

Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

Expression der Carboanhydrase IX und der
Hypoxie-Induzierbaren Faktoren 1 α und 2 α

**Verlaufsbeobachtung unter primär systemischer
Therapie**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Anja Schönfelder
aus Weiden i. d. Oberpfalz

2007

Dekan:	Professor Dr. I. B. Authenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. N. Fersis
2. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Fandrey

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms	6
1.2. Primär systemische Therapie.....	6
1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren.....	7
1.3.1. Definition	7
1.3.2. Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz.....	7
1.3.2.1. Alter	7
1.3.2.2. TumorgroÙe und regionale Lymphknoten	8
1.3.2.3. Morphologie	8
1.3.2.4. Steroidhormonrezeptoren	9
1.3.3. Neue Prognosefaktoren	9
1.3.3.1. Ki-67/Mib-1	9
1.3.3.2. p53.....	9
1.3.3.3. bcl-2.....	10
1.3.3.4. c-erbB-2.....	10
1.3.4. Prädiktive Faktoren	11
1.4. Hypoxie.....	11
1.5. Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF).....	12
1.5.1. HIF in Tumoren	13
1.5.2. Tumorassoziierte Makrophagen	14
1.6. Carboanhydrasen	14
1.6.1. Tumorassoziierte Carboanhydrasen.....	15
1.6.2. Kontrolle der tumorassoziierten Carboanhydrasen	16
1.6.3. CA IX-Expression in Mammagewebe	16
1.7. Ziel der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Patientenkollektiv	18
2.2. Diagnosesicherung	19
2.3. Datenerhebung	19
2.4. Histologie	19
2.4.1. Tumorstadium.....	19
2.4.2. Histologische Klassifikation	20
2.4.3. Grading	20
2.5. Immunhistochemie.....	20
2.5.1. Auswahl und Zuschneiden der Präparate.....	20
2.5.2. Immunhistochemische Färbungen	21
2.5.2.1. HIF-1 α	21
2.5.2.2. Immunhistochemie der übrigen Parameter.....	23
2.5.3. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	26
2.6. Ansprechen auf die primär systemische Therapie	27
2.7. Statistik	28
2.8. Fotoaufnahmen.....	28
3. Ergebnisse	29

3.1. Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika.....	29
3.1.1. Altersverteilung im Patientenkollektiv	29
3.1.2. Tumorgröße und Lymphknotenstatus	29
3.1.3. Tumorhistologie und Grading	31
3.1.4. Prognosefaktoren	32
3.2. Therapie.....	34
3.2.1. Primär systemische Therapieschemata	34
3.2.2. Ansprechen auf die primär systemische Therapie.....	34
3.3. CA IX-Expression.....	36
3.3.1. Veränderung der CA IX-Expression.....	39
3.3.2. CA IX und Response	40
3.4. HIF-1 α Expression	42
3.4.1. Veränderung der HIF-1 α Expression.....	43
3.4.2. HIF-1 α und Response	45
3.5. HIF-2 α Expression	45
3.5.1. Veränderung der HIF-2 α -Expression in Tumorzellen	46
3.5.2. HIF-2 α und Response	48
3.5.3. HIF-2 α -Expression in Makrophagen	48
3.6. Expression der übrigen Faktoren.....	49
3.6.1. Östrogenrezeptor	49
3.6.2. Progesteronrezeptor.....	52
3.6.3. Mib-1	55
3.6.4. p53	58
3.6.5. bcl-2	60
3.6.6. c-erbB-2	62
3.7. Multivariates Modell	64
3.8. Abhängigkeit von CA IX, HIF-1 α und HIF-2 α	65
4. Diskussion	66
4.1. Patientenkollektiv	66
4.2. Ansprechen auf die primär systemische Therapie	69
4.2.1. Chemotherapie.....	69
4.2.2. Hormonwirksame Therapie	70
4.3. CA IX- Expression.....	72
4.4. HIF-1 α -Expression.....	75
4.5. HIF-2 α -Expression.....	77
4.5.1. HIF-2 α in Tumoren	77
4.5.2. HIF-2 α in tumorassoziierten Makrophagen	80
4.6. Expressionsänderung der Prognosefaktoren unter primär systemischer Therapie	81
4.6.1. Östrogenrezeptor	81
4.6.2. Progesteronrezeptor.....	82
4.6.3. Mib-1	83
4.6.4. p53	83
4.6.5. bcl-2	85
4.6.6. c-erbB-2	85
5. Zusammenfassung.....	87

