutung bei der zukünftigen Selektion von Patienten für eine neoadjuvante Therapie mit anthrazyklinhaltigen Zytostatikakombinationen könnte der Expression des Her2/neu - Onkogens und vor allem des bcl-2 – Tumorsuppressorgens zukommen, falls sich die Ergebnisse meiner Arbeit in zukünftigen prospektiven Studien mit größeren Patientenkollektiven bestätigen.

Ferner sollte über eine erweiterte Indikationsstellung für eine kombinierte neoadjuvante Radio-Chemotherapie nachgedacht werden, ließe sich die Beobachtung in weiteren prospektiven Studien bestätigen, dass unter dieser Therapie die Rate histopathologisch gesicherter Komplettremissionen (pCR) deutlich höher ist als unter präoperativer Chemotherapie alleine.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ikeda T, Jinno H, Matzu A, Masamura S, Kitajima M; The role of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer treatment. *Breast Cancer* 2002;9(1):8-14
2. Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear HD; Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2672-85
3. Allegra JC, Lippman ME, Thompson EB, Simon R, Barlock A, Green L, Huff KK, Do HM, Aitken SC, Warren R; Estrogen receptor status: an important variable in predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Eur J Cancer* 1980;16:323-331
4. Clark GM, Osborne CK, McGuire WL; Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* 1984;2:1102-1109
5. Thorpe SM; Estrogen and progesterone receptor determinates in breast cancer. Technology, biology and clinical significance. *Acta Oncol.* 1988;27:1-19
6. Gajdos C, Tartter PI, Estabrook A, Gistrak MA, Jaffer S, Bleiweiss IJ; Relationship of clinical and pathologic response to neoadjuvant chemotherapy and outcome of locally advanced breast cancer. *J Surg Oncol* 2002;80(1):4-11
7. Wang J, Buchholz TA, Middleton LP, Allred DC, Tucker SL, Kuerer HM, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA; Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2002;94(12):3107-14
8. Baumann S, Köchli OR; Neoadjuvant therapy in breast cancer. *Swiss Surg* 2000;6:137-141
9. von Minckwitz G, Raab G, Schutte M, Hilfrich J, Blohmer JU, Gerber B, Costa SD, Merkle E, Eidtmann H, Lampe D, Jackisch C, du Bois A, Tulusan AH, Gademann G, Sinn HP, Caputo A, Graf E, Kaufmann M; Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer with a dose-dense combination of doxorubicin and docetaxel (Adoc) – Experience of the GEPARDO-GABG study group. *Zentralbl Gynakol* 2001;123(9):497-504
10. Gianni L, Valagussa P, Zambetti M, Moliterni A, Capri G, Bonadonna G; Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2001;28(1):13-29
11. Buchholz TA, Hill BS, Tucker SL, Frye DK, Kuerer HM, Buzdar AU, McNeese MD, Singletary SE, Ueno NT, Pusztai L, Valero V, Hortobagyi GN; Factors predictive of outcome in patients with breast cancer refractory to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer J* 2001;7(5):413-20
12. von der Haar J; Das Tumorsuppressorgen p53 beim Mammakarzinom, seine prognostische Bedeutung und sein möglicher prädiktiver Wert für die Strahlentherapie. *Düsseldorf, Univ., Diss.* 2000:1-127
13. UICC: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. *Berlin Heidelberg New York, Springer; 1997:119-26*

14. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M; Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991;352:345-7
15. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, et al.; The Bcl-2 protein: a prognostic indicator related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:499-504
16. Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, Leek RD, Fina P, Fox F, et al.; Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: a study with long-term follow-up. *Hum Pathol* 1996;27:1149-55
17. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE; p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-67
18. Reed J; Balancing cell life and death: Bax, apoptosis, and breast cancer. *J Clin Invest* 1996;97:2403-4
19. Reed JC; Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6
20. Hockenbury D, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ; Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6
21. Chen SR, Dunigan DD, Dickman MB; Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1315-25
22. Schor NF, Rudin CM, Hartman AR, Thompson CB, Tyurina YY, Kagan VE; Cell line dependence of Bcl-2-induced alteration of glutathione handling. *Oncogene* 2000;19:472-6
23. Miyashita T, Reed JC; bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992;52:5407-11
24. Lipponen P, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjanen K; Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *J Pathol* 1995;177:49-55
25. Gee JM, Ellis IO, Robertson JF, Willsher P, McClelland RA, Hewitt KN, et al.; Immunocytochemical localization of Bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer* 1994;59:619-28
26. Colleoni M, Orvieto E, Nole F, Orlando L, Minchella I, Viale G, Peruzzotti G, Robertson C, Noberasco C, Galimberti V, Sacchini V, Veronesi P, Zurrada S, Orecchia R, Goldhirsch A; Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:574-9
27. Hamilton A, Piccart M; The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on HER-2, p53 and BCL-2 (in process citation). *Ann Oncol* 2000;11:647-63
28. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Martin de Civetta MT, Ciocca DR; c-erb-2 (Her-2/neu) protein and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 1999;84:129-34

29. Vincent-Salomon A, Carton M, Freneaux P, Palangie T, Beuzeboc P, Mouret E, DeCremoux P, Coue O, Zafrani B, Nicolas A, Clough K, Fourquet A, Pouillart P, Sastre-Garau X; ERBB2 overexpression in breast carcinomas: no positive correlation with complete pathological response to preoperative high-dose anthracycline-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 2000;36:586-91
30. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ; Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer*. 2003;88:406-12
31. Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N; erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1320-1
32. Hennessy C, Henry JA, May FE, Westley BR, Angus B, Lennard TW; Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:281-5
33. Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ; C-erbB-2, p53 and nm23 gene product expression in breast cancer in young women: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 1998;29:323-9
34. Imamura H, Haga S, Shimizu T, Watanabe O, Kajiwara T, Aiba M; MIB1-determined proliferative activity in intraductal components and prognosis of invasive ductal breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res*. 1997;88:1017-23.
35. Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, Nortilli R, Pelosi G, Cetto GL; Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer*. 1997;74:433-7.
36. Collecchi P, Baldini E, Giannessi P, Naccarato AG, Passoni A, Gardin G, Roncella M, Evangelista G, Bevilacqua G, Conte PF; Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumour proliferative activity, bcl-2 expression and the relationship between tumour regression and biological markers. *Eur J Cancer* 1999;34:1701-4
37. Billgren AM, Rutqvist LE, Tani E, Wilking N, Fornander T, Skoog L; Proliferating fraction during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse-free survival. *Acta Oncol* 1999;38:597-601
38. Aryus B, Audretsch W, Gogolin F, Gripp S, Konigshausen T, Lammering G, Rohn R, Hartmann KA; Remission rates following preoperative chemotherapy and radiation therapy in patients with breast cancer. *Strahlenther Onkol*. 2000; 176:411-5
39. Colleoni M, Orvieto E, Nole F, Orlando L, Minchella I, Viale G, Peruzzotti G, Robertson C, Noberasco C, Galimberti V, Sacchini V, Veronesi P, Zurrada S, Orecchia R, Goldhirsch A; Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer*. 1999 ;35:574-9.

## 7. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Tim Ripplinger  
Geburtstag: 10.10.1974  
Geburtsort: Orsoy  
Nationalität: deutsch  
Konfession: evangelisch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1981 – 1985 Grundschole in Moers - Schwafheim  
1985 – 1994 Gymnasium in den Filder Benden in Moers  
Schulabschluss: Abitur (DN: 1,5)

### Wehrdienst

1994 – 1995 4./ Jägerbataillon 523 Lingen/Ems

### Hochschulbildung

WS 1995 – 2002 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
praktisches Jahr am Klinikum Krefeld (Wahlfach HNO)  
Frühjahr 2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut  
Frühjahr 2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: gut

### Famulaturen

1998 4-wöchige Famulatur in einer Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin  
1998 8-wöchige Famulatur in der radiologischen Abteilung des Marien-Hospital  
Düsseldorf  
1999 4-wöchige Famulatur in einer Gemeinschaftspraxis für Hals-Nasen-  
Ohrenheilkunde

### Beruflicher Werdegang

Seit Dez. 2002 Assistenzarzt in der Klinik für HNO-Krankheiten, Kopf- und Halschirurgie,  
plastische Operationen der Städtischen Kliniken Neuss  
- Lukaskrankenhaus - GmbH

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Bojahr danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rezai, dem ärztlichen Direktor der senologischen Klinik des Luisenkrankenhauses in Düsseldorf, dem das Zustandekommen der Arbeit in dieser Form zu verdanken ist und der die essentiell wichtigen klinischen Daten zur Verfügung stellte.

