

**Aus dem Institut für Pathologie und der Klinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe der Universität zu Lübeck**

Direktoren: Prof. Dr. med. A. C. Feller und Prof. Dr. med. K. Diedrich

**PROGNOSTISCHE BEDEUTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN
CLUSTERINEXPRESSION BEIM MAMMAKARZINOM**

Inauguraldissertatiom

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Medizinischen Fakultät -**

**vorgelegt von
Vladislava Ola
aus Kiew**

Lübeck 2006

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Krüger

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Michael Friedrich

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2006

Zum Druck genehmigt. Lübeck, d. 01.12.2006

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -**

GLIEDERUNG

	Seite
1. Einleitung	5
1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms	5
1.2. Ätiologie	6
1.3. Klinische Problematik des <i>in situ</i> - und des invasiven Mammakarzinoms	7
1.4. Therapie des Mammakarzinoms	8
1.4.1. Operation	8
1.4.2. Strahlentherapie	9
1.4.3. Systemische Therapie	9
1.4.3.1. Chemotherapie	9
1.4.3.2. Hormontherapie	10
1.4.4. Sentinel-Lymphknoten-Exstirpation	11
1.5. Histologische Typen des Mammakarzinoms	11
1.6. Etablierte Prognosefaktoren	12
1.6.1. Histologisches Grading	13
1.6.2. Tumorstadium	14
1.6.3. Nodalstatus	15
1.6.4. Angioinvasion	16
1.6.5. Fernmetastasierung	17
1.6.6. Hormonrezeptorstatus	17
1.6.7. HER2-Rezeptorstatus	17
1.6.8. Ki-67-Antigen	18
1.6.9. Patientenalter	19
1.7. Potenzielle neue Prognosefaktoren	19
1.7.1. uPA und dessen Inhibitor PAI-1	20
1.7.2. Bcl-2	21
1.7.3. p53	21
1.7.4. MDM2	22
1.7.5. Cyclin E	22
1.7.6. Clusterin	22
1.8. Fragestellung	24

2.	Material und Methodik	25
2.1.	Patientinnen	25
2.2.	Immunhistochemische Färbung und Auswertung	26
2.3.	Statistische Auswertung	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Immunhistochemische Färbungen	31
3.1.1.	Clusterinexpression	31
3.1.2.	Ki-67-Antigenexpression	31
3.1.3.	HER-2-Rezeptorexpression	32
3.2.	Vergleich zwischen Clusterinstatus und anderen Parametern	32
3.3.	Zusammenhang zwischen dem Clusterinstatus und der Überlebensrate	34
3.4.	Zusammenhang zwischen anderen Parametern und Überlebensrate	34
3.5.	Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse	40
3.6.	Beantwortung der unter 1.8. genannten Fragen	41
4.	Diskussion	43
4.1.	Rolle von Clusterin in der Biologie maligner humaner Tumoren	43
4.2.	Rolle von Clusterin in der Tumorbilogie des Mammakarzinoms	44
4.3.	Prognostische Rolle von Clusterin beim Mammakarzinom	45
4.4.	Prognostische Rolle von anderen Parametern beim Mammakarzinom	46
4.5.	Mögliche therapeutische Aspekte der Clusterinexpression von Mammakarzinomen	48
4.6.	Ausblick	49
5.	Zusammenfassung	50
6.	Literaturverzeichnis	52
7.	Danksagung	64
8.	Lebenslauf	65

1. EINLEITUNG

1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom repräsentiert in den westlichen Industrienationen den häufigsten malignen Tumor des weiblichen Geschlechts. In Deutschland werden jährlich etwa 46.000 und in den USA etwa 216.000 Neuerkrankungen festgestellt (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002; Jemal et al., 2004), entsprechend Inzidenzraten von 115 bzw. 144 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen pro Jahr. Trotz vielfacher Bemühungen konnte die Mortalität des Mammakarzinoms in den letzten 30 Jahren nur unwesentlich gesenkt werden. In den USA sterben jährlich nach wie vor über 40.000 Frauen am Mammakarzinom, entsprechend einer jährlichen Mortalitätsrate von etwa 28 pro 100.000 Frauen (Jemal et al., 2004).

Die Regionen, in denen die Prävalenz des Mammakarzinoms besonders hoch ist, sind neben Nordamerika und Europa auch Australien, wo 6% aller Frauen an invasivem Brustkrebs vor dem 75. Lebensjahr erkranken, während das Risiko in Afrika und Südostasien besonders niedrig ist (Ellis et al., 2003). Bezüglich des Erkrankungsalters ist festzustellen, dass der Häufigkeitsgipfel des Mammakarzinoms weltweit im 5. und 6. Lebensjahrzehnt liegt. Mammakarzinome, die vor dem 25. Lebensjahr auftreten, sind ausgesprochen selten (Ellis et al., 2003). Hinsichtlich der Rassenbevorzugung wurde in den USA beobachtet, dass Weiße und Schwarze etwa gleich häufig betroffen sind, während die Inzidenzrate bei Nachkommen indianischer Ureinwohner und bei Eskimos nur etwa halb so hoch liegt (Ries et al., 2000).

Die 5-Jahres-Überlebensrate des Mammakarzinoms wird insgesamt mit knapp 60% beziffert (van Tienhoven et al., 1999). Es existieren allerdings erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorstadien. So betragen die 5-Jahres-Überlebensraten im UICC-Stadium I 91%, im Stadium II 79%, im Stadium III 40% und im Stadium IV nur 15% (Keyomarsi et al., 2002). Die Prognose des Mammakarzinoms ist somit als relativ gut anzusehen, wenn die Diagnose in einem frühen Krankheitsstadium erfolgt.

Es wurden in mehreren Ländern Mammographie-Screening-Studien eingeführt, um das Mammakarzinom möglichst in einem frühen Stadium zu diagnostizieren. Mit Hilfe der Mammographie lassen sich heute bereits kleinere Karzinome unter 1 cm Größe nachweisen. Erste Ergebnisse haben gezeigt, dass im gescreenten Kollektiv die Mammakarzinome signifikant kleiner waren als in der Kontrollgruppe (Scheuermann et al., 1997). Gleichzeitig konnte bei den gescreenten Patientinnen dadurch eine wesentlich bessere Prognose erzielt werden. Die Fortschritte in der Früherkennung und Therapie des Mammakarzinoms haben es möglich gemacht, dass in den letzten 25 Jahren eine Erhöhung der Mortalitätsrate trotz steigender Inzidenzrate verhindert werden konnte. Andererseits verschob sich der Altersgipfel seit 1970 um 15 Jahre nach oben auf nunmehr 75-79 Jahre (Scheuermann et al., 1997).

1.2. Ätiologie

Bei der Kanzerogenese des Mammakarzinoms geht man von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Eine wichtige Rolle spielen hereditäre Faktoren, hormonelle Störungen und Umweltfaktoren. Die familiäre Disposition ist unumstritten. Frauen, deren weibliche Verwandte ersten Grades (Mutter oder Schwester) an einem Mammakarzinom erkrankten, haben ein zwei- bis neunfach erhöhtes Erkrankungsrisiko (Knörr et al., 1989). Auf molekularer Ebene wird die familiäre Prädisposition für die Entstehung von Mammakarzinomen durch Mutationen oder den Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“, LOH) in den Brustkrebsgenen BRCA1 und BRCA2 erklärt (Beckman et al., 1996).

Weitere Risikofaktoren sind frühe Menarche und späte Menopause (Menarche vor dem 12. Lebensjahr, Menopause nach dem 55. Lebensjahr), Nulliparae und späte Geburt des ersten Kindes nach dem 35. Lebensjahr (Knörr et al., 1989). Diese Risikofaktoren hängen damit zusammen, dass das Mammakarzinom ein hormonabhängiger Tumor. Als Ursache kommt eine hormonelle Imbalance im Verhältnis zwischen Östrogenen und Gestagenen mit einem relativen Gestagenmangel in Frage. Diese hormonelle Beeinflussung gilt als gesicherter Risikofaktor des Mammakarzinoms.

Zu den weiteren Risikofaktoren bei der Entstehung des Brustkrebses zählen Adipositas, Alter (die Häufigkeit von Mammakarzinomen nimmt mit dem Alter der Frau zu, allerdings verlangsamt sich der Anstieg nach der Menopause), und eine Karzinomvorgeschichte im Bereich der kontralateralen Mamma, hoher Fleischkonsum und geringe körperliche Aktivität (Ellis et al., 2003).

1.3. Klinische Problematik des *in situ*- und des invasiven Mammakarzinoms

Moderne zytogenetische Untersuchungen mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) haben gezeigt, dass sich Mammakarzinome über genetisch definierte Wege entwickeln, die bestimmten morphologischen Typen von *in situ*- und invasiven Karzinomen zugeordnet werden können. Gegenüber dem Carcinoma *in situ* ergeben sich bei invasiven Karzinomen keine groben Zugewinne an genetischen Alterationen, was darauf hinweist, dass *in situ*-Karzinome echte Vorläuferläsionen darstellen (Böcker et al., 2004).

Von *in situ*-Karzinomen sind zwei histologisch unterschiedliche Typen bekannt, zum einen das intraduktale Karzinom (DCIS) und zum anderen das Carcinoma lobulare *in situ* (LCIS). Beider Typ breiten sich innerhalb der Milchgänge bzw. Milchläppchen unter Respektierung der Basalmembran aus. Das DCIS manifestiert sich heute überwiegend durch mammographisch nachweisbare duktale Mikroverkalkungen, selten durch Mamillenausfluss oder einen palpatorisch fassbaren Tumor. Das LCIS wird fast immer zufällig im Rahmen einer Biopsie, die aufgrund von mammographisch nachweisbaren Mikroverkalkungen oder suspekten Mammaverdichtungen vorgenommen wurde, histologisch entdeckt.

Für die Bewertung des LCIS als Präkanzerose sprechen viele Indizien. Etwa 20% der Patientinnen mit bioptisch nachgewiesenem LCIS entwickeln innerhalb eines postbiopischen Beobachtungszeitraums von 25 Jahren in der gleichen Mamma ein invasives Mammakarzinom (Böcker et al., 2004).

Im Gegensatz zum *in situ*-Karzinom macht sich das invasive Mammakarzinom meist als nodulärer schmerzloser Tumor bemerkbar. Es weist mammographisch ein durch radiäre Fortsätze (Spiculae, Krebsfüßchen) gekennzeichnetes typisches Muster auf. Selten liegt zugleich ein Morbus Paget vor, der eine nicht erkennbare intraduktale Ausbreitung des Karzinoms in die Mamille anzeigt. In der Mitte der Brustdrüse oder oberflächlich lokalisierte Tumoren führen infolge ihrer retrahierenden Wirkung zur Einziehung der Mamille, der Haut oder auch zu Deformationen des Drüsenkörpers.

1.4. Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms basiert auf vier wichtigen Säulen, nämlich der Operation, der Chemotherapie, der Strahlentherapie und der Hormontherapie.

1.4.1. Operation

Im 19. Jahrhundert hatte Halsted aufgrund seiner Vorstellung über die Ausbreitungsweise des Mammakarzinoms die radikale Mastektomie eingeführt. Trotz der radikalen Operationsweise betrug die Überlebensrate nach 10 Jahren nur 12% (Fischer et al., 1978). Diese „klassische“ radikale Mastektomie wurde 60 Jahre lang als „Goldstandard“ für die Therapie aller operablen Mammakarzinome angesehen. Sie umfasste eine totale Mastektomie, die Entfernung der Mm. Pectoralis major und minor sowie Achsellymphknotenausräumung (Wertheimer, 1990). Dieses Therapiekonzept ist im Laufe der letzten Jahrzehnte weitgehend verlassen worden. Stattdessen haben sich zunehmend brusterhaltene Operationsmethoden durchgesetzt, die bei erhaltenem therapeutischem Effekt gleichzeitig eine verminderte Radikalität, einem körperlich und kosmetisch erträglichen Zustand sowie eine Verringerung der psychischen Beeinträchtigung zum Ziel haben (Knörr et al., 1989). In großen Studien konnte gezeigt werden, dass beim Vergleich der totalen Mastektomie mit der Segmentresektion keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich des rezidivfreien und Gesamtüberlebens existieren (Fischer et al., 1985; van Thienhoven et al., 1999).

1.4.2. Strahlentherapie

Die strahlentherapeutische Behandlung des Mammakarzinoms hat das Ziel der lokoregionalen Sanierung. Als Teil der kurativen Primärtherapie wird die Radiatio nach der Operation angewendet. Durch die postoperative Strahlentherapie eines operierten Mammakarzinoms lässt sich die Rate der Lokalrezidive im Vergleich zu nicht-strahlentherapeutisch behandelten Karzinomen signifikant reduzieren (Clarke et al., 2005). Bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen wird die Strahlentherapie als Palliativmaßnahme vor allem zur Schmerzlinderung bei Skelettmetastasen eingesetzt.

1.4.3. Systemische Therapie

Da das Mammakarzinom bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als eine potenziell systemische Erkrankung gilt, ist bei der Primärtherapie neben einer Operation und gegebenenfalls einer Bestrahlung auch die systemische Therapie indiziert. Eine aktuelle Auswertung der „Early Breast Cancer Trialists´ Collaborative Group“ (EBCTCG) verdeutlicht eindrucksvoll, dass die in den 1980er Jahren eingeführten adjuvanten Chemo- und Hormontherapieformen das 15-Jahres-Risiko für Todesfälle bis um etwa die Hälfte reduzieren können (Clarke et al., 2005).

1.4.3.1. Chemotherapie

Die Chemotherapie ist ein wichtiger Bestandteil des gesamten Therapiekonzeptes beim Mammakarzinom. Bisherige prospektive Studien berichten über eine Verlängerung des rezidivfreien Intervalls nach Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie, insbesondere der Patientinnen, die in der Prämenopause erkrankten (Konecny et al., 1998). Durch die Einführung der neoadjuvanten, d.h. präoperativ durchgeführten Chemotherapie ist auch bei größeren Tumoren eine höhere Rate an brusterhaltender Therapie möglich geworden (Konecny et al., 1998).

1.4.3.2. Hormontherapie

Ebenso wie die Chemotherapie hat auch die endokrine Therapie in der adjuvanten Situation das Ziel, die Tumorrezidivrate zu verhindern. Östrogene regen Tumorzellen zu Wachstum und Proliferation an. Wie *in vitro*-Untersuchungen und klinische Studien zeigen konnten, inhibiert die endokrine Therapie dabei sowohl die Proteinsynthese als auch den Zellzyklus von Tumorzellen.

Die endokrine Therapie hat einen wesentlichen Anteil an den heutzutage verbesserten Heilungschancen für Brustkrebspatientinnen. Die Hormontherapie ist bei Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positiven Mammakarzinomen, d.h. bei etwa 40 % der prämenopausalen und etwa 60 % der postmenopausalen Patientinnen, indiziert. Durch eine 5 Jahre dauernde Tamoxifen®-Behandlung kann bei Frauen jeden Alters mit hormonsensitivem Mammakarzinom die Mortalität in den nächsten 10 bis 15 Jahren um etwa ein Drittel gesenkt werden (Clarke et al., 2005).

Die Frage, ob ein Mammakarzinom auf eine Hormontherapie anspricht, rückt zunehmend in den Mittelpunkt der Therapieplanung. Auf der Konsensuskonferenz von St. Gallen 2005 wurde der Hormonrezeptorstatus als wichtigstes Kriterium nicht nur für die Erfolgsaussichten einer endokrinen Therapie, sondern auch einer Chemotherapie angesehen, und zwar unabhängig von Lymphknotenstatus (Goldhirsch et al., 2005).

Wesentliches Ziel der endokrinen Therapie ist es, die Wirkung der Östrogene auf Karzinomgewebe zu reduzieren oder zu unterbinden. Nachdem über lange Zeit Tamoxifen® das endokrine Standardtherapeutikum für postmenopausale Mammakarzinompatientinnen war, findet in den letzten Jahren mit der Einführung der Aromatasehemmstoffe ein Paradigmenwechsel statt. Es ist zu erwarten, dass die Wahrscheinlichkeit für betroffene Frauen an Brustkrebs zu sterben, mit der Einführung neuer Therapieoptionen, wie sie die Aromatasehemmer darstellen, weiter abnehmen wird.

1.4.4. Sentinel-Lymphknoten-Exstirpation

Durch die qualitätsgesicherte Implementierung der Sentinel-Lymphknoten-Exstirpation in Deutschland soll eine weitere Reduzierung der therapiebedingten Morbidität, die durch die vollständige axilläre Nodektomie verursacht wird und die in erster Linie durch Lymphödeme am Arm gekennzeichnet ist, erzielt werden. Eine erste randomisierte Studie hat vorläufige Ergebnisse zur Kurzzeitprognose veröffentlicht, die die Zuverlässigkeit dieser Methode belegen. Gleichzeitig konnte eine signifikante Reduktion der Morbidität festgestellt werden. Die seit Anfang 2004 geltende neue TNM-Klassifikation der UICC hat die Sentinel-Methode konsequenterweise berücksichtigt (Haller et al., 2004).