Anhang	89
1. Abkürzungen.....	89
2. TNM-Klassifikation	90
3. WHO-Klassifikation der Mammakarzinome.....	91
4. Grading.....	92
5. Dako HercepTest-Score	93
6. Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner.....	93
Abbildungen und Tabellen.....	94
1. Abbildungsverzeichnis	94
2. Tabellenverzeichnis.....	96
Literaturverzeichnis	97
Danksagung.....	113
Lebenslauf	114

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. In Deutschland erkrankt etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (Engel et al., 2003). 1998 wurde bei über 46.000 Frauen erstmals ein Mammakarzinom diagnostiziert, darunter waren knapp 19.000 Frauen unter 60 Jahren. Damit macht das Mammakarzinom mehr als ein Viertel aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen in Deutschland aus.

Im folgenden Jahr starben mehr als 17.600 Frauen an den Folgen dieser Krebserkrankung. Fast 5.000 von ihnen waren jünger als 60 Jahre. (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Die 5-Jahres-Überlebensquote bei unbehandelten Patientinnen betrug 18%, die 10-Jahres-Überlebensquote sogar nur 3,6% (Bloom et al., 1962). Dagegen überleben nach Zahlen aus den USA heute von 100 behandelten Patientinnen 86 die ersten fünf und 76 die ersten zehn Jahre nach der Diagnose des Mammakarzinoms (American Cancer Society, 2001, Brenner, 2002).

1.2. Primär systemische Therapie

Die primär systemische Therapie, auch neoadjuvante Therapie genannt, wird beim Mammakarzinom zur Zeit vor allem bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen im Rahmen von Studien angewandt.

Dabei handelt es sich um eine präoperative systemische Therapie mit dem Ziel, den Tumor zu verkleinern und damit eine brusterhaltende Operation zu ermöglichen (Bonadonna et al., 1990, Fisher et al., 1997).

Zudem kann man mit dieser Therapieform das Ansprechen eines Karzinoms auf die jeweilige Medikation, die als adjuvante Therapie ansonsten postoperativ verabreicht wird, überprüfen. Sie erlaubt somit eine in-vivo-Testung der Medikamentensensitivität des Tumors, welche eng mit dem weiteren Verlauf der Erkrankung korreliert.

Bezüglich der rezidivfreien Zeit und der Gesamtüberlebenszeit zeigt die primär systemische Therapie allerdings keinen Vorteil gegenüber der rein adjuvanten, also postoperativ verabreichten Therapie (Fisher et al. 1998). Die endgültige Bewertung steht aber aufgrund der kurzen Beobachtungszeit noch aus, zumal gerade beim Mammakarzinom nach Jahrzehnten noch Spätrezidive auftreten können.

Abhängig von den Eigenschaften des Karzinoms und dem Menopausenstatus der Patientin besteht entweder die Möglichkeit einer primär systemischen Chemo- oder endokrinen Therapie. Letztere kommt für Patientinnen nach der Menopause mit einem hormonrezeptorpositiven Karzinom in Betracht.

1.3. Prognostische und prädiktive Faktoren

1.3.1. Definition

Prognostische Faktoren lassen erkennen, mit welcher Wahrscheinlichkeit mit einem späteren Wiederauftreten der Erkrankung (Rezidiv, Metastasierung) oder mit dem Tod durch die Erkrankung zu rechnen ist. Sie geben also über die Aggressivität Auskunft und damit über die Risiken der Tumorpatientin in der Zukunft.

Unter prädiktiven Faktoren versteht man dagegen therapierrelevante Faktoren, die das Ansprechen des Tumors auf eine bestimmte Therapie möglichst gut vorhersagen.

1.3.2. Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz

1.3.2.1. Alter

Das Alter selbst ist ein wichtiger Prognosefaktor. In einer Studie an 1703 prämenopausalen Patientinnen zeigte sich in der multivariaten Analyse für die Gruppe der unter 34jährigen ein 2,2-fach höheres Rezidivrisiko als bei den über 40jährigen. Auch das Risiko an einem Mammakarzinom zu versterben war in der Gruppe der jüngeren Frauen erhöht (Rochefordière et al., 1993).