Des weiteren möchte ich mich ausdrücklich bei den Mitarbeitern des Instituts für Onkologische Chemie für ihre Unterstützung bedanken; insbesondere Herrn Gerd Felder danke ich für seine geduldige Hilfe in EDV-Fragen.

## Abstract

Die vorliegende Arbeit untersuchte in einem Gesamtkollektiv von 371 Patientinnen mit einem neu diagnostizierten invasiven Mammakarzinom die tumorbiologischen Faktoren Östrogen-, Progesteronrezeptorstatus, Expression des p53-Tumorsuppressorgens, des Proto-Onkogens Her2/neu, des nm23-Tumorsuppressorgens und die Aktivität des Proliferationsmarkers Ki-67 und deren Einfluss auf die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit. Dabei stellte sich heraus, dass die Prognose für diejenigen Patientinnen deutlich besser war, die östrogen- ( $p < 0.0001$ ) bzw. progesteronrezeptorpositiv ( $p < 0.0001$ ), p53 negativ ( $p = 0.0366$ ), bcl-2 positiv ( $p = 0.052$ ), Her2/neu negativ ( $p = 0.0253$ ), nm23 positiv ( $p = 0.0129$ ) und Ki-67 negativ ( $p = 0.0119$ ) waren.

In einem neoadjuvanten Subkollektiv, das aus 104 Patientinnen des Gesamtkollektivs bestand, die fast alle präoperativ mit 4 Zyklen eines Anthrazyklin-haltigen Chemotherapieregimes behandelt worden waren, wurde der Einfluss der oben genannten tumorbiologischen Faktoren auf das Responseverhalten der jeweiligen Tumoren untersucht.

Bei keiner der Patientinnen deren Tumor das Todesrepressor-Molekül bcl-2 exprimiert, kam es zu einer histopathologischen Komplettremissionen (pCR) ( $p = 0,037$ ).

Die im Gesamtkollektiv prognostisch ungünstigen, Her2/neu exprimierenden Tumoren zeigten einen deutlich höheren Anteil ( $p = 0,011$ ) histopathologisch gesicherter Komplettremissionen (pCR) unter der präoperativen Chemotherapie mit Anthrazyklin.

Darüber hinaus zeigte sich der Trend, dass es bei Patientinnen mit einem Ki-67 positiven Tumor häufiger zu einer pCR kam. Bei relativ niedriger Fallzahl wurde aber kein Signifikanzniveau erreicht.

Die Patientinnen, bei denen eine präoperative Radiatio durchgeführt worden war, hatten eine deutlich höhere Rate an histopathologisch gesicherten Komplettremissionen (pCR) ( $p = 0,006$ ).

In dem von mir untersuchten Patientenkollektiv mit primären Mammakarzinomen konnte damit ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen bereits etablierten Prognosefaktoren (Östrogenrezeptor-, Progesteronrezeptorstatus) sowie aktuellen Biomarkern (p53, Her2/neu, bcl-2, Ki-67, nm23) und dem Gesamtüberleben herausgearbeitet werden.

Besondere Bedeutung bei der zukünftigen Selektion von Patienten für eine neoadjuvante Therapie mit anthrazyklinhaltigen Zytostatikakombinationen könnte der Expression der Her2/neu - Onkogens und vor allem des bcl-2 – Tumorsuppressorgens zukommen, falls sich die Ergebnisse meiner Arbeit in zukünftigen prospektiven Studien mir größeren Patientenkollektiven bestätigten.

Ferner sollte über eine erweiterte Indikationsstellung für eine kombinierte neoadjuvante Radio-Chemotherapie nachgedacht werden, ließe sich die Beobachtung in weiteren prospektiven Studien bestätigen, dass unter dieser Therapie die Rate histopathologisch gesicherter Komplettremissionen (pCR) deutlich höher ist, als unter präoperativer Chemotherapie alleine.