1.5. Histologische Typen des Mammakarzinoms

Der mit einem Anteil von 70-80% häufigste Typ unter den invasiven Mammakarzinomen ist das invasive duktales Karzinom, welches keinem speziellen Typ zuzuordnen ist („not otherwise specified“, NOS). An zweiter Stelle steht das invasive lobuläre Karzinom (ca. 10-15%), gefolgt von selteneren Typen wie dem medullären, tubulären und invasiven kribriformen Karzinomen (jeweils ca.2%). Alle anderen Karzinomformen (tubuläres, kleinzelliges, adenoidzystisches oder sekretorisches Karzinom) machen jeweils nur einen Anteil von weniger als 1% aus (Ellis et al., 2003).

Bezüglich der Prognose ist zu sagen, dass einige seltene Typen wie das tubuläre und das medulläre Mammakarzinom eine im Vergleich zum „gewöhnlichen“ duktales Karzinom bessere Prognose aufweisen (Ellis et al., 2003). Die Frage, welcher der beiden häufigsten Karzinomtypen (duktales versus lobuläres Mammakarzinom) die bessere Prognose aufweist, wird in der Literatur nicht einheitlich beantwortet (Ellis et al., 2003). Daher wurde in der vorliegenden Studie auch untersucht, ob sich duktales von lobulären Mammakarzinomen hinsichtlich ihrer Prognose unterscheiden.

1.6. Etablierte Prognosefaktoren

Die individuelle Prognose einer Patientin mit Mammakarzinom hängt von der komplexen Interaktion verschiedener tumorbezogener Faktoren ab. Demnach sind in diesem Zusammenhang von grundlegender Bedeutung:

- die Verdopplungszeit
- die Proliferationsrate
- das invasive Verhalten und
- das metastatische Potenzial des Tumors.

Bei der Betrachtung von Prognosefaktoren ist generell zu unterscheiden zwischen den gesicherten, „klassischen“ Prognosefaktoren, deren Bedeutung in unabhängigen Studien belegt ist, und den sogenannten „neueren“ Faktoren, deren prognostische Bedeutung in Hinblick auf einen Einfluss auf das rezidivfreie, metastasenfremde und/oder Gesamtüberleben der Patientinnen zum Teil noch nicht mit genügender Evidenz belegt ist. Die Bestimmung von Prognosefaktoren hat generell das Ziel, den individuellen Krankheitsverlauf prospektiv möglichst genau abzuschätzen. Hiervon unterschieden werden müssen die so genannten prädiktiven Faktoren, die Therapieerfolg und Therapieansprechen vorhersagen.

Beim Mammakarzinom gehören zu den klassischen Prognosefaktoren:

- das histopathologische Grading
- das Tumorstadium (pT-Status)
- der axilläre Lymphknotenstatus (pN-Status)
- der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie
- das Patientenalter (bzw. der Menopausenstatus).

Zusätzlich wurden auf der Konsensus-Konferenz 2005 in St. Gallen (Goldhirsch et al., 2005) als weitere Prognosefaktoren für die Risikoklassifikation ergänzt:

- der HER2-Rezeptorstatus
- die peritumorale Gefäßinvasion (Angioinvasion).

Nach der aktuellen WHO-Klassifikation (Ellis et al., 2003) ist darüber hinaus auch die Ki-67-Proliferationsrate dazu geeignet, Mammakarzinompatientinnen mit guter Prognose von solchen mit schlechter Prognose zu unterscheiden.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit die Parameter Grading, Tumorstadium, Nodalstatus, Angioinvasion, Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus, HER2-Rezeptorstatus, Ki-67-Index und Patientenalter als „etablierte“ Prognosefaktoren mitberücksichtigt. Zu den einzelnen Prognosefaktoren erfolgen nachstehend noch einige nähere Erläuterungen.

1.6.5. Histopathologisches Grading

Das histopathologische Grading ist schon seit Langem als wichtiges Prognosekriterium beim Mammakarzinom bekannt. Neben einem mittlerweile seit fast 50 Jahren etablierten Gradingsschema nach Bloom und Richardson (1957), das ein rein nukleäres Gradingsschema darstellt, ist das von Elston und Ellis (1991) entwickelte Gradingsschema mittlerweile am weitesten verbreitet. Bei dem letzteren Schema werden die Tubulusbildung, die Kernpolymorphie und die Mitoserate mittels einer Punktesystems semiquantitativ bewertet. Anhand der Gesamtsumme der Punkte (Gesamtscore) wird anschließend der Differenzierungsgrad als Grad 1 (G1, gut differenziert), Grad 2 (G2, mittelgradig differenziert) und Grad 3 (G3, schlecht differenziert) angegeben.

Genauere Details zur Berechnung des Gesamtscores finden sich in der nachfolgenden Tabelle 1.

Tabelle 1:

Kriterien des Mammakarzinom-Gradings nach Elston und Ellis (1991)*

Merkmal	Kriterien	Score-Werte
Tubulusbildung	>75%	1
	10-75%	2
	>10%	3
Kernpolymorphie	Gering	1
	mittelgradig	2
	schwer	3
Mitoserate (Mitosen pro „high power field“ (HPF) bei 400-facher Vergrößerung)	0-1 / HPF	1
	1-2 / HPF	2
	≥ 3 / HPF	3

* Scoresummen zwischen 3 und 5 entsprechen einem Grad 1, solche zwischen 6 und 7 einem Grad 2 und solche zwischen 8 und 9 einem Grad 3

Die prognostische Relevanz dieser Klassifikation ist hinreichend belegt (Pereira et al., 1995). In einigen Studien ist das histologische Grading sogar noch vor dem Nodalstatus der wichtigste Prognosefaktor (Pereira et al., 1995; Pinder et al., 1995). Es besteht auch eine eindeutige Abhängigkeit zwischen dem histologischen Grading und dem rezidivfreien Überleben (Harbek et al., 2003).

1.6.2. Tumorstadium

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (Wittekind et al., 2002). Mit dieser Klassifikation kann man den Tumordurchmesser (T), den Lymphknotenbefall (N) und die Metastasierung (M) sehr differenziert beschreiben. Die genaue Definition des Tumorstadiums ist in der folgenden Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach der UICC

Tumorstadium		Definition
T1	T1mic	Mikroinvasion ($\leq 0,1$ cm in grösster Ausdehnung)
	T1a	$> 0,1$ cm, aber $\leq 0,5$ cm in grösster Ausdehnung
	T1b	$> 0,5$ cm, aber $\leq 1,0$ cm in grösster Ausdehnung
	T1c	$> 1,0$ cm, aber $\leq 2,0$ cm in grösster Ausdehnung
T2		$> 2,0$ cm, aber $\leq 5,0$ cm in grösster Ausdehnung
T3		$> 5,0$ cm in grösster Ausdehnung
T4	T4a	Tumorausdehnung auf die Brustwand
	T4b	Ödem (z.B. Apfelsinenhaut) oder Ulzeration der Haut oder kutane Satellitenknötchen der gleichen Mamma
	T4c	beide Kriterien pT4a und pT4b sind erfüllt
	T4d	entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

1.6.2. Nodalstatus

Der Nodal- oder Lymphknotenstatus (pN-Status) stellt ein Maß für die Invasion der axillären Lymphknoten durch Tumorzellen dar. Bei der herkömmlichen axillären Nodektomie werden Lymphknoten aus den Leveln I und II entfernt. Insgesamt werden die axillären und interpektoralen (Rotter)-Lymphknoten entlang der V. axillaris und ihrer Äste in drei Level unterteilt: Level 1 beschreibt Lymphknoten lateral des lateralen Randes des M. pectoralis minor, Level 2 Lymphknoten zwischen dem lateralen und medialen Rand des M. pectoralis minor sowie interpektorale Lymphknoten, und Level 3 Lymphknoten medial des medialen Randes des M. pectoralis minor einschließlich der als subklavikulär, infraklavikulär oder apikal bezeichneten Lymphknoten (Bender und Schnürch, 1991).

Das Ausmaß der axillären Lymphknotenmetastasierung hat eine sehr große Bedeutung für die Prognoseeinschätzung der Mammakarzinompatientin, wie in zahlreichen Studien bewiesen werden konnte (Carter et al., 1989; Elston et al., 1999; Pfeiderer, 2000; Turbin et al., 2006). Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom der stärkste Prognosefaktor für das rezidiv- und metastasenfrem Überleben sowie für das Gesamtüberleben. Hierbei korreliert die Anzahl der

befallenen Lymphknoten direkt mit dem Risiko des Rezidivs und des krankheitsbedingten Todes. Eine prognostische Bedeutung besitzt dabei insbesondere die Anzahl der befallenen Lymphknoten (Harbek et al., 2003; Dixon et al., 2005). Dies wird insbesondere durch die Daten von Dixon et al. (2005), die in der nachstehenden Tabelle 3 wiedergegeben werden, eindrucksvoll belegt.

Tabelle 3:

Zusammenhang zwischen der Zahl metastasenbefallener axillärer Lymphknoten sowie der absoluten und relativen 5- und 10 Jahres-Überlebensrate (nach Dixon et al., 2005)

Zahl befallener Lymphknoten (Anzahl der Patientinnen)	5-Jahres-Überlebensrate, absolut / relativ	10-Jahres-Überlebensrate, absolut / relativ
0 (2245)	89% / 96%	77% / 71%
1 (488)	79% / 85%	59% / 71%
2 (326)	77% / 83%	55% / 65%
3 (208)	72% / 78%	51% / 62%
4-6 (328)	63% / 68%	46% / 56%
7-10 (277)	50% / 54%	33% / 39%
11-15 (163)	46% / 51%	16% / 20%
>15 (178)	33% / 37%	18% / 23%

1.6.3. Angioinvasion

Das Einwachsen von Tumorzellen in Lymph- und/oder Blutgefäße stellt einen Indikator für eine lymphogene bzw. hämatogene Metastasierung dar. Dieses Phänomen kann auch bei Patientinnen, die einen nativem Nodal- bzw. Fernmetastasierungsstatus aufweisen, vorkommen. Der histologische Nachweis einer solchen Angioinvasion stellt einen eigenständigen, unabhängigen prognostischen Faktor dar (Ellis et al., 2003; Mattfeld et al., 2004). Eine Lymphangiosis und/oder Hämangiosis carcinomatosa soll daher nach den Empfehlungen der aktuellen TNM-Klassifikation (Wittekind et al., 2002) vom Pathologen bei der Angabe des TNM-Schlüssels explizit mitbenannt werden.

1.6.4. Fernmetastasierung

Das Mammakarzinom repräsentiert einen Tumor mit relativ hoher Tendenz sowohl zur lymphogenen als auch zur hämatogenen Metastasierung. Die Metastasierung erfolgt schon sehr frühzeitig und im Einzelfall unberechenbar über den Blut- und Lymphweg (Böcker et al., 2004). Einzelheiten zur nodalen Metastasierung wurden bereits unter 1.5.3. besprochen. Bezüglich der hämatogenen Fernmetastasierung des Mammakarzinoms ist festzustellen, dass die häufigsten Fernmetastasen im Skelettsystem (70%), in der Lunge (60%) und in der Leber (50%) gefunden werden. Bei Nachweis hämatogener Metastasen ist derzeit die Überlebenschance sehr gering (Böcker et al., 2004).

1.6.5. Hormonrezeptorstatus

Ein weiterer, mittlerweile anerkannter Prognosefaktor ist der Steroidhormonrezeptorstatus. Dieser hat nicht nur prognostische, sondern auch eine prädiktive Bedeutung (Fasching et al., 2005). Allerdings nimmt die prognostische Vorhersagekraft des Steroidhormonrezeptorstatus mit der Dauer der Nachbeobachtungszeit ab und wird stark von der adjuvanten Therapie beeinflusst (Harbek et al., 2003). Zirkulierende Östrogene und andere Steroidhormone können in die Zelle eindringen und am Östrogenrezeptor binden. Dieser Komplex stimuliert die nukleäre Proteinsynthese und somit Wachstum und Proliferation der Zelle (Donegan, 1992).

Die heutige Bedeutung erlangten Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus durch die Entwicklung nichtinvasiver therapeutischer Möglichkeiten, wie z.B. den Antiöstrogenen vom Tamoxifen®-Typ (Donegan, 1992).

1.6.6. HER2-Rezeptorstatus

HER2 ist ein 185 kDa großes Protein, welches durch das auf dem Chromosom 17 lokalisierte HER2-Onkogen (auch „*c-erb-B2*“-Onkogen genannt) kodiert wird. Das Protein fungiert als transmembranöser Tyrosinkinase-Rezeptor vom Typ des „epider-

mal growth factor“-Rezeptors (EGFR). Eine durch Liganden-Rezeptor-Bindung aktivierte Tyrosinkinase setzt intrazelluläre Signalübertragungen in Gang, welche Einfluss auf das Wachstum, Differenzierung und Überleben der Zelle nehmen. Eine Überexpression von HER2 wurde für zahlreiche Tumorarten – u.a. für Karzinome des Ovars (Slamon et al., 1989), Uterus (Rolitsky et al., 1999), der Lunge (Cox et al., 2001), des Magens (Yonemura et al., 1998), der Harnblase (Krüger et al., 2002) oder der Prostata (Ross et al., 1997), in erster Linie aber für das Mammakarzinom (Slamon et al., 1987) – beschrieben.

Aus tumorbiologischer Sicht ist die HER2-Überexpression mit einer erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen, einem erhöhtem angiogenetischen Potenzial sowie einer verminderten Zelladhäsion assoziiert. Beim Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass in ungefähr 20-30% der Fälle eine Überexpression des HER2-Gens vorliegt, welche auch mit einem schlechteren klinischen Verlauf korreliert (Tzahar et al., 1996). Daher wird die Expression von HER2 als wichtiger prognostischer Faktor insbesondere bei Patientinnen, die bereits Lymphknotenmetastasen entwickelt haben, angesehen (Toikkanen et al., 1992). Weiterhin konnte am Mammakarzinom die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie mit dem monoklonalen Antikörper Transtuzumab (Herceptin®) und einem Chemotherapeutikum bei HER2-überexprimierenden Tumoren gezeigt werden (Slamon et al., 2001; Ranson und Shiwkowski, 2002).

1.6.7. Ki-67-Antigen

Das Ki-67-Antigen, benannt nach dem ersten zu seiner Detektion verfügbaren Antikörper (Gerdes et al., 1983) („Ki“ steht dabei für „Kiel“ und weist auf das Institut für Pathologie der Kieler Universitätsklinik hin), stellt ein nukleäres Protein dar, dessen Funktion bislang weitgehend unbekannt ist (Scholzen und Gerdes, 2000; Endl und Gerdes, 2000). Es kann in allen Phasen des Zellzyklus außer in der G₀-Phase nachgewiesen werden (Gerdes et al., 1984). Somit erlaubt der immunhistochemische Nachweis des Ki-67-Antigens einen guten Einblick in die proliferative Aktivität von neoplastischen und nicht-neoplastischen Geweben. In der Regel wird der Ki-67-Index zur Auszählung des Anteils der positiv gefärbten (d.h. das Ki-67-An-

tigen exprimierenden) Tumorzellen innerhalb einer großen Gesamtzahl an Tumorzellen bestimmt. Unter den zur Verfügung stehenden Antikörpern hat sich der MIB1-Antikörper, der problemlos am formalinfixierten, paraffineingebetteten Material anwendbar ist (Cattoretti et al., 1992), mittlerweile in der Praxis durchgesetzt.

Die Bedeutung des Ki-67-Index als unabhängiger Prognosefaktor bei der Beurteilung der Rezidiv- und/oder Metastasierungsrate sowie des Gesamtüberlebens von Patientinnen mit Mammakarzinomen ist durch zahlreiche Studien belegt (Railo et al., 1993; Pinder et al., 1995; Domagala et al., 1996; Pierga et al., 1996; Molino et al., 1997; Umemura et al., 1998; Lau et al., 2001).

1.6.8. Patientenalter

Es ist bekannt, dass jüngere Mammakarzinompatientinnen eine schlechtere Prognose aufweisen als ältere (Nixon et al., 1994). Bei Patientinnen, die jünger als 35 Jahre sind, werden im Vergleich zu älteren auch häufiger Lymphknotenmetastasen gefunden (Ellis et al., 2003). Daher wird das Patientenalter als ein Parameter mit prognostischer Relevanz, auch wenn seine Aussagekraft in den meisten publizierten Studien nicht an die der anderen etablierten prognostischen Parameter heranreicht.

1.7. Potenzielle neue Prognosefaktoren

Die Anforderungen an einen neuen Prognosefaktor sind hoch. Voraussetzung für die Anerkennung eines neuen Parameters ist, dass seine prognostische Relevanz statistisch einwandfrei und reproduzierbar in unabhängigen, prospektiven Studien belegt werden kann (Harbek et al., 2003).

In den letzten Jahren hat man für das Mammakarzinom zahlreiche neue Faktoren identifiziert, die möglicherweise eine Rolle beim Verlauf der Erkrankung spielen. Diese Faktoren sind teils morphologischer, teils zellkinetischer, teils molekularbiologischer Natur (Harbek et al., 2003). Exemplarisch werden hier einige dieser Faktoren

– u.a. tumorassoziierte Proteolysefaktoren wie der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und dessen Inhibitor (PAI-1), das Tumorsuppressorgen p53, der Apoptoseinhibitor Bcl-2, das Onkoprotein MDM2, das zellzyklusabhängige Protein Cyclin E sowie das „Multifunktionsprotein“ Clusterin – näher vorgestellt. Die vorliegende Studie fokussierte sich allerdings nur auf den letztgenannten Parameter (Clusterin).