In einem unselektierten Kollektiv von 31.594 Mammakarzinompatientinnen hatten ebenfalls die unter 35jährigen die schlechteste Prognose (Høst et al., 1986).

1.3.2.2. Tumorgröße und regionale Lymphknoten

Die Größe des Primärtumors ist von besonderer Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms (Duncan et al., 1976). Anhand der Daten von 24.740 Patientinnen konnte gezeigt werden, dass zwischen Tumorgröße und Gesamtüberleben eine lineare Beziehung besteht. Dabei haben Patientinnen mit einem Tumor von weniger als 2,0 cm Durchmesser die besten Langzeitüberlebenschancen.

Von allen Prognoseparametern beim Mammakarzinom ist der axilläre Lymphknotenstatus der aussagekräftigste Einzelfaktor. Auch hier besteht eine lineare Beziehung zwischen der Zahl der befallenen Lymphknoten und dem Gesamtüberleben (Carter et al., 1988, Winstanley et al., 1991, Fisher et al., 1993).

Aber nicht nur die Anzahl der tumorbefallenen Lymphknoten ist von prognostischer Bedeutung, sondern auch die Unversehrtheit der Lymphknotenkapsel. Ein Durchbruch des Tumorgewebes durch die Kapsel und damit eine Invasion ins axilläre Fettgewebe korreliert mit einer Prognoseverschlechterung (Wulf, Schmidt-Matthiesen, 1996).

Die Tumorgröße und der Befall der axillären Lymphknoten zählen zu den bereits etablierten Prognosefaktoren und werden bei der Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation berücksichtigt (Spiessel et al., 1993).

1.3.2.3. Morphologie

Ein weiterer etablierter Prognosefaktor ist der histologische Differenzierungsgrad des Karzinoms, der durch das Grading repräsentiert wird. Mit dem Grad der Entdifferenzierung sinkt das Gesamtüberleben signifikant (Bloom und Richardson, 1957).

Auch der histologische Typ des Karzinoms hat prognostische Bedeutung. So haben zum Beispiel invasiv tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome eine signifikant bessere Prognose als invasiv duktales (Fisher et al., 1993).

Ein Karzinomeinbruch in Lymphspalten, Lymphangiosis carcinomatosa genannt, bedeutet ebenfalls eine Prognoseverschlechterung (Bilik et al., 1986).

1.3.2.4. Steroidhormonrezeptoren

Der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus zählt ebenfalls zu den anerkannten Prognosefaktoren. Beide Rezeptoren werden nukleär exprimiert und können immunhistochemisch am Paraffinschnitt nachgewiesen werden.

Man spricht auch dann von einem positiven Hormonrezeptorstatus, wenn nur einer der beiden Rezeptoren positiv ist.

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen positivem Hormonrezeptorstatus und dem Differenzierungsgrad eines Mammakarzinoms: Ein G1-Karzinom ist in 80-90%, ein G3-Karzinom dagegen nur in 30-50% der Fälle positiv. Rezeptorpositive Karzinome werden prognostisch günstiger eingeschätzt als die rezeptornegativen (Knight et al., 1977, Mason et al., 1983, Thorpe et al., 1987).

1.3.3. Neue Prognosefaktoren

1.3.3.1. Ki-67/Mib-1

Mit den monoklonalen Antikörpern Ki-67 und Mib-1 kann an Gefrierschnitten bzw. an formalinfixierten Schnitten ein nukleäres Antigen nachgewiesen werden, das in allen Phasen des Zellzyklus, außer der G₀-Phase exprimiert wird. Das heißt, die immunhistochemische Anfärbung dieses Antigens zeigt die Wachstumsfraktion von normalem und neoplastischem Gewebe an (Gerdes et al., 1984, Cattoretti et al., 1992).

Karzinome mit einer hohen Wachstumsfraktion haben eine höhere Rezidivrate, als solche, die dieses Antigen nicht so stark oder gar nicht exprimieren (Bouzubar et al., 1989).

1.3.3.2. p53

Das Tumorsuppressorgen p53 liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 und hat die Aufgabe, die Zellteilung bei einer Schädigung des Genoms zu hemmen. Es kann einerseits verhindern, dass die Zelle in die S-Phase des Zellzyklus übertritt, andererseits kann es Apoptose induzieren.

Wird das p53-Gen durch Mutation inaktiviert, kommt es zu einer Anhäufung von DNA-Schäden, ohne dass der programmierte Zelltod eintritt. Die Folgen sind andauernde Proliferation und fortschreitende Entartung (Lane, 1992).

Mutationen im p53-Gen bewirken eine Stabilisierung des p53-Proteins. Dadurch akkumuliert das defekte Genprodukt und es lässt sich immunhistochemisch nachweisen.

Karzinome mit einer Mutation im p53-Gen zeigen ein progressiveres und aggressiveres Wachstum und sprechen schlechter auf adjuvante Chemotherapie an (Lowe et al., 1994, Bergh et al., 1995, Thames et al., 2002).

1.3.3.3. bcl-2

Die bcl-2-Familie wird zu den Protoonkogenen gezählt und kodiert ein Protein, das auf der Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Dieses Protein reguliert, das heißt stimuliert oder blockiert als Apoptoseinhibitor die Apoptose.

In Mammakarzinomen korreliert die Expression von bcl-2 mit Hormonrezeptorpositivität und niedrigem Grading (van Slooten et al., 1996). Der Verlust einer bcl-2-Expression ist dagegen mit ungünstigen Prognosefaktoren wie p53-Mutationen und einem hohen histologischen Grading assoziiert (Yang und Korsmeyer, 1996).

Bcl-2-Positivität signalisiert also weniger aggressive und prognostisch günstigere Tumoreigenschaften (Krajewski et al., 1999)

1.3.3.4. c-erbB-2

C-erbB2, auch HER-2/neu genannt, ist ein Protoonkogen, das ein transmembranäres Glykoprotein kodiert, welches Wachstumsfaktoren binden kann. Dieses Glykoprotein gehört zu der Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinase und hat große Ähnlichkeit mit dem natürlich vorkommenden Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR).

20-25% aller Mammakarzinome weisen eine Überexpression von c-erbB-2 auf, welche mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist (Gullick et al., 1991, Winstanley et al., 1991). Sie korreliert auch mit Hormonrezeptornegativität, einem hohen Grading, der Tumorgroße und der Anzahl positiver Lymphknoten (Gusterson et al., 1992, Paik et al., 1998).

1.3.4. Prädiktive Faktoren

Die prädiktiven Faktoren, die heute im klinischen Einsatz sind, sind in erster Linie der Hormonrezeptorstatus und der HER-2/neu-Status.

Ein positiver Hormonrezeptorstatus ist prädiktiv für das Ansprechen auf endokrine Therapiemaßnahmen. Neuere Daten deuten außerdem darauf hin, dass Patientinnen mit hormonrezeptornegativen Tumoren signifikant besser auf eine primär systemische Chemotherapie ansprechen als solche mit einem hormonrezeptorpositiven Tumor (Gianni et al., 2002, Faneyte et al., 2003).

Der semiquantitative Nachweis des membranständigen c-erbB-2-Proteins kann immunhistochemisch am Paraffinschnitt erbracht werden und ist die Voraussetzung für eine systemische Therapie mit dem anti-HER-2/neu-Antikörper Trastuzumap (Herceptin®). Dabei ist c-erbB-2 ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf die Antikörpertherapie (Piccart et al., 2001, Leyland-Jones, 2002).

Außerdem scheinen c-erbB-2-positive Tumoren besser auf anthrazyklinhaltige Chemotherapien zu reagieren als auf Schemata ohne ein Anthrazyklin. Dieser Unterschied wurde bei c-erbB-2-negativen Tumoren nicht beobachtet (Paik et al., 1998, Kreienberg et al. 2002).

Es wurden zwar zahlreiche weitere Faktoren auf ihren prädiktiven Wert hin untersucht, darunter p53, Ki-67 und bcl-2. Nach bisherigem Stand der Forschung tragen diese aber nur wenig zu einer besseren Vorhersehbarkeit des Therapieansprechens bei (Übersicht in Ring und Ellis, 2002).

1.4. Hypoxie

In menschlichen Zellen muss die Sauerstoffkonzentration in engen physiologischen Grenzen gehalten werden, da molekularer Sauerstoff als Substrat für die oxidative Phosphorylierung und andere biochemische Reaktionen benötigt wird. Im Falle eines Sauerstoffmangels (Hypoxie) reagiert die Zelle deshalb mit dem Umschalten auf alternative Stoffwechselwege wie die Glykolyse.