1.7.1. uPA und dessen Inhibitor PAI-1

uPa und PAI sind tumorassoziierte Proteolysefaktoren, die am Abbau des Tumorstromas und der Basalmembran beteiligt sind und die so zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen beitragen. Gemeinsam mit dem uPA-Rezeptor ermöglichen sie die gerichtete Invasion der Tumorzellen und spielen eine wichtige Rolle bei Adhäsion und Migration von Tumorzellen (Andreasen et al., 1997).

Wie in einer Metaanalyse (n=8377) bestätigt werden konnte, gehen hohe Konzentration von uPa und/oder PAI-1 im Primärtumor mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko und einem kürzeren Gesamtüberleben einher (Look et al., 2002). Eine multizentrische prospektiv randomisierte Therapiestudie („Chemo N0“), die im Tumorzentrum München durchgeführt wurde, bestätigte die unabhängige signifikante prognostische Bedeutung dieser Faktoren. Nodal-negative Patientinnen mit niedrigem uPA und PAI-1 im Primärtumor haben eine sehr gute Prognose, sodass eine adjuvante Chemotherapie bei diesen Patientinnen nicht indiziert scheint (Jänicke et al., 2001).

Eine weitere große retrospektive Studie konnte zeigen, dass Mammakarzinom-Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1 einen signifikant größeren Nutzen von adjuvanter Chemotherapie haben als Patientinnen mit niedrigem uPA/PAI-1 (Harbek et al., 2002).

1.7.2. Bcl-2

Bcl-2 stellt ein durch das auf Chromosom 18q21 lokalisierte *bcl-2*-Gen kodiertes Protein dar, das als Inhibitor des programmierten Zelltodes (Apoptose) fungiert. Aufgrund dieser Eigenschaft bewirkt Bcl-2 in Tumorzellen, die dieses Protein (über-)exprimieren, einen Überlebensvorteil. Bcl-2 wird durch das Apoptose-induzierende p53-Protein normalerweise herabreguliert. In Mammaepithelien korreliert die Bcl-2-Expression signifikant mit der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren (Bhargava et al., 1994), jedoch nicht mit der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67-Antigen (Gee et al., 1994). Die Beziehung zwischen der Bcl-2-Expression und der Prognose von Mammakarzinomen ist gegenwärtig noch nicht eindeutig geklärt. Zhang et al. (1998) stellten in einem Review-Artikel fest, dass die Bcl-2-Expression beim Mammakarzinom mit einer besseren Ansprechen auf eine Hormontherapie korreliert und daher – unabhängig vom Nodalstatus – einen Indikator für eine eher günstige Prognose darstellt.

1.7.3. p53

Mutationen dieses auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisierten Tumorsuppressorgens zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei humanen Malignomen und werden in etwa 60% aller humanen Karzinome beobachtet (Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). Das mutierte p53-Protein weist mit ca. 4 Stunden eine im Vergleich zum Wildtyp-Protein (6-20 Minuten) deutlich verlängerte Halbwertszeit auf (Finlay et al., 1988). Daher ist der Nachweis einer starken immunhistochemischen p53-Reaktivität in malignen Tumoren eng mit einer zugrunde liegenden Mutation des p53-Gens korreliert. Eine solche immunhistochemische p53-Überexpression wird in 19 - 35 % der invasiven duktaalen Mammakarzinome beobachtet (Hurlimann, 1993; Visscher et al., 1993; Umekita et al., 1994; Bartley und Ross, 2002). Bei nodal-positiven Mammakarzinomen wurde eine signifikante Assoziation zwischen positivem p53-Status und schlechterem Gesamtüberleben beschrieben (Visscher et al., 1993; Dublin et al., 1997). Andere Studien fanden dagegen keine prognostische Signifikanz des p53-Status (Hurlimann, 1993; Visscher et al., 1993), sodass die genaue prognostische Wertigkeit von p53 beim Mammakarzinom uneinheitlich beurteilt wird.

1.7.4. MDM2

Das 90 kDa schwere MDM2-Onkoprotein kann sowohl mit mutiertem als auch mit Wildtyp-p53-Protein einen Komplex bilden und spielt bei der Inhibition der p53-Funktion eine Rolle (Oliner et al., 1993). Bei humanen Tumoren kann MDM2 an der Tumorigenese sowohl durch Amplifikation des *MDM2*-Gens als auch durch erhöhte Transkription bzw. Translation mitwirken (Freedman et al., 1999). Bei Mammakarzinomen wird eine signifikante MDM2-Expression in 7-14% der Tumoren vorgefunden (McCann et al., 1995; Turbin et al., 2006). In zwei Studien wurde die MDM2-Expression bislang als unabhängiger Prognosemarker beim Mammakarzinom beschrieben (Jiang et al., 1997; Turbin et al., 2006).

1.7.5. Cyclin E

Das 50 kDa schwere Cyclin E-Protein reguliert in normalen und neoplastischen Zellen innerhalb des Zellzyklus den Übergang von der G1- in die S-Phase. In zwei Studien über invasive duktales Mammakarzinome wurde berichtet, dass die immunhistochemische Cyclin E-Expression in der univariaten Analyse mit der Prognose der Patientinnen korrelierte (Porter et al., 1997; Donnellan et al., 2001). Allerdings erwies sich dieser Faktor in der Multivariatanalyse nicht als unabhängiger Prognosefaktor.

1.7.6. Clusterin

Clusterin – synonym auch als Apolipoprotein J, Complement Lysis Inhibitor, Glykoprotein 2, Glycoprotein-2, SGP-2, SP 40-40, pg80, TRPM2 oder T54 bezeichnet – ist ein ubiquitär vorkommendes, 80 kDa schweres Protein, das aus zwei durch Disulfidbrücken miteinander verbundenen Untereinheiten besteht und mit einer Vielzahl von Molekülen interagieren kann. Die Beteiligung von Clusterin an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie Lipidtransport, Regulation der Komplementkaskade, Spermienmaturation, Immunregulation, Regulation der Apoptose, Recycling von Zellmembranen, Beeinflussung der epithelialen Zelldifferenzierung, Transformation und Tumorigenese ist bekannt (Jenne und Tschopp, 1992; Jordan-Stark et al., 1992; Fritz et

al., 1993; Witte et al., 1994; Calvo et al., 1998; Correa-Rotter et al., 1998; Wunsche et al., 1998; O'Sullivan et al., 2003).

Clusterin tritt in zwei Isoformen auf: Einerseits in einer nur im Zytoplasma vorhandenen Isoform, der eine zytoprotektive (anti-apoptotische) Wirkung nachgesagt wird, und andererseits in einer im Zellkern exprimierten Isoform, die offenbar eine proapoptotische Wirkung besitzt (Criswell et al., 2003). Bei einer Vielzahl von malignen Tumoren wurde eine – überwiegend zytoplasmatische – Expression von Clusterin bereits beschrieben, so u.a. bei Prostatakarzinom (Steinberg et al., 1997; Scaltriti et al., 2004), Harnblasenkarzinom (Miyake et al., 2002; Krüger et al., 2006), Nierenzellkarzinom (Miyake et al., 2004b), Kolonkarzinom (Chen et al., 2003; Pucci et al., 2004), hepatozellulärem Karzinom (Kang et al., 2004), Pankreaskarzinom (Xie et al., 2002) oder großzellig-anaplastischem Lymphom (Wellmann et al., 2000; Nascimento et al., 2004). Einige dieser Studien berichteten auch über einen Zusammenhang zwischen der Clusterinexpression einerseits und dem Grading, Tumorstadium und/oder biologischen Verlauf andererseits (Steinberg et al., 1997; Miyake et al., 2002; Kang et al., 2004; Krüger et al., 2006).

Bezüglich des Mammakarzinoms existiert in der Literatur bislang erst eine Studie, die die immunhistochemische Clusterinexpression an einem größeren Kollektiv untersuchte (Redondo et al., 2000). Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers E5 wurde hier eine signifikante zytoplasmatische Clusterinexpression in 53% der insgesamt 114 untersuchten Mammakarzinome beschrieben. Eine nukleäre Clusterinexpression wurde nur bei sehr wenigen Karzinomen vorgefunden, und das normale Mammaepithel erwies sich in der zitierten Studie durchgängig als Clusterin-negativ. Ein Vergleich mit klinikopathologischen Parametern ergab, dass die Clusterinexpression signifikant positiv mit dem Tumorstadium, Grading und der nodalen Metastasierung sowie negativ mit dem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus korrelierte, während sich jedoch mit dem Überleben der Patientinnen kein signifikanter Zusammenhang ergab. Bezüglich der Karzinomvorläuferläsionen konnten Redondo und Mitarbeiter zeigen, dass eine Clusterinexpression in 0% der Fälle von normalem Mammagewebe, in 19% der Fälle mit benignen Mammaläsionen (Fibroadenome und duktales Hyperplasien ohne Atypien), in 47% der Fälle mit atypischer

duktaler Hyperplasie (ADH) und in 49% der Fälle mit duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS) bestand.

Da der in der zitierten Studie von Redondo et al. (2000) verwendete Antikörper nicht kommerziell erhältlich ist, sollte in der vorliegenden Studie die Clusterinexpression Hilfe des monoklonalen Antikörpers 7D1 (Novocastra, Newcastle, UK) an einem größeren Kollektiv von Mammakarzinomen (n = 141) untersucht werden.

1.8. Fragestellung

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit lässt sich wie folgt zusammenfassen:

- A. Wie groß ist der Anteil von Mammakarzinomen, der eine signifikante Clusterinexpression (bestimmt mit Hilfe des 7D1-Antikörpers) aufweist?
- B. Korreliert die Clusterinexpression mit anderen Prognosefaktoren (Tumorstadium, Nodalstatus, Hormon- und HER2-Rezeptorstatus, Ki67-Index), mit dem Alter oder dem histologischen Typ?
- C. Zeigt die Clusterinexpression in der univariaten Cox-Regressionsanalyse einen signifikanten Zusammenhang mit dem Rezidiv- bzw. Metastasierungsverhalten der Mammakarzinome?
- D. Erweist sich die Clusterinexpression in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse gar als unabhängiger prognostischer Parameter?

2. Material und Methodik

2.1. Patientinnen

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 141 Fälle von primären invasiven Mammakarzinomen (122 duktale, 19 lobuläre Karzinome) untersucht, bei denen der weitere klinische Verlauf über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten bekannt war. Die Fälle wurden aus dem Archiv des pathologischen Institutes des Städtischen Klinikums Lüneburg gewonnen. Alle 141 Patientinnen waren in der Klinik für Gynäkologie des Städtischen Krankenhauses Lüneburg in den Jahren 1996 bis 1998 primär operiert worden, wobei jeweils auch eine axilläre Nodektomie erfolgte. Keine der Patientinnen hatte zuvor eine systemische Therapie erfahren. Entsprechend den 1996 bis 1998 im Klinikum Lüneburg angewendeten Behandlungsrichtlinien erhielt die Mehrzahl der Patientinnen nach der Primäroperation eine lokale bzw. axilläre Radiatio (n = 104; 74%) bzw. eine antihormonelle Therapie mit Tamoxifen® (n = 105; 74%), und ein Teil der Patientinnen – vornehmlich solche mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen – erhielt zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie (n = 55, 36%).

Die histologische Diagnose lautete in allen Fällen „invasives Mammakarzinom“, wobei 122 mal der duktale und 19 mal der lobuläre Typ vorlag. Das Tumorstadium wurde nach den Richtlinien der „Union Internationale contre le Cancer“ (UICC) angegeben (Wittekind et al., 2002). Jeweils 58 Patientinnen wiesen die Stadien pT1 und pT2, 17 Patientinnen das Stadium pT3 und 8 Patientinnen das Stadium pT4 auf. Eine Angiosis carcinomatosa lag in 33 Fällen (23%), eine nodale Metastasierung in 61 Fällen (43%) vor. In 3 Fällen war der Nodalstatus aufgrund einer fehlenden axillären Nodektomie unbekannt. Der Östrogen- und Progesteron-rezeptorstatus war primär im Institut für Pathologie des Krankenhauses Lüneburg bestimmt worden (mit Ausnahme von 5 Fällen) und war in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle positiv (83% für den Östrogen- und 78% für den Progesteronrezeptor).

Die Patientinnen waren bei Erstdiagnose im Mittel 62 Jahre alt (Spannweite: 32-91 Jahre) und wurden über einen durchschnittlichen Zeitraum von 54 Monaten (Spannweite: 6-103 Monate) nachbeobachtet. Während des Follow-ups wurde bei 56

Patientinnen (40%) nach durchschnittlich 34 Monaten (Spannweite: 4-96 Monate) eine Fernmetastasierung und bei 47 Patientinnen (33%) nach durchschnittlich 27 Monaten (Spannweite: 4-73 Monate) ein Lokalrezidiv festgestellt. Angaben über den Todeszeitpunkt lagen bei wenigen Patientinnen vor, wurden jedoch in der vorliegenden Studie nicht mitberücksichtigt. Ohnehin war bei diesen Patientinnen aufgrund von nicht stattgefundenen Obduktionen die genaue Todesart ungeklärt geblieben.

2.2. Immunhistochemische Färbung und Auswertung

Von allen 141 Patientinnen wurden Paraffinblöcke mit repräsentativem Tumorgewebe aus dem Institut für Pathologie (KH Lüneburg) herausgesucht. Es wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die immunhistochemischen Färbungen wurde nach der Immunperoxidase-methode mit Diaminobenzidine (DAB) als Chromogen durchgeführt, wobei jeweils bei jedem Färbegang eine Positiv- und Negativkontrolle (Fälle mit zuvor erprobter positiver bzw. negativer Reaktivität gegenüber dem jeweiligen Antikörper) mitgeführt wurden. Die verwendeten Antikörper sind in der nachstehenden Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper/Reagenzien

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung
Clusterin	7D1 (Maus, monoklonal)	Novocastra, Newcastle, UK	1:50
Ki-67-Antigen	MIB-1 (Maus, monoklonal)	Dako, Glostrup, Dänemark	1:20
HER2	A0485 (Kaninchen, polyklonal)	Dako, Glostrup, Dänemark	im HercepTest® vorverdünnt

Es wurden folgenden Arbeitsschritte durchgeführt:

- 1)** Vorbehandlung der Paraffinschnitte durch das Entparaffinieren (3 x 10 Minuten Xylol); anschließend zwei Mal Spülen in 100 %-igem und 80 %-igem Alkohol
- 2)** Zur Antigendemaskierung: 45-minütiges Garen in einem Dampfgarer (Clusterin) oder 10-minütige Mikrowellenvorbehandlung bei 750 W (Ki-67 Antigen und HER2)

- 3)** Nach der Umrahmung der Schnitte mit einem Fettstift („Pub-Pen“), um den Substanzbedarf zu minimieren, kurzes Spülen in Tris-Puffer
- 4)** Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 Minuten, anschließend kurzes Spülen in Tris-Puffer
- 5)** Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper für 15 Minuten.
- 6)** Blockierung der endogenen Peroxidase mit dem „Peroxidase Blocking System“ für 3 x 5 Minuten und anschließendes Spülen in Tris-Puffer
- 7)** Einwirken des Streptavidin-HRP-Komplexes für 15 Minuten, anschließend erneutes Spülen in Tris-Puffer
- 8)** Färben der Schnitte mit dem Chromogen DAB für 8 Minuten
- 9)** Spülen mit Leitungswasser.
- 10)** Gegenfärben mit Hämatoxin für 3 Minuten.
- 11)** Spülen mit Leitungswasser für 3 min.
- 12)** Spülen in der aufsteigende Alkoholreihe
- 13)** abschließendes maschinelles Eindeckeln der Schnitte.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte an einem Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Göttingen). Innerhalb der Schnitte wurden stets diejenigen Areale ausgewertet, in denen die Anfärbung am kräftigsten war.

Bezüglich der Clusterin-expression wurde – entsprechend den Empfehlungen von Redondo et al. (2000) – ein Fall dann als positiv gewertet, wenn eine kräftige Zytoplasmafärbung in mindestens 10% der Tumorzellen erkennbar war. Bei der Auswertung der mit dem MIB1-Antikörper gefärbten Schnitte wurde der Ki-67-Index durch Ermitteln des Anteils positiv gefärbter Tumorzellen innerhalb einer Gesamtzellzahl von mindestens 500 Tumorzellen ermittelt. Die Auswertung der mit dem HercepTest® gefärbten Schnitte erfolgte durch semiquantitative Ermittlung des HER2-Scores gemäß der Richtlinien des Herstellers (Dako, Glostrup, Dänemark). Die einzelnen Kriterien sind in der folgenden Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Kriterien der HER2-Scoreeinteilung

Score	Definition	Beurteilung des HER2-Status
0	Membranfärbung in $\leq 10\%$ der Tumorzellen	negativ
1+	unvollständige Membranfärbung in $> 10\%$ der Tumorzellen	negativ
2+	schwache bis mäßig komplette Membranfärbung in $> 10\%$ der Tumorzellen	schwach positiv
3+	starke komplette Membranfärbung in $> 10\%$ der Tumorzellen	stark positiv

Beispiele für den histologischen Aspekt von Tumoren mit einem positivem Clusterinstatus, einem hohem Ki67-Index bzw. einer HER2-Proteinüberexpression (HER2-Score 3+) sind in den nachfolgenden Abbildungen 1-3 illustriert.