In soliden Tumoren ist Hypoxie von besonderer Bedeutung. Ohne Neoangiogenese werden Tumoren selten größer als 2-3 mm, da die Rate an proliferierenden Zellen mit der an absterbenden Zellen im Gleichgewicht ist. Erst die Entwicklung eines angiogenetischen Phänotyps ermöglicht ein stärkeres Tumorstadium (Übersicht in Folkman, 1995).

Aufgrund des raschen und ungebremsen Wachstums von Tumorzellen entstehen in Tumoren oft hypoxische Bereiche, da die Angiogenese und damit die Sauerstoffversorgung mit dem raschen Wachstum nicht mithalten kann.

Durch die größere Entfernung zu Blutgefäßen erreichen Medikamente die hypoxischen Zellen in geringerer Konzentration als Zellen in der Nähe von Blutgefäßen. Zusätzlich nimmt die Teilungsrate mit wachsendem Abstand zu Blutgefäßen ab. Da Chemotherapeutika sich aber gegen proliferierende Zellen richten, sind hypoxische Zellen weniger anfällig dafür (Übersicht in Brown und Giaccia, 1998).

Auch die Strahlensensibilität ist abhängig von der Sauerstoffversorgung. Je geringer der Sauerstoffgehalt ist, umso unempfindlicher ist die Tumorzelle gegenüber der Strahlung (Gray et al., 1953).

Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass unter Hypoxie die Östrogenrezeptoren herunterreguliert werden (Kurebayashi et al., 2001).

Dies sind mögliche Erklärungen dafür, dass Tumoren mit einer niedrigen pO_2 -Konzentration ein schlechteres Therapieansprechen haben, mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind und eher metastasieren (Brizel et al., 1996, Höckel et al., 1996).

In einer Untersuchung von Vaupel et al. hatten 40% der Mammakarzinome einen pO_2 kleiner 2,5 mmHg, während in normalem Mammaparenchym kein pO_2 -Wert kleiner 12,5 mmHg gemessen wurde (Vaupel et al., 1991).

1.5. Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)

Eine wichtige Rolle bei der Anpassung einer Zelle an Hypoxie spielen die hypoxie-induzierbaren Faktoren, kurz HIF, von denen bisher drei Isoformen identifiziert wurden: HIF-1, HIF-2 und HIF-3 (Übersicht in Semenza, 1999, Acker und Plate, 2002).

Die am besten untersuchte Isoform dieser Transkriptionsfaktoren ist HIF-1. Es handelt sich um ein Heterodimer aus den Untereinheiten HIF-1 α und ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), auch bekannt als HIF-1 β . Beide Untereinheiten enthalten basische Helix-Loop-Helix- (bHLH) und PAS-Domänen (Wang et al., 1995), die für die Dimerisation und DNA-Bindung von Bedeutung sind (Jiang et al., 1996a).

Für die Isoformen HIF-1 α und HIF-2 α konnte eine hypoxieabhängige Expression nachgewiesen werden (Jiang et al., 1996b, Wiesener et al., 1998), während ARNT konstitutiv, unabhängig von der Sauerstoffkonzentration exprimiert wird. Unter normoxischen Bedingungen werden die HIF- α -Untereinheiten schnell wieder durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Salceda und Caro, 1997). Bei Hypoxie dagegen wird die Ubiquitinierung deutlich gesenkt und die Proteinlevel steigen schnell an (Sutter et al., 2000). Jetzt kann HIF-1 α mit der β -Untereinheit im Kern dimerisieren und HIF-1 als stabiles Heterodimer die Transkription von hypoxieabhängigen Genen regulieren. Ziel dieser HIF-1 vermittelten Transkription sind der Angiogenesefaktor VEGF, Erythropoetin, verschiedene glykolytische Enzyme, Glukosetransporter, Transferrin, die Carboanhydrasen IX und XII und viele andere (Übersicht in Goonewardene et al., 2002).

1.5.1. HIF in Tumoren

Auch in Tumoren wirkt eine niedrige Sauerstoffkonzentration als physiologischer Stimulus auf HIF. Zusätzlich kann die HIF-1 α -Konzentration beziehungsweise die HIF-1-Transkriptionsaktivität durch genetische Veränderungen wie die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erhöht werden (Semenza, 2000).