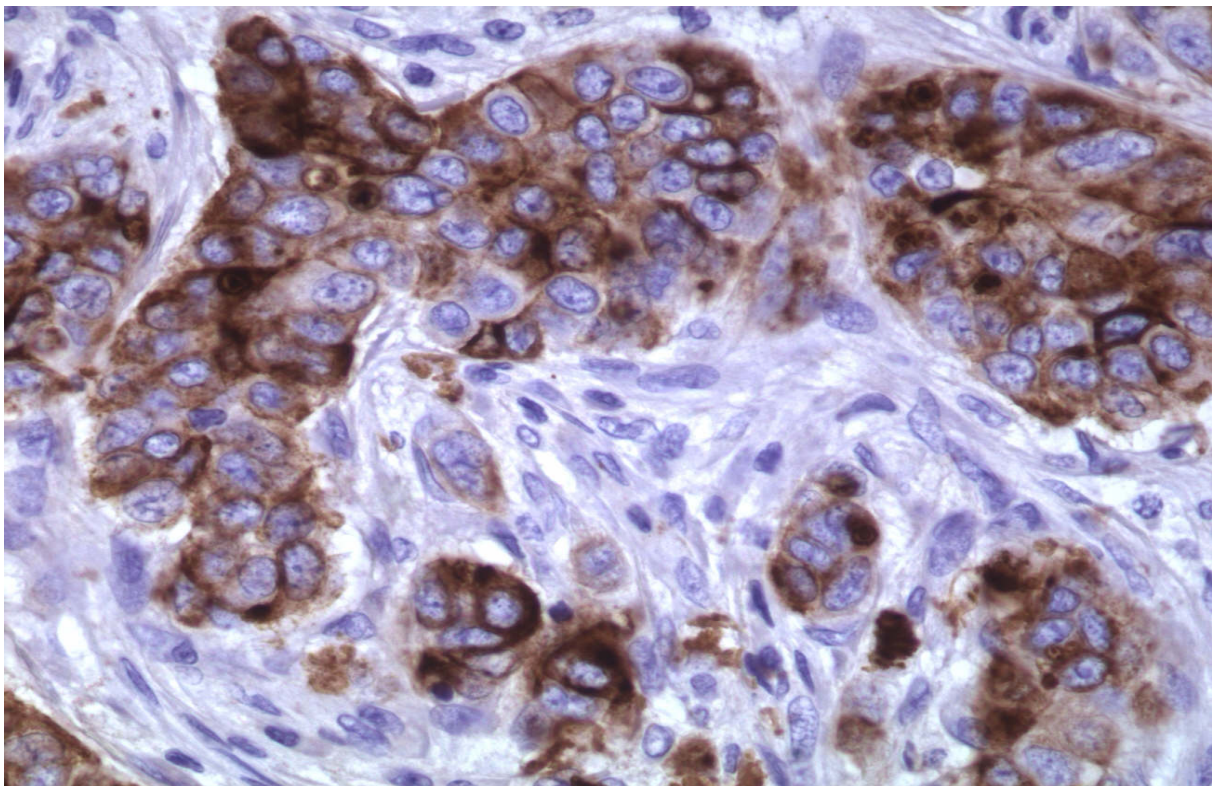


Abb. 1: Clusterinexprimierendes Mammakarzinom (Vergrößerung 100x). Die Tumorzellen zeigen ausschließlich eine zytoplasmatische Clusterinexpression (erkenntlich an der Braunfärbung)

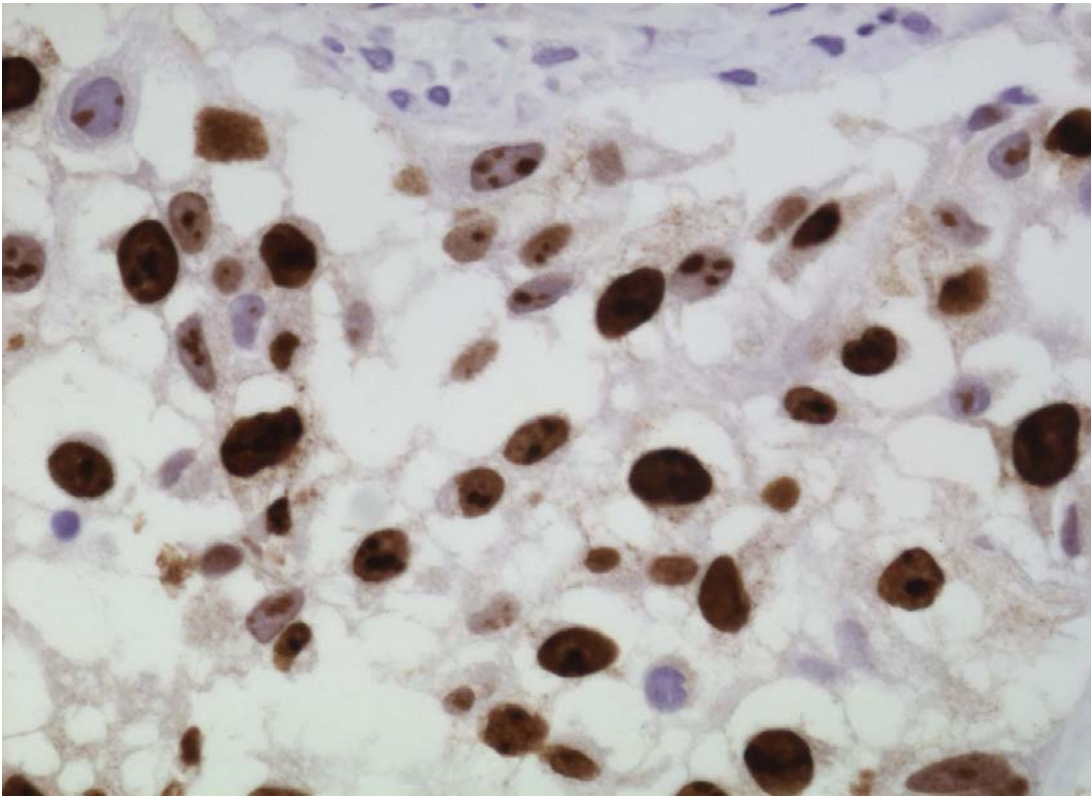


Abb. 2: Immunhistochemische Darstellung des Ki-67-Antigens im Mammakarzinom (Vergrößerung 400x). Das Antigen wird rein nukleär exprimiert

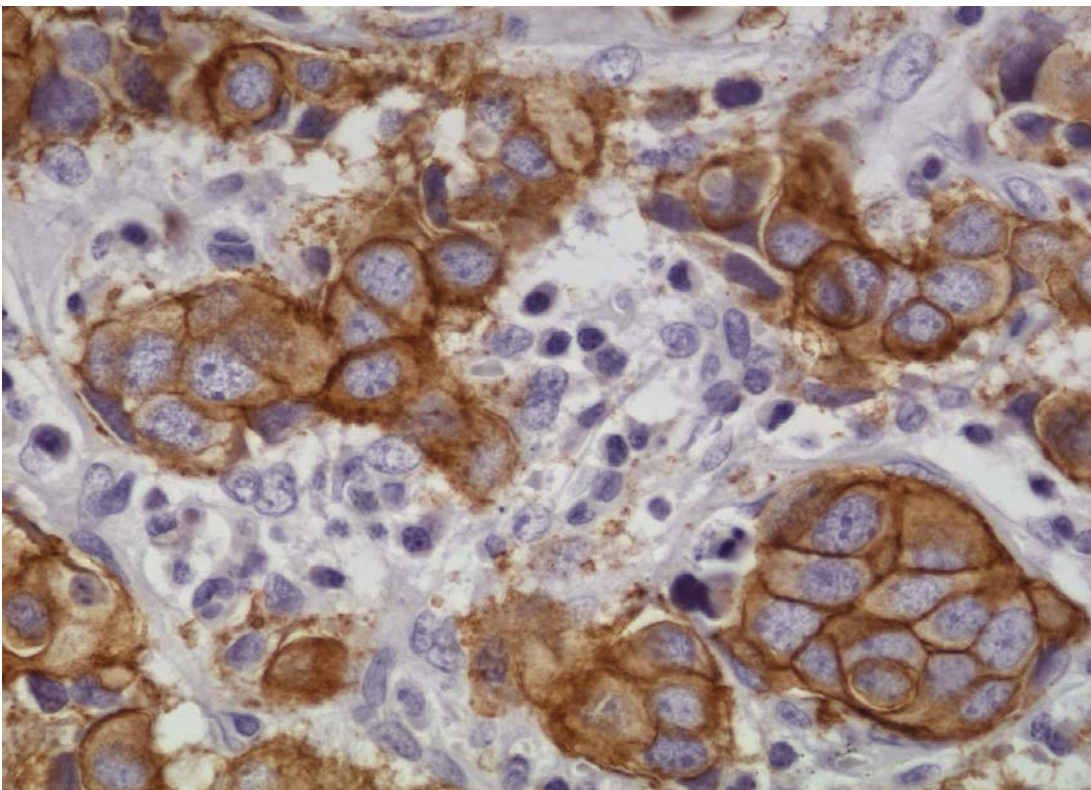


Abb. 3: Immunhistochemische Darstellung des HER2-Rezeptors im Mammakarzinom (Vergrößerung 400x). Der Rezeptor wird membranständig exprimiert

2.3. Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des SPSS-Statistikprogrammes (Version 13.0) durchgeführt (SPSS, München). Das Signifikanzniveau (P) wurde für alle Berechnungen bei $\leq 0,05$ festgelegt. P-Werte mit tendenziellem, nicht statistisch signifikantem Zusammenhang wurden als $\leq 0,20$ definiert. Zur besseren Kennzeichnung wird in der vorliegenden Arbeit jeder signifikante P-Wert **fett gedruckt** und jeder tendenzielle P-Wert *kursiv gedruckt* geschrieben.

Der Zusammenhang zwischen der Clusterinexpression und anderen, kategorisierten Parametern (Grading, Tumorstadium, Nodalstatus, Angioinvasion, Tumortyp, Östrogen- und Progesteron- sowie HER2-Rezeptorstatus, Ki-67-Index und Patientenalter) wurde nach Anfertigung von Kreuztabellen und durch Anwendung des Pearson- χ^2 -Tests überprüft.

Bei den Überlebensanalysen wurden Kaplan-Meier-Kurven vom rezidivfreien und metastasenfremen Überleben angefertigt. Einflüsse einzelner Parameter auf das rezidiv- und progressionsfreie Überleben wurden einerseits mittels des Logrank-Tests und andererseits mittels der univariaten Cox-Regressionsanalyse berechnet. Bei der Cox-Regressionsanalyse wurden neben dem P-Wert auch das Relative Risiko (RR) sowie das zugehörige 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben.

Um Parameter mit unabhängiger prognostischer Aussagekraft bezüglich des rezidiv- und progressionsfreien Überlebens zu identifizieren, wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. In diese multivariate Analyse wurden alle Parameter eingeschleust, die in der univariaten Analyse einen tendenziellen oder statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem rezidiv- bzw. metastasenfremen Überleben gezeigt hatten.

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen waren durchgängig erfolgreich, wie anhand der mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen erkenntlich war. Die Clusterinfärbung war bei allen 141 Tumoren auswertbar. Die Ki-67-Antigen-Färbung sowie die HER2-Färbung konnte nur an 139 bzw. 134 Fällen durchgeführt werden, da für diese Färbungen nachträgliche Schnittstufen angefertigt werden mussten und auf diesen teilweise kein repräsentatives Tumorgewebe mehr vorhanden war. Die Ergebnisse der drei immunhistochemischen Parameter werden nachfolgend etwas näher beschrieben.

3.1.1. Clusterinexpression

Es konnte eine Clusterinexpression in 36 von 141 Fällen nachgewiesen werden. Dies entsprach einem Anteil von 25,5 %. Die Clusterinexpression war rein zytoplasmatisch lokalisiert. Eine nukleäre Clusterinexpression konnte nicht beobachtet werden. Normale Brustdrüsenepithelien, die teilweise auf den Tumorgewebsschnitten mit enthalten waren, zeigten generell keine Clusterinexpression.

3.1.2. Ki-67-Antigenexpression

Die Ki-67-Antigenfärbung zeigte bei allen 139 auswertbaren Tumoren positiv gefärbte Tumorzellen, deren Anteil (Ki-67-Index) jedoch recht unterschiedlich ausgeprägt war. Die Spannweite der ermittelten Ki-67-Indizes schwankte zwischen 1% und 80%, der Median lag bei 19%. Die Fälle wurden für weitere Auswertungen anhand des Medianwertes in zwei annähernd gleich große Gruppen (hohe Ki-67-Antigenexpression = Ki-67-Index > Median; niedrige Ki-67-Antigenexpression = Ki-67-Index \leq Median) stratifiziert.

3.1.3. HER2-Rezeptorexpression

Die HER2-Rezeptorfärbung zeigte bei den meisten der 134 auswertbaren Tumoren zumindest fokal eine membranständige Färbung der Tumorzellen. In 25% der Fälle lautete der HER2-Score 0, in 42% 1+, in 19% 2+ und in 15% 3+. Somit zeigte etwa ein Drittel der Fälle (34%) entweder eine schwache (Score 2+) oder eine starke HER2-Überexpression (Score 3+).

3.2. Vergleich zwischen Clusterinstans und anderen Parametern

Invasive lobuläre Mammakarzinome wiesen im Vergleich zu invasiven dukalen Mammakarzinomen häufiger einen positiven Clusterinstans auf (37% vs. 24%), der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,224$ nach Pearson's χ^2 -Test; vgl. Tabelle 6). Ein Vergleich zwischen dem Clusterinstans und anderen kategorisierten Parametern (Grading, Tumorstadium, Nodalstatus, Angioinvasion, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, HER2-Rezeptorstatus, Ki-67-Index und Patientenalter) ergab, dass der Clusterinstans mit dem Ki-67-Index sowie mit dem Grading in einem signifikanten positiven Zusammenhang stand ($P = 0,01$ bzw. $P = 0,026$). Zu allen übrigen Parametern zeigte der Clusterinstans keine signifikante oder tendenzielle Korrelation. Die genauen Daten und P-Werte sind in der nachstehenden Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6:

Zusammenhang zwischen der Clusterinexpression und verschiedenen anderen klinisch-pathologischen Parametern beim Mammakarzinom

Parameter		Clusterin-negativ Anzahl (%)	Clusterin-positiv Anzahl (%)	P-Wert (Pearson's χ^2 -Test)
Grading	G1/2	86 (79%)	23 (21%)	0,026
	G3	19 (59%)	13 (41%)	
Tumorstadium	pT1	46 (79%)	12 (21%)	0,498
	pT2	42 (72%)	16 (28%)	
	pT3	2 (67%)	1 (33%)	
	pT4	15 (68%)	7 (32%)	
Nodalstatus	pN0	64 (80%)	16 (20%)	0,211
	pN1	23 (72%)	9 (28%)	
	pN2	12 (67%)	6 (33%)	
	pN3	4 (50%)	4 (50%)	
Angioinvasion	fehlend	83 (78%)	25 (22%)	0,240
	vorhanden	22 (67%)	11 (33%)	
Tumortyp	lobulär	12 (63%)	7 (37%)	0,224
	duktal	93 (76%)	29 (24%)	
ÖR-Status	negativ	16 (70%)	7 (30%)	0,509
	positiv	86 (76%)	27 (24%)	
PR-Status	negativ	22 (73%)	8 (27%)	0,811
	positiv	80 (75%)	26 (25%)	
HER2-Status	Score 0	27 (84%)	5 (16%)	0,543
	Score 1+	41 (72%)	16 (28%)	
	Score 2+	18 (72%)	7 (28%)	
	Score 3+	14 (70%)	6 (30%)	
Ki-67-Index	≤ Median	59 (84%)	11 (16%)	0,010
	> Median	45 (65%)	24 (35%)	
Patientenalter	≤ Median	52 (73%)	19 (27%)	0,736
	> Median	53 (76%)	17 (24%)	

3.3. Zusammenhang zwischen dem Clusterinstans und der Überlebensrate

Patientinnen mit Clusterin-positiven Tumoren zeigten im Vergleich zu solchen mit Clusterin-negativen Tumoren ein tendenziell schlechteres rezidivfreies ($P = 0,063$ nach Logrank) und metastasenfrees Überleben ($P = 0,117$ nach Logrank; vgl. Tab. 7 und Abb. 4).

3.4. Zusammenhang zwischen anderen Parametern und der Überlebensrate

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, zeigten Grading, Tumorstadium, Nodalstatus, Angioinvasion, Östrogenrezeptorstatus, Progesteronrezeptorstatus, HER2-Rezeptorstatus und Ki-67-Index eine meist signifikante, teilweise auch nur tendenzielle Korrelation mit dem rezidiv- bzw. metastasenfrees Überleben der Patientinnen. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu den einzelnen Parametern sind in den nachstehenden Abbildungen 5 bis 7 graphisch wiedergegeben.

Das Patientenalter zeigte lediglich mit dem rezidivfreien ($P = 0,192$ nach Logrank), aber nicht mit dem metastasenfrees Überleben ($P = 0,278$) einen tendenziellen Zusammenhang, und zwar insofern, als bei jüngeren Patientinnen tendenziell frühere Lokalrezidive auftraten als bei älteren Patientinnen (vgl. Abb 6). Der Tumortyp (duktales vs. lobuläres Karzinom) wies weder hinsichtlich des rezidivfreien ($P = 0,561$) noch hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens ($P = 0,942$) einen nennenswerten Unterschied auf, daher wurde auf die graphische Illustration in einer Kaplan-Meier-Kurve verzichtet.

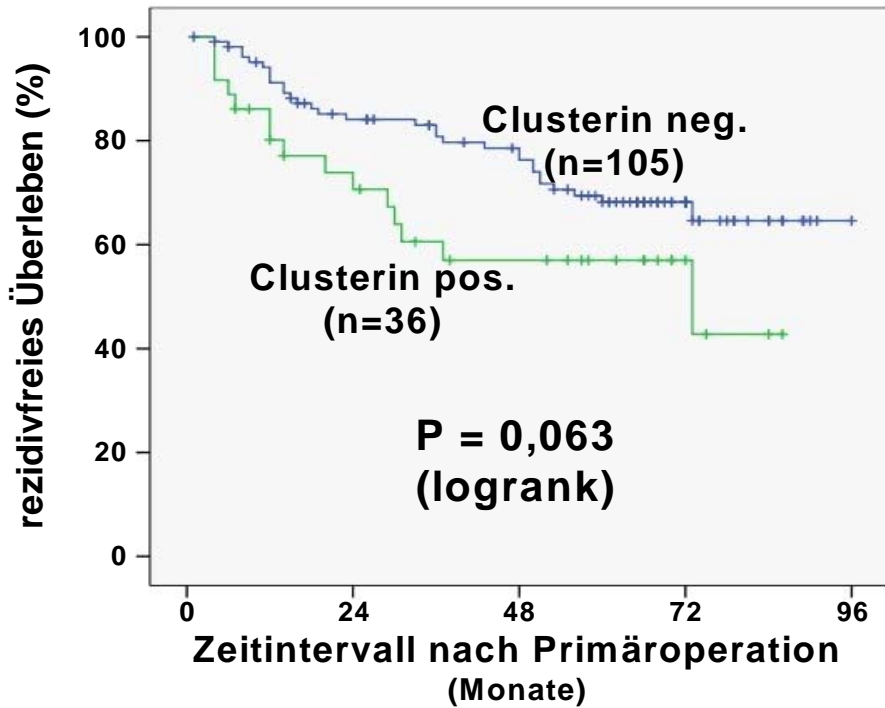
Tabelle 7:

Einfluss verschiedener Parameter auf das rezidiv- und metastasenfreie Überleben von Mammakarzinompatientinnen (Logrank-Test und univariate Cox-Regressionsanalyse)

Parameter	Rezidivfreies Überleben				Metastasenfreies Überleben			
	Logrank	univariate Coxanalyse			Logrank	univariate Coxanalyse		
	P	P	RR	95% KI	P	P	RR	95% KI
Clusterinexpr.	0,063	0,068	1,77	0,96-3,28	0,117	0,122	1,57	0,89-2,79
Grading	0,0001	0,0001	2,60	1,62-4,17	0,0001	0,001	2,27	1,48-3,47
Tumorstadium	0,001	0,0001	1,99	1,36-2,91	0,0001	0,0001	2,45	1,70-3,53
Nodalstatus	0,001	0,001	1,63	1,22-2,18	0,0001	0,0001	2,05	1,57-2,68
Angioinvasion	0,067	0,072	1,76	0,95-3,25	0,001	0,002	2,41	1,38-4,21
Typ (duktal/lobulär)	0,561	0,564	1,31	0,52-3,32	0,942	0,942	0,97	0,46-2,06
ÖR-Status	0,0001	0,0001	3,58	1,88-6,81	0,118	0,124	1,70	0,87-3,34
PR-Status	0,012	0,015	2,20	1,16-4,17	0,031	0,035	1,92	1,05-3,52
HER2-Expr.	0,001	0,001	1,85	1,29-2,66	0,016	0,005	1,60	1,15-2,23
Ki-67 Index (≤ vs. > Median)	0,014	0,017	2,04	1,14-3,66	0,003	0,003	2,28	1,31-3,97
Alter (> vs. ≤ Median)	0,188	0,193	1,47	0,82-2,64	0,205	0,210	1,41	0,83-2,39

RR: Relatives Risiko; KI: Konfidenzintervall

A



B

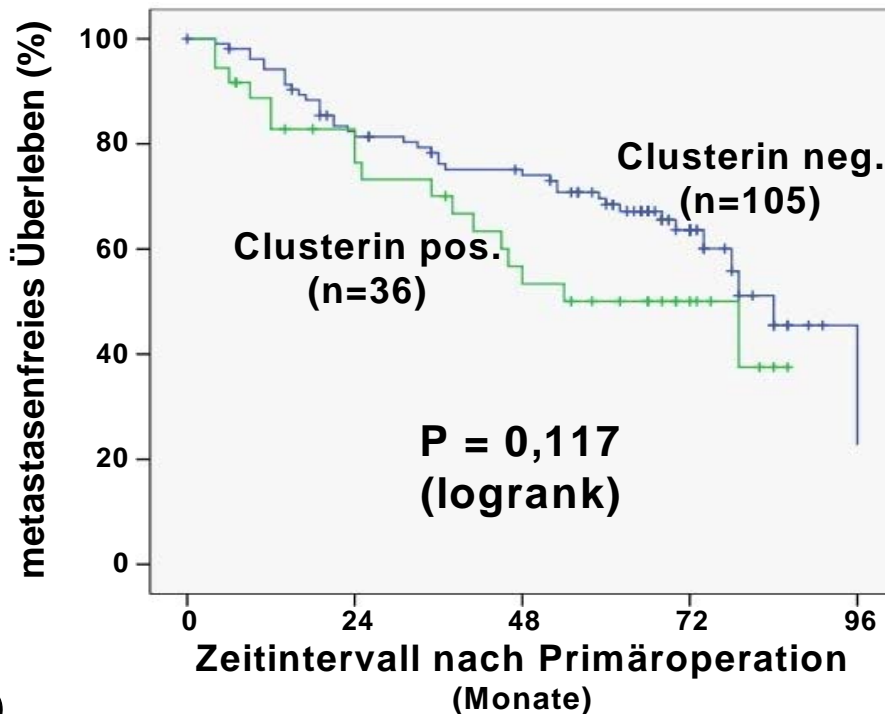


Abb. 4:

Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss des Clusterinstatus auf das rezidivfreie (A) und progressionsfreie Überleben (B) von Mammakarzinompatienten

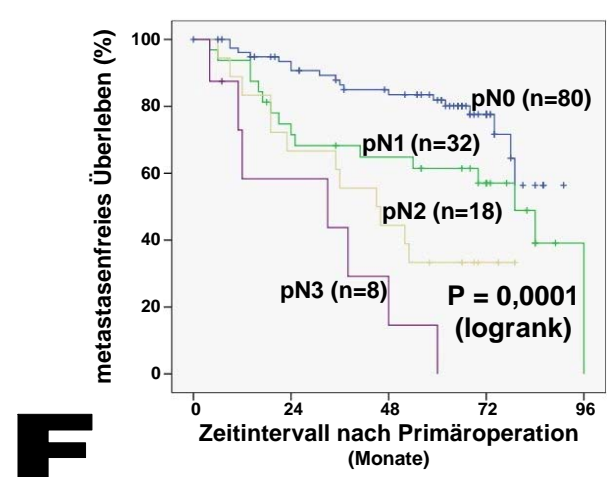
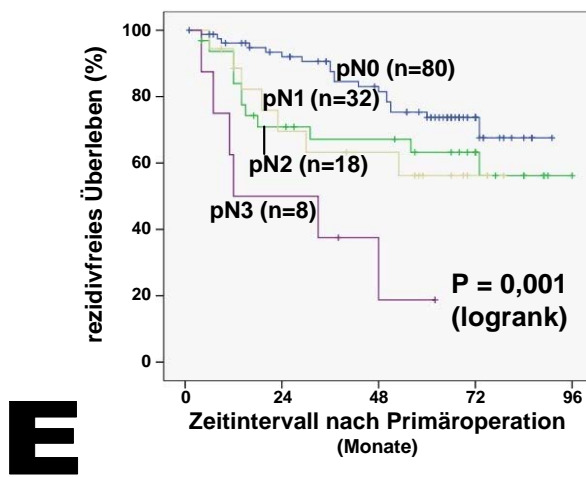
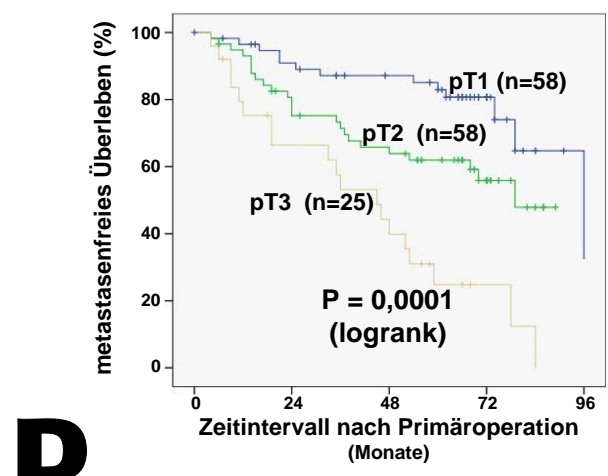
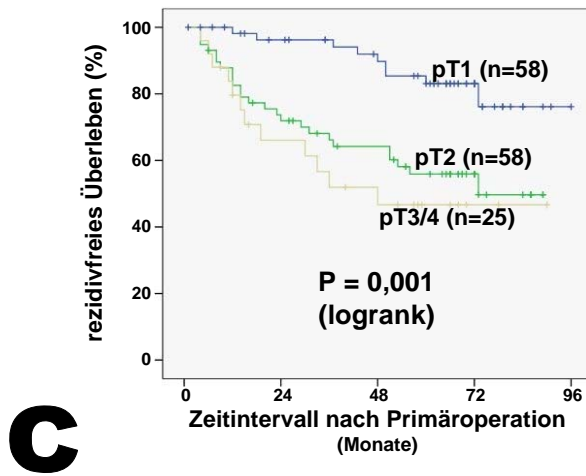
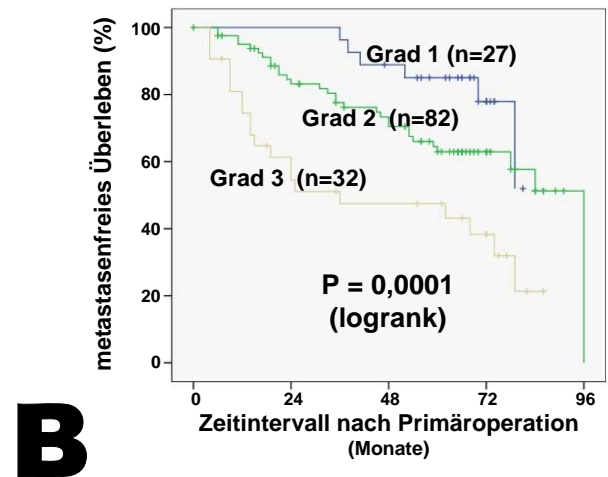
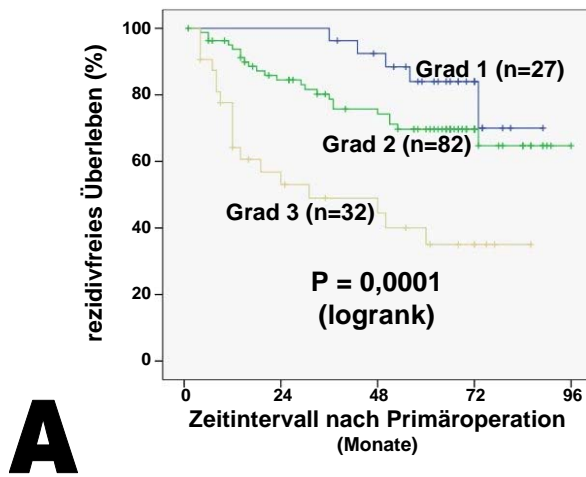


Abb. 5:
Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss von Grading (A, B), Tumor-stadium (C, D) und Nodalstatus (E, F) auf das rezidivfreie (A, C, E) bzw. metastasenfreie Überleben (B, D, F)

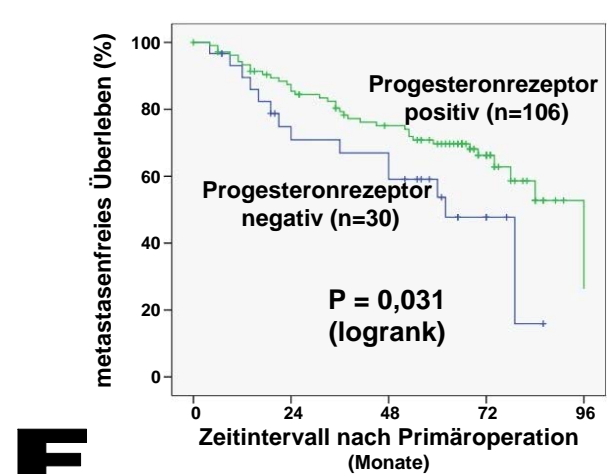
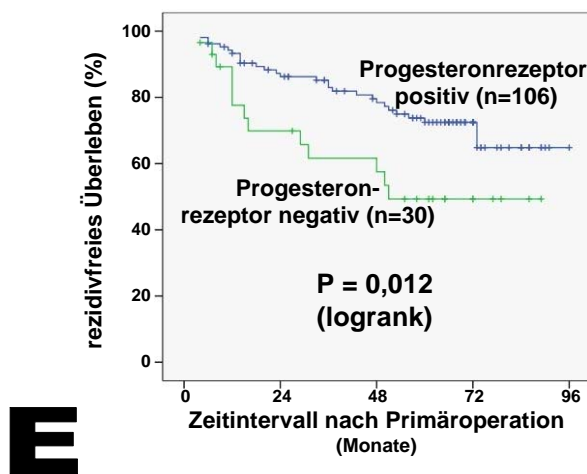
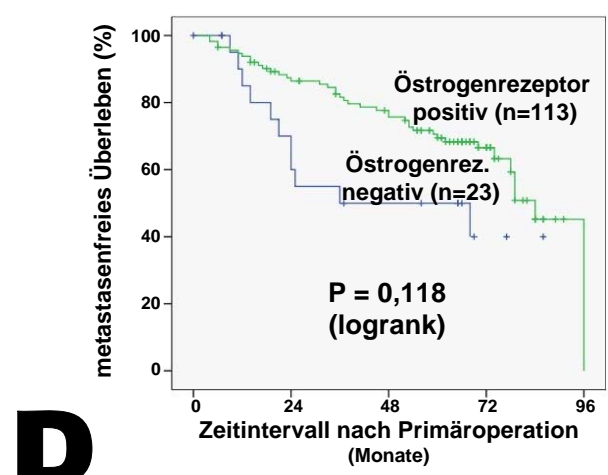
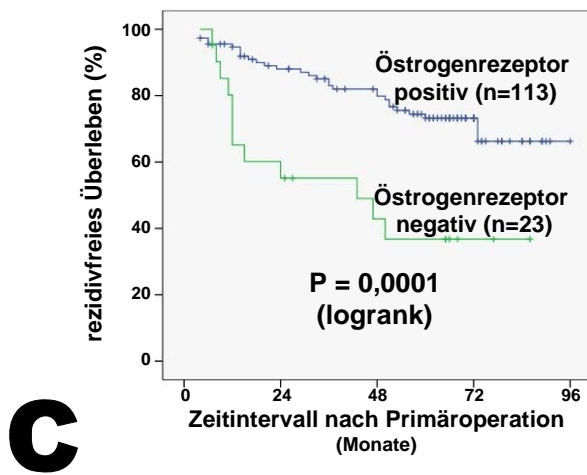
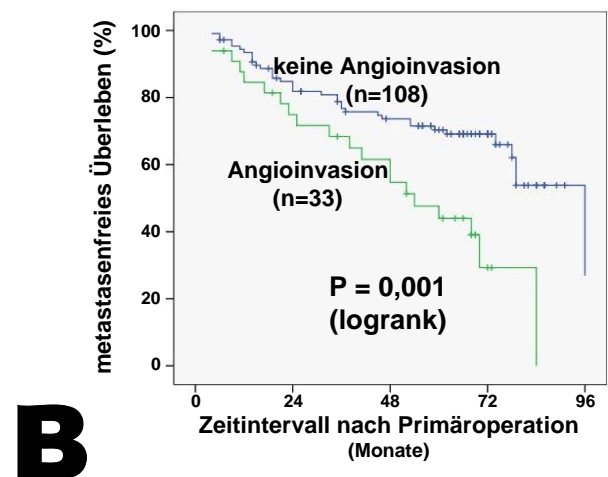
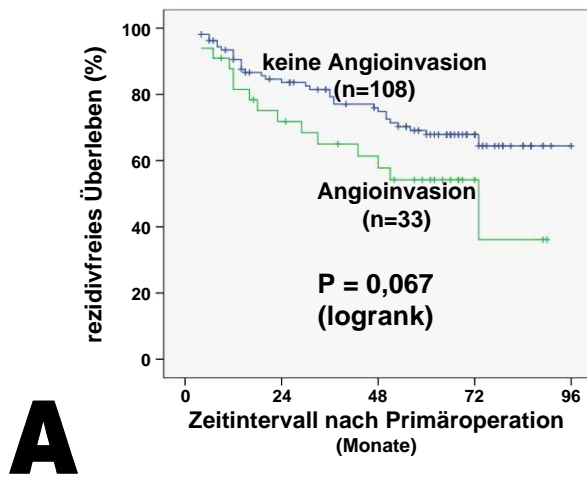


Abb. 6:
Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss von Angioinvasion (A, B), Östrogen- (C, D) und Progesteronstatus (E, F) auf das rezidivfreie (A, C, E) bzw. metastasenfreie Überleben (B, D, F)

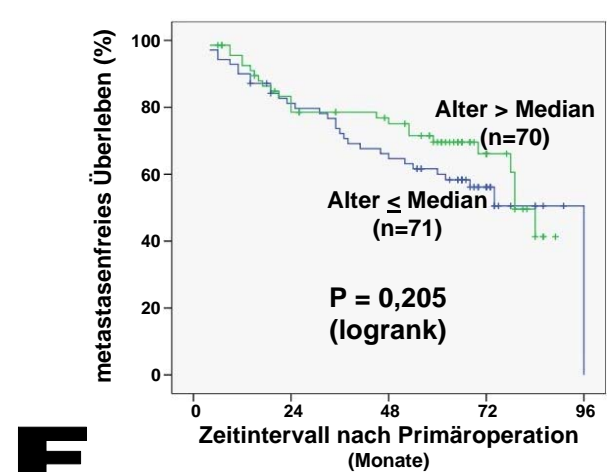
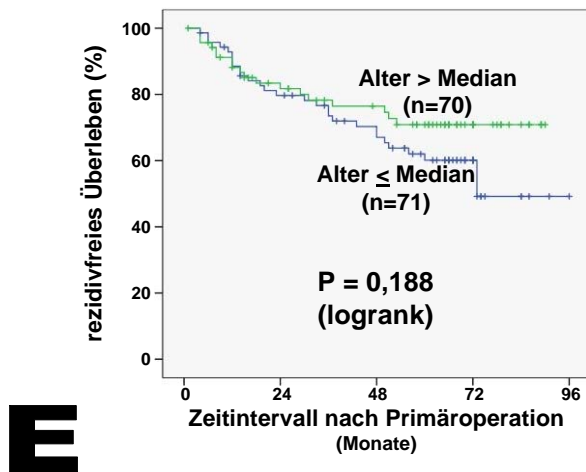
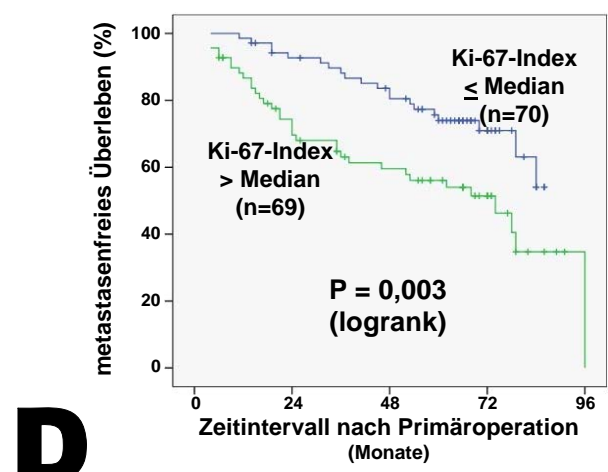
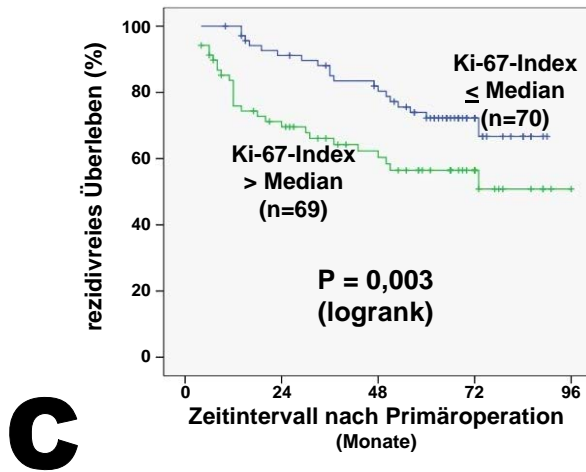
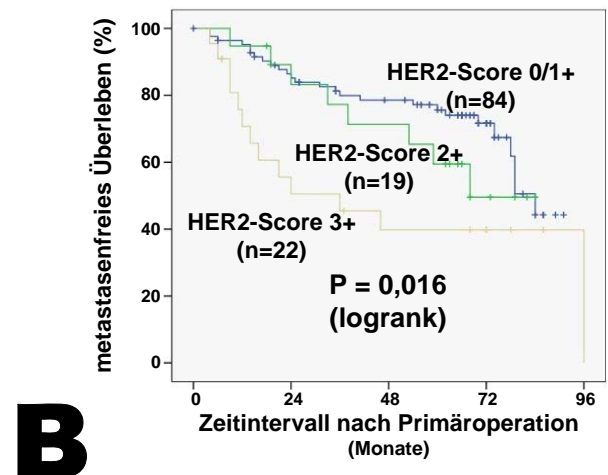
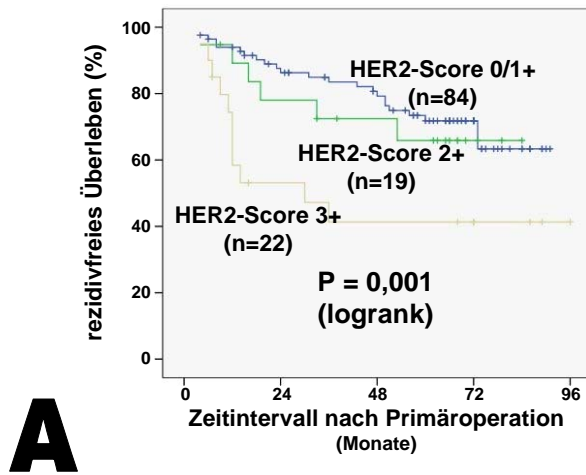


Abb. 7:
Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Einfluss von HER2-Status (A, B), Ki-67-Index (C, D) und Patientenalter (E, F) auf das rezidivfreie (A, C, E) bzw. metastasenfreie Überleben (B, D, F)

3. 5. Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse

Die Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse sind in der nachstehenden Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8:

Multivariate Cox-Regressionanalyse zum Einfluss einzelner Parameter auf das rezidiv- (links) bzw. progressionsfreie Überleben (rechts) von Mammakarzinompatientinnen

Parameter	Rezidivfreies Überleben			Metastasenfreies Überleben		
	P	RR	95% KI	P	RR	95% KI
Clusterinexpr.	0,110	1,81	0,87-3,77	0,632	1,19	0,59-2,40
Grading	0,028	1,82	1,07-3,10	0,026	1,77	1,07-2,94
Tumorstadium	0,002	1,12	0,76-1,64	0,055	1,57	0,99-2,50
Nodalstatus	0,575	0,96	0,63-1,46	0,021	1,54	1,07-2,21
Angioinvasion	0,773	1,12	0,51-2,46	0,075	1,91	0,94-3,91
ÖR-Status	0,001	3,68	1,73-7,82	0,422	1,42	0,60-3,38
PR-Status	0,125	1,96	0,83-4,64	0,179	1,61	0,80-3,23
HER2-Expr.	0,249	1,31	0,83-2,08	0,310	1,24	0,82-1,89
Ki-67 Index (≤ vs. > Median)	0,900	1,05	0,48-2,30	0,080	1,79	0,93-3,44
Alter (> vs. ≤ Median)	0,046	1,97	1,01-3,83	-*	-*	-*

*das Patientenalter wurden in der multivariaten Cox-Analyse für das metastasenfreie Überleben nicht mitberücksichtigt, da sein P-Wert in der univariaten Analyse größer als 0,2 war

Es zeigte sich, dass das Grading der einzige Parameter war, der sowohl hinsichtlich des rezidiv- als auch hinsichtlich des metastasenfreien Überlebens den Status eines signifikanten unabhängigen Prognosefaktors aufwies.

Das Tumorstadium, der Nodalstatus, der Östrogenrezeptorstatus und das Patientenalter wiesen entweder nur für das rezidiv- oder nur für das metastasenfrie Überleben eine signifikante unabhängige prognostische Bedeutung auf. Der Progesteronrezeptorstatus waren sowohl beim rezidiv- als auch beim metastasenfrien Überleben von immerhin tendenzieller unabhängiger prognostischer Relevanz. Die Angioinvasion und der Ki-67-Index zeigten lediglich hinsichtlich des metastasenfrien Überlebens eine tendenzielle unabhängige prognostische Aussagekraft. Ähnliches traf für den Clusterinstatus zu, der allerdings nur hinsichtlich des rezidiv- und nicht hinsichtlich des metastasenfrien Überlebens von tendenziellem unabhängigem prognostischem Wert war. Der einzige, allgemein als prognostisch bedeutsam bekannte Parameter, der in der vorliegenden Studie weder eine tendenzielle noch eine signifikante prognostische Bedeutung erlangte, war der HER2-Rezeptorstatus (vgl. Tab. 8).

3.6. Beantwortung der unter 1.8. genannten Fragen

Die unter 1.8. gestellten Fragen lassen sich wie folgt beantworten:

- A. Der Anteil von Mammakarzinomen, der eine signifikante Clusterinexpression (bestimmt mit Hilfe des 7D1-Antikörpers) aufweist, beträgt 25,5%, d.h. etwa ein Viertel aller Mammakarzinome ist durch einen positiven Clusterinstatus gekennzeichnet.
- B. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Clusterinexpression einen signifikanten Zusammenhang mit dem Ki-67-Index und einen tendenziellen Zusammenhang mit dem Grading. Zu allen anderen Parametern zeigte der Clusterinstatus keine signifikante oder tendenzielle Korrelation.
- C. In der univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte die Clusterinexpression keinen signifikanten, sondern einen tendenziellen Zusammenhang mit dem Rezidiv- bzw. Metastasierungsverhalten der Mammakarzinome. In anderen Worten ausgedrückt, bedeutet dies, dass Patientinnen mit Clusterin-positiven Tumoren im Vergleich zu solchen mit Clusterin-negativen Tumoren ein tendenziell schlechteres rezidiv- und metastasenfries Überleben aufwiesen.

- D. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse erwies sich der Clusterinstatus nicht als signifikanter unabhängiger prognostischer Parameter. Dem Clusterinstatus kam jedoch bei einem P-Wert von 0,110 eine tendenzielle prognostische Bedeutung hinsichtlich der Beurteilung des rezidivfreien Überlebens der Mammakarzinompatientinnen zu.

4. Diskussion

4.1. Rolle von Clusterin in der Biologie maligner humaner Tumoren allgemein

Eine erhöhte Clusterinexpression ist bereits bei einer Vielzahl von malignen Tumoren des Menschen beschrieben worden, so u.a. beim Prostatakarzinom (Steinberg et al., 1997; Scaltriti et al., 2004), Harnblasenkarzinom (Miyake et al., 2002; Krüger et al., 2006), Nierenzellkarzinom (Miyake et al., 2004b), Kolonkarzinom (Chen et al., 2003; Pucci et al., 2004; Xie et al., 2005), Leberzellkarzinom (Kang et al., 2004), Pankreaskarzinom (Xie et al., 2002) oder bei großzellig-anaplastischen Lymphom (Wellmann et al., 2000; Nascimento et al., 2004). Für einige dieser Tumoren - nämlich für das Prostatakarzinom (Steinberg et al., 1997), Nierenzellkarzinom (Miyake et al., 2002), Kolonkarzinom (Xie et al., 2005), hepatozelluläre Karzinom (Kang et al., 2004) und Harnblasenkarzinom (Luo et al., 2005, Krüger et al., 2006) - wurde eine Korrelation zwischen der Clusterinexpression und dem klinischen Verlauf beobachtet. Darüber hinaus wurde in einigen Studien ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Clusterinexpression und anderen anerkannten Prognosefaktoren wie z.B. dem Grading oder Staging festgestellt (Steinberg et al., 1997, Miyake et al., 2002, Xie et al., 2005, Luo et al., 2005, Kang et al., 2004). Daher besteht ein berechtigter Anlass zu der Hoffnung, dass die Clusterinexpression zumindest bei einigen der beschriebenen Malignome einen Prognosefaktor darstellen könnte. Der Clusterinstatus hat sich jedoch bislang noch bei keiner Tumorart als allgemein anerkannter Prognosefaktor behaupten können.

Auf molekularer Ebene sind zwei Isoformen von Clusterin bekannt: Eine Isoform, die nur im Zytoplasma der Tumorzellen exprimiert wird und der eine zytoprotektive Wirkung nachgesagt wird, sowie eine Isoform, die rein nukleär exprimiert wird und offenbar einen pro-apoptotischen Effekt besitzt (Criswell et al., 2003). In den meisten der oben zitierten Studien, die auf immunhistochemischem Wege die Clusterinexpression in malignen humanen Tumoren analysierten, wurde eine Clusterinexpression nahezu ausschließlich im Zytoplasma der untersuchten Zellen beobachtet (Steinberg et al., 1997, Scaltriti et al., 2004, Miyake et al., 2002, Krüger et al., 2006, Chen et al., 2003, Pucci et al., 2004, Kang et al., 2004, Xie et al., 2002, Wellmann et

al., 2000). Aufgrund des zytoprotektiven Effektes der zytoplasmatischen Clusterin-Isoform ist somit zu vermuten, dass sich die Tumorzellen durch die Hochregulation der Clusterinexpression einen Überlebensvorteil verschaffen.

4.2. Rolle von Clusterin in der Tumorbilogie des Mammakarzinoms

Bislang haben sich nur wenige Studien mit der Analyse von Clusterin beim Mammakarzinom bzw. bei Mammakarzinompatientinnen beschäftigt. Doustjalali et al. (2004) untersuchten den Clusteringehalt in unfraktionierten Sera von 10 Patientinnen mit Mammakarzinom und registrierten dabei einen signifikant erhöhten Clusteringehalt bei Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu tumorfreien Kontrollpatientinnen.

In einer immunhistochemischen Studie untersuchten Redondo et al. (2000) an einem größeren Kollektiv von 114 Mammakarzinomen die Clusterinexpression, allerdings unter Verwendung eines nicht kommerziell erhältlichen Antikörpers. Eine signifikante zytoplasmatische Clusterinexpression wurde dabei in 53% der Mammakarzinome vorgefunden. Dieser Prozentsatz war höher als bei anderen gleichzeitig untersuchten Mammaläsionen. So zeigten 19% der benignen Mammatumoren (vor allem Fibroadenome), 48% der „low-grade“ duktaalen Carcinomata in situ (DCIS) und 50% der „high-grade“ DCIS eine Clusterinexpression. Der Clusterinstatus der invasiven Mammakarzinome war nach Angaben von Redondo et al. (2000) signifikant mit dem Hormonrezeptorstatus und der TumorgroÙe sowie tendenziell mit dem Grading und dem Apoptoseindex, jedoch nicht mit dem Ki-67-Proliferationsindex der Tumoren assoziiert.

In der hier beschriebenen Studie, der die gleichen immunhistochemischen Evaluationskriterien wie bei Redondo et al. (2000) zugrunde lagen, wurde nur in etwa einem Viertel der Fälle (26%) eine Clusterinexpression nachgewiesen. Dieser deutlich unterschiedliche Prozentsatz dürfte in erster Linie auf den unterschiedlichen Antikörper, eventuell in zweiter Linie auch auf Unterschiede innerhalb des Karzinomkollektivs (unterschiedliche Kollektivgröße mit verschiedenen Gewichtungen von Tumorstadium und Grading) zurückzuführen sein. Hierdurch erklärt sich wohl auch,

dass in der vorliegenden Arbeit der Clusterinstatus signifikant mit dem Ki-67-Proliferationsindex, jedoch weder mit dem Hormonrezeptorstatus noch mit dem Tumorstadium korrelierte. Eine Parallele zu der Studie von Redondo et al. (2000) war lediglich insofern gegeben, als der Clusterinstatus einen tendenziellen positiven Zusammenhang mit dem Grading.

Bei der Zusammenfassung der bislang vorliegenden Erkenntnisse zur immunhistochemischen Clusterinexpression bei Mammakarzinomen, die sich aus den Befunden der Studie von Redondo et al. (2000) und aus den eigenen Untersuchungsergebnissen ableiten lassen, kann festgestellt werden, dass eine Clusterinexpression bei Mammakarzinomen in 26-53% der Fälle erwartet werden kann und dass die Clusterinexpression tendenziell mit dem Grading der Tumoren korreliert. Hinsichtlich der Details über die molekularen Wirkungsmechanismen von Clusterin in Mammakarzinomen besteht nach wie vor noch ein erheblicher Aufklärungsbedarf.

4.3. Prognostische Rolle von Clusterin beim Mammakarzinom

Bislang liegt – neben der hier vorgestellten Studie – in der Literatur mit der von Redondo et al. im Jahre 2000 veröffentlichten Arbeit lediglich eine einzige weitere Studie vor, die Daten zur prognostischen Relevanz der immunhistochemischen Clusterinexpression bei Mammakarzinomen enthält. In der von Redondo et al. publizierten Studie konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Clusterinexpression und dem Rezidivverhalten von Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Die Studie von Redondo et al. wies allerdings einige wesentliche Unterschiede zur hier beschriebenen Studie auf. So war das Patientenkollektiv kleiner (Redondo et al.: n=114; hier: n=141), das Tumorkollektiv war anders aufgebaut (Anteil der G1- und der G3-Tumoren bei Redondo et al.: 47% bzw. 11%; hier: 19% bzw. 27%), der verwendete Clusterin-Antikörper war ein anderer, und es wurde bei Redondo et al. nur das rezidivfreie und nicht das metastasenfremie Überleben der Mammakarzinompatientinnen untersucht. Aufgrund dieser deutlichen Unterschiede im Studiendesign lassen sich die Ergebnisse der Studie von Redondo et al. nur schwer mit den hier vorgelegten Studienergebnissen vergleichen.

Laut der eigenen Untersuchungsergebnisse zeigte der immunhistochemische Clusterinstatus bei Verwendung des 7D1-Antikörpers in der univariaten und multivariaten Cox-Regressionsanalyse einen tendenziellen Zusammenhang (P-Werte: 0,063 bzw. 0,110) mit dem rezidivfreien Überleben der Mammakarzinompatientinnen. Hinsichtlich des metastasenfreien Überlebens ergab sich lediglich in der univariaten Analyse eine tendenzielle prognostische Relevanz für den Clusterin-Status ($P = 0,117$). Wenngleich das geforderte statistische Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ nicht erreicht wurde, so deuten diese Untersuchungsergebnisse doch wenigstens tendenziell darauf hin, dass der immunhistochemische Clusterinstatus für das tumorbiologische Verhalten von Mammakarzinomen eine gewisse Bedeutung besitzt. Diese reicht jedoch nicht an den Stellenwert der etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms heran, sodass der Clusterinstatus in dieser Hinsicht allenfalls als nachrangiges Hilfskriterium anzusehen ist. Möglicherweise kann die Bestimmung der immunhistochemischen Clusterinexpression in ausgesuchten Mammakarzinomfällen, bei denen die etablierten Prognosefaktoren in unterschiedliche prognostische Richtungen weisen, zusätzliche prognostische Informationen – insbesondere bezüglich der Rezidivneigung des Tumors – liefern.

4.4. Prognostische Rolle von anderen Parametern beim Mammakarzinom

Seit Langem existieren für das Mammakarzinom mehrere etablierte Prognosefaktoren, die für die Einschätzung des klinischen Verlaufs der Erkrankung sowie für die Indikationsstellung adjuvanter Therapieformen von unschätzbarem Wert sind (Wellner et al., 1993). Man kann diese Prognosefaktoren unterteilen in klinische bzw. anatomische Prognosefaktoren – Tumorgröße bzw. Tumorstadium, axillärer Lymphknotenstatus, Fernmetastasierungsstatus – sowie in biologische Prognosefaktoren wie Grading, Angioinvasion, Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptorstatus (Mittra und MacRae., 1991).

Unter den genannten Prognosefaktoren sind das Tumorstadium (bzw. die Tumorgröße, die ja mit dem Tumorstadium direkt korreliert) und der axilläre

Lymphknotenstatus sowie das Grading diejenigen Faktoren, die wohl am häufigsten untersucht wurden. Insgesamt ist festzustellen, dass die drei genannten Parameter wohl die besten prognostischen Faktoren des Mammakarzinoms repräsentieren (Donegan, 1992). Die hohe prognostische Bedeutung dieser beiden Parameter wird auch durch die eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigt, denn es wurde für diese Parameter jeweils eine signifikante Korrelation mit dem rezidiv- und/oder progressionsfreien Überleben in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse festgestellt (vgl. Tab. 7).

Darüber hinaus ist auch der Hormonrezeptorstatus – und hier insbesondere der Östrogenrezeptorstatus – ein seit Langem etablierter Prognosefaktor des Mammakarzinoms. So wurde in größeren Studien ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Östrogenrezeptorstatus und dem krankheitsbezogenen Überleben bzw. dem Gesamtüberleben von Mammakarzinompatientinnen festgestellt (Keyomarsi et al., 2002; Turbin et al., 2006). In der hier beschriebenen Studie zeigte der Östrogenrezeptorstatus eine signifikante unabhängige prognostische Relevanz lediglich hinsichtlich des rezidivfreien, jedoch nicht hinsichtlich des metastasenfremen Überlebens, und für den Progesteronrezeptorstatus wurde hier jeweils nur eine tendenzielle unabhängige prognostische Relevanz ermittelt (vgl. Tab. 7). Nichtsdestotrotz belegen auch die eigenen Daten, dass insbesondere der Östrogenrezeptorstatus einen unabhängigen Prognosefaktor des Mammakarzinoms darstellt.

Zu den „neueren“ Prognosefaktoren zählen in erster Linie die immunhistochemisch evaluierbare Parameter HER2-Rezeptorstatus und Ki-67-Proliferationsindex. Für beide Parameter gilt jedoch, dass sie sich noch nicht als allgemein akzeptierte Prognosefaktoren durchgesetzt haben und daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt (noch) überwiegend als zweitrangige Prognosefaktoren angesehen werden, zumal ihre prognostische Bedeutung noch nicht in größeren prospektiven Studien belegt werden konnte. Möglicherweise kommt der HER2-Rezeptorstatus auch lediglich für diejenigen Patientinnen, die bereits Lymphknotenmetastasen entwickelt haben, als Prognosefaktor in Betracht (Toikkanen et al., 1992).

In der hier beschriebenen Studie wiesen der HER2-Rezeptorstatus und der Ki-67-Proliferationsindex zwar in der univariaten Cox-Regressionsanalyse jeweils eine

signifikante Korrelation mit dem rezidiv- und progressionsfreien Überleben der Mammakarzinompatientinnen auf (vgl. Tab. 6), in der multivariaten Regressionsanalyse zeigten sie jedoch keine signifikante Korrelation mehr (vgl. Tab. 7). Lediglich für den Ki-67-Index wurde in der multivariaten Analyse ein tendenzieller Zusammenhang mit dem metastasenfreien Überleben gefunden ($P = 0,08$). Somit deuten auch die eigenen Untersuchungsergebnisse an, dass der HER2-Rezeptorstatus und der Ki-67-Proliferationsindex allenfalls von zweitrangiger Bedeutung hinsichtlich ihres prognostischem Informationsgehaltes beim Mammakarzinom sind.

4.5. Mögliche therapeutische Aspekte der Clusterinexpression von Mammakarzinomen

In einer Studie von Biroccio et al. (2005) wurde die Clusterinexpression *in vitro* an der Mammakarzinomzelllinie BT474 untersucht, die eine durch Genamplifikation verursachte Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors HER2 aufweist. Dabei wurde der Frage nach einem Zusammenhang mit der Behandlung mit dem monoklonalen, gegen den HER2-Rezeptor gerichteten Trastuzumab-Antikörper (Herceptin®) besondere Aufmerksamkeit gewidmet. In der zitierten Arbeit wurde festgestellt, dass die Herceptin®-Behandlung in den Tumorzellen zu einer dosisabhängigen Steigerung der Clusterinexpression führte. Andererseits konnte die Clusterinexpression durch die zusätzliche Verabreichung des gegen das Clusteringen gerichteten Antisense-Deoxyoligonukleotids OGX-011 wieder gesenkt werden, wodurch die Zahl apoptotischer Tumorzellen signifikant anstieg.

Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse von Biroccio et al. (2005) erscheint die Spekulation gerechtfertigt, dass der therapeutische Effekt von Herceptin® durch die zusätzliche Behandlung mit Clusterin-Antisense-Deoxyoligonukleotiden nicht nur *in vitro*, sondern möglicherweise auch *in vivo* gesteigert werden kann. Dies muss allerdings noch in klinischen Studien überprüft werden. Wenn sich in diesen Studien ein antitumoraler *in vivo*-Effekt von Clusterin-Antisense-Deoxyoligonukleotiden herausstellen sollte, könnte die immunhistochemische Bestimmung der Clusterinexpression beim Mammakarzinom nicht nur in prognostischer, sondern auch in therapeutischer Hinsicht von Bedeutung sein.

4.6. Ausblick

In der hier vorgelegten Arbeit wurde eine gewisse, allerdings nur tendenzielle prognostische Bedeutung des immunhistochemischen Clusterin-Status bei Mammakarzinomen vorgefunden. Wie bereits dargelegt wurde, ist daher die Bestimmung des Clusterinstatus für den prognostischen Informationsgewinn nur von zweitrangiger Bedeutung. Gegebenenfalls kann die Evaluation der Clusterinexpression bei ausgesuchten Fällen von Mammakarzinomen zu einer besseren Einschätzung insbesondere des Rezidivverhaltens beitragen.

Ein noch weitgehend unbekanntes Kapitel stellt dagegen die therapeutisch nutzbare Seite der Clusterinexpression von Mammakarzinomen dar. Der Einsatz von gegen das Clusterin-Gen gerichteten Antisense-Oligodeoxynukleotiden resultierte in *in vitro*-Studien, die an Mammakarzinomzelllinien und auch an Zelllinien von anderen humanen Karzinomformen durchgeführt wurden, zu einer erhöhten Chemosensibilität und darüber hinaus auch beim Mammakarzinom zu einer erhöhten Apoptoserate unter zusätzlicher Herceptin®-Behandlung. Es wird sich in den nächsten Jahren sicherlich zeigen, ob Clusterin-Antisense-Deoxyoligonukleotide das Potenzial für eine sinnvolle Behandlungsalternative bei Mammakarzinomen besitzen. Sollte dies der Fall sein, so könnte die Analyse der Clusterinexpression beim Mammakarzinom noch einmal einen größeren Stellenwert erlangen.

5. Zusammenfassung

Mit Clusterin wird ein 80 kDa schweres Protein bezeichnet, das bei zahlreichen biologischen Prozessen (u.a. Lipidtransport, Regulation der Komplementkaskade, Spermienmaturation, Regulation der Apoptose, Recycling von Zellmembranen, Beeinflussung der epithelialen Zelldifferenzierung und Kanzerogenese) eine Rolle spielt. Der zytoplasmatisch exprimierte Isoform dieses Proteins wird eine anti-apoptotische Wirkung nachgesagt. Bei zahlreichen humanen Tumoren ist in der Literatur über eine signifikante Clusterinexpression berichtet worden.

Bezüglich des Mammakarzinoms – des häufigsten Malignoms der Frau – ist in einer spanischen Studie aus dem Jahre 2000 bereits eine signifikante zytoplasmatische Clusterinexpression beschrieben worden, allerdings unter Verwendung eines nicht kommerziell verfügbaren Antikörpers. Der Zusammenhang zwischen der Clusterinexpression und dem biologischen Verhalten von Mammakarzinomen ist weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte an einem größeren Kollektiv unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Antikörpers analysiert werden, (A) wie hoch der Prozentsatz Clusterin-exprimierender Mammakarzinome ist, (B) ob der Clusterinstatus mit anderen klinischen bzw. tumor-biologischen Faktoren korreliert, (C) ob sich Clusterin-positive von Clusterin-negativen Tumoren hinsichtlich ihres Rezidiv- und Metastasierungsverhaltens unterscheiden, und (D) ob der immunhistochemische Clusterinstatus beim Mammakarzinom eine unabhängige prognostische Aussagekraft besitzt.

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 141 invasive, zwischen 1996 und 1998 primär operierte Mammakarzinome (122 duktale, 19 lobuläre Tumoren), bei denen Angaben zum Hormonrezeptorstatus sowie zum Rezidiv- und Metastasierungsverhalten bekannt waren. Paraffinschnitte aller Tumoren wurden einer immunhistochemischen Clusterinfärbung unterzogen. Der Clusterinstatus wurde dann als positiv gewertet, wenn >10% der Tumorzellen eine zytoplasmatische Expression aufwiesen. Da beim Mammakarzinom mittlerweile der HER2-Rezeptorstatus und auch die Proliferationsrate (Ki-67-Index) als prognostische Faktoren bekannt sind, erfolgten zur Quantifizierung dieser beiden Parameter entsprechende zusätzliche immunhistochemische Färbungen.

Etwa ein Viertel der Mammakarzinome (26%) zeigte einen positiven Clusterinstatus. Dieser korrelierte positiv mit dem Ki-67-Index ($P = 0,10$) und dem Grading ($P = 0,026$). Mit anderen klinisch-pathologischen Parametern zeigte der Clusterinstatus keinen erkennbaren Zusammenhang. In der univariaten Cox-Regressionsanalyse ergab sich, dass Patientinnen mit Clusterin-positiven im Vergleich zu solchen mit Clusterin-negativen Tumoren ein tendenziell schlechteres rezidivfreies ($P = 0,068$) und metastasenfreies Überleben ($P = 0,122$) aufwiesen. Unter den anderen untersuchten Faktoren erwiesen sich in der Univariateanalyse Grading, Tumorstadium, Nodalstatus, Angioinvasion, Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, HER2-Status, Ki-67-Index sowie Patientenalter als Parameter mit signifikanter oder tendenzieller prognostischer Aussagekraft bezüglich des rezidivfreien und/oder metastasenfreien Überlebens. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurden Grading, Tumorstadium, Östrogenrezeptorstatus und Patientenalter als signifikante unabhängige prognostische Faktoren für die Beurteilung des Rezidivverhaltens sowie Grading und Nodalstatus als signifikante unabhängige prognostische Faktoren für die Beurteilung des Metastasierungsverhaltens identifiziert. Dem Clusterinstatus kam hier lediglich eine tendenzielle unabhängige Aussagekraft bei der Beurteilung des rezidivfreien Überlebens zu ($P = 0,110$).

Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass der immunhistochemische Clusterinstatus beim Mammakarzinom zwar keinen unabhängigen Prognosefaktor darstellt, jedoch eine tendenzielle Bedeutung bei der Abschätzung des Rezidivverhaltens besitzt. Daher könnte die immunhistochemische Ermittlung des Clusterinstatus bei ausgewählten Fällen von Mammakarzinomen, in denen etablierte Prognosefaktoren in unterschiedliche Prognoserichtungen weisen, dazu hilfreich sein, das Rezidivverhalten der Tumoren besser einschätzen zu können. Falls sich die bislang lediglich *in vitro* erfolgreich eingesetzte Behandlung mit Clusterin-Antisensedeoxy nukleotiden beim Mammakarzinom auch klinisch in den nächsten Jahren zu einer therapeutischen Alternative entwickeln sollte, könnte die Bestimmung der immunhistochemischen Clusterinexpression bei Mammakarzinomen einmal aus therapeutischen Gesichtspunkten sinnvoll werden.

6. Literaturverzeichnis

Andreasen PA, Kjöllner L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. Int J Cancer **72**:1-22

Bartley AN, Ross DW (2002) Validation of p53 immunohistochemistry as a prognostic faktor in breast cancer in clinical practice. Arch Pathol Lab Med **126**: 456-87

Beckmann MW, Picard E, 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 BRCA 1 and BRCA 2 markers in sporadic breast cancer. Br J Cancer **73**: 1220-6

Bender HG, Schnürch H-G (1991) Diagnostik und Therapie von malignen Tumoren und deren Vorstadien an der Mamma. In: Bender HG (Hrsg.): Gynäkologische Onkologie, Thieme, Stuttgart-New York, pp. 347-5

Biroccio A, D'Angelo C, Jansen B, Gleave ME, Zupi G (2005) Antisense clusterin oligodeoxynucleotides increase the response of HER2 gene amplified breast cancer cells to Transtuzumab. J Cell Physiol **204**: 463-9

Bhargava V, Kell DL, van de Rijn M, Warnke RA (1994) Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. Am J Pathol **145**: 535-45

Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) Pathologie, 3. Aufl., Urban & Fischer, München-Jena, pp. 979-97

Calvo EL, Mollo CV, Fiedler F, Malka D, Vaccaro MI, Keim V, Morisset J, Dagon JC, Iovanna JL (1998) Clusterin overexpression in rat pancreas during the acute phase of pancreatitis and pancreatic development. Eur J Biochem **254**: 282-9

Carter CL, Allen C, Henson DE (1989) Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer **63**: 181-7

Catoretto G, Becker MN, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol **168**: 357-63

Chen X, Halberg RB, Ehrhardt WM, Torrealba J, Dove WF (2003) Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia. Proc Natl Acad Sci USA **100**: 9530-5

Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, Mac Kinnon E, Mc Gale P, Mc Hugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005) Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet **17**: 2087-106

Cox G, Vyberg M, Melgaard B, Askaa J, Oster A, O'Brien KJ (2001) HercepTest: HER2 expression and gene amplification in non-small cell lung cancer. Int J Cancer **92**: 480-3

Correa-Rotter R, Ibarra-Rubio ME, Schochau G, Cruz C, Silkensen JR, Pedraza-Chaverri J, Chmielewski D, Rosenberg ME (1998) Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. J Am Soc Nephrol **9**: 33-7

Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA (2003) Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. Cancer Biol Ther **2**: 372-80

Dixon M (2005) ABC of breast diseases (2. Aufl.), BMJ Books, London, p. 43

Domagala W, Markiewski M, Harega B, Dukowicz A, Osborn M (1996) Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in

breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. Clin Cancer Res **2**: 147-54

Donegan, WL (1992): Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. Cancer **70**: 1755-64.

Donnellan R, Kleinschmidt I, Chetty R (2001) Cyclin E immunexpression in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implication. Hum Pathol **32**: 89-94

Doutsjalali SR, Yusof R, Yip CH, Looi LM, Pillay B, Hashim OH (2004) Aberrant expression of acute-phase reactant proteins in sera and breast lesions of patients with malignant and benign breast tumors. Electrophoresis **25**: 2392-401

Dublin EA, Miles DW, Rubens RD, Smith P, Barnes DM (1997) p53 immunohistochemical staining and survival after adjuvant chemotherapy for breast cancer. Int J Cancer **74**:605-8

Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, Peterse JL, Mukai K, Tabar L, Jacquemier J, Cornelisse CJ, Sasco AJ, Kaaks R, Pisani P, Goldgar DE, Devilee P, Cleton-Jansen MJ, Borresen-Dale AL, van't Veer L, Sapino A (2003) Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P (Hrsg.) World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon, pp. 13-59

Elston CW, Ellis (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology **19**: 403-10

Elton CW, Ellis IO, Pinder SE (1999) Pathological prognostic factors in breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol **31**: 209-23

Endl E, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown funktion. Exp Cell Res **15**:231-7

Fasching PA, Lux MP, Beckmann K, Strick R, Beckmann MW (2005) Entscheidungshilfen bei der Therapiewahl für Patientinnen mit Mammakarzinom. Gynäkologe **38**:388-97

Finlay CA, hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ (1988) Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product the forms an hsc 70-p53 complex with an altered half-life. Moll Cell Biol **8**: 531-9

Fisher B, Gebhardt MC (1978) The evolution of breast cancer surgery: past, present, and future. Semin Oncol **5**: 385-94

Fischer B, Bauer M, Margolese R, Poissom R, Pilch Y, Redmond C, Fischer E, Wolmark N, Deutsch M, Montagne E, Saffer E, Wickerham L, Lerner H, Glass A, Shibata H, Deckers P, Ketcham A, Oishi R, Russeli I (1985) Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of bresat cancer. N Engl J Med **312**: 665-73

Freedman DA, Wu L, Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. Cell Mol Life Sci **55**: 96-107

Fritz G, Dosch J, Thielmann HW, Kaina B (1993) Mocular and cellular characterisation of mex-/methylation-resistant phenotype, gene and cDNA cloning serum dependence, and tumor supression of transfectant strains. J Biol Chem **268**: 21102-12

Gee M, Robertson JF, Ellis IO, Willscher P, McClelland RA, Hoyle HB, Kyme SR, Finlay P, Blamey RW, Nicholson RI (1994) Immunocytochemical localisation of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series fo prognostic markers and response to endocrine therapy. Int J Cancer **59**:619-28

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer **15**: 13-20

Gerdes J, Lehmke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol **133**:1710-5

Goldhirsch A, Gelber RD, Coates AS (2005) What are the long-term effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer? Nat Clin Pract Oncol **2**: 440-1

Haller U, Winter R, Untch M (2004) Die Entwicklung der Mammakarzinomtherapie in Deutschland 2004 Gynäkol Geburtsh Rundsch **44**: 61-2

Harbek N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Janni W, Permanetter W, Raab G, Untch M, Zemzoum I (2003) Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. Manual Mammakarzinome by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München pp. 67-71

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. Science **253**: 49-53

Hurlimann J (1993) Prognostic value of p53 protein expression in breast carcinomas. Pathol Res Pract **189**: 996-1003

Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, Foekens JA (2001) Risk-adapted adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer based on tumor biological factors uPA and PAI-1: First interim analysis of a randomized multicenter trial. J Natl Cancer Inst **93**: 913-20

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MS (2004) American Cancer Society Cancer statistics. CA Cancer J Clin **54**: 8-29

Jenne DE, Tschopp J (1992) Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. Trends Biochem Sci **17**:154-9

Jiang M, Shao Zm, Wo J, Lu JS, Yu LM, Yuan Jd, Han QS, Shen ZZ, Fontana JA (1997) p32/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as a related to prognosis. Int J Cancer **74**: 529-34

Jordan-Stark TC, Witte DP, Aronow B, et al (1992) Apolipoprotein J: a membrane policeman? Curr Opin Lipidol **3**: 75-85

Kang YK, Hong SW, Lee H, Kim WH (2004) Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma. Hum Pathol **35**:1340-6

Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS (2002) Cyclin E and survival in patients with breast cancer. N Engl J Med **347**: 1566-75

Konecny G, Kahlert S, Sattler D, Kuhn W, Untch M (1998) Neoadjuvante Chemotherapie des Mammakarzinoms. In: Untch M, Konecny G et al. (Hrsg.): Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms - State of the Art. Zuckschwerdt, München-Bern-Wien-New York, p. 67

Krüger S, Weitsch G, Büttner H, Matthiensen A, Böhmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Böhle A (2002) Overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in muscle-invasive bladder carcinoma: relationship with gene amplification, clinicopathological parameters and prognostic outcome. Int J Oncol **21**:981-7

Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC (2006) Value of clusterin immunoreactivity as a predictive factor in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma. Urology **67**: 105-9

Lau R, Grimson R, Sansome C, Tornos C, Moll UM (2001) Low levels of cell cycle inhibitor p27kip1 combined with high levels of Ki-67 predict shortened disease-free survival in T1 and T2 invasive breast carcinoma. Int J Oncol **18**:17-23

Levine Aj, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumor supressor gene. Nature **351**: 453-6

Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Brünner N, Kates R, Fernö M, Eppenberger S, Spyrtos F, Thomssen C, Sweep CGJ, Peyrat JP, Martin PM, Blankenstein MA, Magdelenat H, Quillien-Pouvreau V, Daver, Ricolleau G, Daxenbichler G, Cufer T, Bendahl PO, Lisboa B, Ulm K, Christensen Ij, Meijer-van Gelder ME, Fiets E, Manders P, Broet P, Romain S, Windbichler G, Borstnar S, Beex LVRM, Jännicke F, Klijin JGM, Eppenberger U, Schmitt M, Foekens JA (2002) Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in 8,377 breast cancer patients. J Natl Cancer Inst **94**:116-128

Luo JH, Xie D, Chen W, Dai YP, Li XF, Tao Y, Zheng KL (2005) Correlation of clusterin expression to prognosis of bladder carcinoma. Ai Zheng **24**: 743-7

Mattfeld T, Kestler HA, Sinn HP (2004) Prediction of the axillary lymph node status in mammary cancer on the basis of clinicopathological data and flow cytometry. Med Biol Eng Comput **42**: 733-9

Miyake H, Eto H, Hara I, So A, Li D, Gleave ME (2004) Synergistic antitumor activity by combined treatment with gemcitabine and antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in an intravesical administration model against human bladder cancer. J Urol **171**: 1477-81

Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, Hara I (2002) Over expression of clusterin is an independent prognostic factor for nonpapillary renal cell carcinoma. J Urol **167**: 703-6

Mitra I, MacRae KD (1991) A meta-analysis of reported correlations between prognostic factors in breast cancer: Does axillary lymph node metastasis represent biology or chronology? Eur J Cancer **27**: 1574-83

Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, Nortilli R, Pelosi G, Getto GL (1997) Ki-67 immunoreactivity in 322 primary breast cancers: association with clinical and pathological variables and prognosis. Int J Cancer **74**: 433-7

McCann AH, Kirley A, Carney DN, Corbally N, Magee HM, Keating G, Dervan PA (1995) Amplification of the MDM2 gene in human breast cancer and its association with MDM2 and p53 protein status. Br J Cancer **71**: 981-5

Nascimento AF, Pinkus JL, Pincus GS (2004) Clusterin, a marker for anaplastic large cell lymphoma immunohistochemical profile in hematopoietic and non hematopoietic malignant neoplasms. Am J Clin Pathol **121**: 709-17

Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR (1994) Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. J Clin Oncol **12**: 888-94

Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) Oncoprotein MDM 2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53. Nature **362**: 857-60

O'Sullivan J, Whyte L, Drake J, et al (2003) Alterations in the post-translational modification and intercellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. Cell Death Differ **10**: 914-27

Pereira H, Pindler SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO (1995) Pathological prognostic factors in breast cancer. Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. Histopathology **27**: 219-26

Pfeiderer A (2000) Milestones in gynecological oncology over the last 20 years. Oncology **23**: 615-18

Pierga JY, Leroyer A, Viehl P, Mosseri V, Chevillard S, Magdelenat H (1996) Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. Breast Cancer Res Treat **37**: 57-64

Pinder SE, Ellis IO, Elston CW (1995) Prognostic factors in primary breast carcinoma. J Clin Pathol **48**: 981-3

Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM (1997) Expression of cell-cycle regulators p27 Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. Nat Med **3**: 222-5

Pucci S, Bonnano E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG (2004) Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. Oncogene **32**: 2298-304

Railo M, Nordling S, von Boguslawsky K, Leivonen M, Kyllonen L, von Smitten K (1993) Prognostic value of Ki-67 immunolabeling in primary operable breast cancer. Br J Cancer **68**: 579-83

Ranson M, Sliwkowski MX (2002) Perspectives on anti-HER monoclonal antibodies. Oncology **63**: 17-24

Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M, Petito CK (2000) Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. Am J Pathol **157**: 393-9

Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weier HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK (2000) The annual report of the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. Cancer **88**: 2398-424

Rolitsky CD, Theil KS, McGaughy VR, Copeland IJ, Niemann TH (1999) HER2 amplification and overexpression in endometrial carcinoma. Int J Gynecol Pathol **18**: 138-43

Ross JS, Sheehan CE, Hayner-Buchan AM, Ambros RA, Kallakury BV, Kaufman RP, Fisher HA, Rifkin MD, Muraca PJ (1997) Prognostic significance of HER2 gene amplification status by fluorescence in situ hybridization of prostate carcinoma. Cancer **79**: 2162-170

Scaltriti M, Betuzzi S, Sharrard RM, Caporali A, Caccamo AE, Maitland NJ (2004) Clusterin overexpression in both malignant and nonmalignant prostate epithelial cells induces cell cycle arrest and apoptosis. Br J Cancer **91**: 1842-50

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Pathon V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER 2 for metastatic breast cancer that overexpress HER2. New Engl J Med **344**: 783-92

Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (1999) Kompendium internistische Onkologie, 2. Aufl., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, p.1269

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol **182**: 311-22

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. Science **9**: 177-82

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt LA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989) Studies of the HER2 proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science **244**:707-12

Steinberg J, Oyasu R, Lang S, Sintich S, Rademarker A, Lee C, Kozlowski JM, Sensibar JA (1997) Intracellular levels of SGP-2 (clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. Clin Cancer Res **3**: 1707-11

Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H (1992) Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. J Clin Oncol **10**: 1044-48

Turbin DA, Cheany MC, Bajdik CD, Gelmon KA, Yorida E, De Luca A, Nielsen TO, Huntsman DG, Gilks CD (2006) MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma. Mol Pathol **19**: 69-74

Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz g, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. Mol Cell Biol **16**: 5276-87

Umekita Y, Takasaki T, Yoshida H (1994) Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, non-invasive and invasive mammary carcinoma: an immunohistochemical study. Virchows Arch **424**: 491-4

Umemura S, Komaki K, Noguchi S, Shiba E, Toi M, Kimijima II, Itoh H, Osamura YR (1998) Prognostic Factors for node-negative breast cancers: Results of a study program by the Japanese Breast Cancer Society. Breast Cancer **5**:243-49

Van Tienhoven G, Voogd AC, Deterse JL, Nielsen M, Andersen KW, Mignolet F, Sylvester R, Fentiman IS, van der Schueren E, van Zijl K, Blichert-Toft M, Bartelink H, van Dongen JA (1999) Prognosis after treatment for loco-regional recurrence after mastectomy or breast conserving therapy in two randomised trial (EORTC 10801 and DBCG-82 TM). Eur J Cancer **35**: 32-8

Visscher DW, Sakar FH, Wykes S, Kothari K, Macoska J, Crissman J (1993) Clinicopathologic significance of p53 immunostaining in adenocarcinoma of the breast. Arch Pathol Lab Med **117**: 973-6

Wellmann A, Thieblemont C, Pittaleya S, Sakay A, Jaffe ES, Siebert P, Raffald M (2000) Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. Blood **96**: 398-404

Wertheimer MD (1990): Primary treatment of early breast cancer. In: Hindle WH (Hrsg.) Breast disease for gynecologists. Appleton & Lange, Norwalk, p. 685

Willner J, Kiricuta IC, Kölbl O, Bohndorf W (1993) Prognosefaktoren beim Mammakarzinom - Klassifikation in nicht universitären Krankenhäusern. Zentralbl Chir **118**: 525-31

Witte DP, Arono BJ, Dry Jk, Harmony JA (1994) Temporally and spatially restricted expression of apolipoprotein J in the developing heart defines discrete stages of valve morphogenesis. Dev Dyn **201**: 290-6

Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH (2002) TNM residual tumor classification revisited. Cancer **94**: 2511-67

Wunsche W, Tenniswood MP, Schneider MR, Vollmer G (1998) Estrogenic regulation of clusterin mRNA in normal and malignant endometrial tissue. Int J Cancer **76**: 684-89

Xie D, Sham JS, Zeng WF, Che LH, Zhang M, Wu HX, Lin HL, Wen JM, Lau SH, Hu L, Guan XY (2005) Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression. World J Gastroenterol **11**: 3285-9

Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N (2002) Expression of clusterin in human pancreatic cancer. Pancreas **25**: 324-8

Yonemura Y, Ninomiya I, Tsugawa K, Fushida S, Fujimara T, Miyazaki I, Uchibayashi T, Endou Y, Sasaki T (1998) Prognostic significance of c-erbB-2 gene expression in the poorly differentiated type of adenocarcinoma of the stomach. Cancer Detect Prev **22**: 139-146

Zhang GJ, Kimijima I, Tsuchiya A, Abe R (1998) The role of bcl-2 expression in breast carcinomas. Oncol Rep **5**: 2111-6

7. Danksagung

Ich danke Frau Dr. med. Peters, der Chefärztin des Institutes für Pathologie am Städtischen Klinikum Lüneburg, für die Möglichkeit, Paraffinblöcke und Patientendaten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie entnehmen zu dürfen. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. med. Gille, dem ehemaligen Chefarzt der Gynäkologischen Abteilung am Städtischen Klinikum Lüneburg, für die Bereitstellung von Daten zur Krankheitsgeschichte der Patientinnen.

Frau Dr. med. Fischer, Oberärztin an der Klinik für Frauenheilkunde, Universitätsklinikum Lübeck, danke ich für die Mitbetreuung bei der Rekrutierung der Patientinnen.

Ich danke den MTAs im „Ecklabor“ des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Lübeck für die Geduld und Hilfsbereitschaft bei den immunhistochemischen Färbungen. Dem Direktor des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Lübeck, Herrn Professor Dr. Feller, danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung von Räumlichkeiten und Materialien seines Instituts.

Ich möchte auch Stefanie Schierholz, Studentin am Universitätsklinikum Lübeck, für die Hilfe bei der Arbeit und beim Umgang mit Patientinnendaten bedanken.

In erster Linie gilt mein großer Dank Herrn PD Dr. med. Stefan Krüger für die Themenstellung, Betreuung und Hilfestellungen bei dieser Arbeit. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ola, geb.Nazarova
Vorname: Vladislava
Geburtsdatum/-ort: 21.02.1977, Kiew (Ukraine)
Anschrift: Einemhofer Weg 35, 21391 Reppenstedt
Familienstand: verheiratet, eine Tochter (9 Jahre alt)
Religion: katholisch

Bildung

Schulbildung 1984-1994 allgemeinbildende Schule mit Schulabschluss (Hochschulreife) in Kiew

Hochschulbildung 1994-2001 Medizinische Hochschule des Ukrainischen Verbandes für Volksmedizin in Kiew

2004-2005 Immatrikulation (Fachbereich Humanmedizin), Universität Göttingen; Absolvierung des Praktischen Jahres (Fächer: Innere Medizin, Chirurgie, Pathologie)

April 2006 Erlangung der Approbation am 15.04.2006

Berufstätigkeit

seit 1.05.2006 Assistenzärztin am Institut für Pathologie, Marienkrankenhaus Hamburg

Anhang

Die in dieser Dissertationsschrift beschriebene Studie ist inhaltlich durch den von Professor Stürzbecher (Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Lübeck) unter dem Aktenzeichen 98-039 eingereichten und von der Ethik-Kommission des UK S-H (Campus Lübeck) in ihrem Bewilligungsschreiben vom 11.05.1998 bzw. in ihrem aktualisierten Bewilligungsschreiben vom 11.02.2003 genehmigten Ethikantrag gedeckt.

Die Inhalte dieser Dissertationsschrift sind in einem internationalen wissenschaftlichen Journal zur Veröffentlichung eingereicht und akzeptiert worden.

Die Zitation des Artikels lautet wie folgt:

S. Krüger, V. Ola, D. Fischer, A. C. Feller, M. Friedrich (2007):

Prognostic significance of clusterin immunoreactivity in breast cancer.

Neoplasma **54**: 46-50 (im Druck)