Eine Überexpression von HIF-1 α und HIF-2 α konnte in zahlreichen Tumoren nachgewiesen werden, darunter Mamma-, Kolon-, Ovarial-, Prostata-, Blasen- und Nierenkarzinome (Zhong et al., 1999, Talks et al., 2000). Interessanterweise wurde in tumorassoziierten Makrophagen eine hohe Expression von HIF-2 α gefunden, zum Teil auch in Fällen, in denen die Tumorzellen selbst kein HIF-2 α exprimierten (Talks et al., 2000).

In normalem Mammaparechym und hyperplastischem Mammagewebe konnte kein HIF-1 α nachgewiesen werden. In duktalem In-situ-Karzinomen und in invasiven Mammakarzinomen dagegen fand sich eine unterschiedlich hohe HIF-1 α -Expression. Diese war besonders hoch in den jeweils maligneren Subtypen, also im schlecht differenzierten DCIS höher als im gut differenzierten und im schlecht differenzierten invasiven Karzinom höher als im gut differenzierten invasiven Karzinom (Bos et al. 2001).

In Mammakarzinomen ist eine HIF-1 α -Überexpression mit einem signifikant kürzerem Gesamtüberleben und einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Schindl et al., 2002, Bos et al., 2003).

1.5.2. Tumorassoziierte Makrophagen

Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) tragen zur Angiogenese bei, indem sie angiogenetische Faktoren wie VEGF und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) freisetzen (Leek et al., 2002). In Mammakarzinomen ist eine erhöhte Makrophageninfiltration sowohl mit Angiogenese als auch mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Leek et al., 1996).

Im Gegensatz zu normalen Gewebsmakrophagen exprimieren TAMs regelmäßig in hohem Maße HIF-2 α , oft auch in Fällen, in denen in den Tumorzellen kein HIF-2 α nachgewiesen werden kann (Talks et al., 2000).

Diese HIF-2 α exprimierenden TAMs sind mit einer höheren Dichte an Mikrogefäßen und einem höheren Grading assoziiert, nicht aber mit einer schlechteren Prognose (Leek et al., 2002).

1.6. Carboanhydrasen

Carboanhydrasen sind Zink-Metalloenzyme, die beim Menschen in mehreren Isoformen vorkommen. Sie katalysieren die reversible Hydratation von CO₂:



H₂CO₃ zerfällt spontan zu HCO₃⁻ und H⁺.

Ein Teil der Isoenzyme kommt in fast allen Geweben des menschlichen Körpers vor (CA II), beim anderen Teil ist die Expression auf bestimmte Regionen begrenzt. So wurde zum Beispiel die Carboanhydrase VI bisher nur im Speichel gefunden.

In den Zellen konnten Carboanhydrasen sowohl im Zytosol (CA I, II, III, VII) als auch in Mitochondrien (CA V) und Membranen (CA IV, IX, XII, XIV) nachgewiesen werden.

Dieses heterogene Verteilungsmuster der verschiedenen Isoenzyme innerhalb von Geweben, Organen und Zellen weist auf ganz unterschiedliche Funktionen dieser Enzymgruppe hin. Dazu gehören die Erhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts, Gasaustausch, Ionentransport, und Schleimhautschutz (Übersicht in Sly und Hu, 1995, Potter und Harris, 2003).

1.6.1. Tumorassoziierte Carboanhydrasen

Bei dem Isoenzym CA IX handelt es sich um ein erst vor einigen Jahren charakterisiertes, membranständiges Enzym, das durch das Gen CA9 kodiert wird (Pastorek et al., 1994, Opavský et al., 1996). Physiologischerweise kommt CA IX zum Beispiel im Gastrointestinaltrakt, in Gallenblase und Gallengangssystem und in Hoden und Ovar vor (Ivanov et al., 2001).

Es wurde zunächst in HeLa-Zellen, einer menschlichen Zervixkarzinom-Zelllinie, gefunden. Dort stieg die CA IX-Expression mit wachsender Zelldichte (Zavada, 1993).

Auch in zahlreichen menschlichen Tumoren wird CA IX exprimiert, darunter Karzinome der Mamma (Ivanov et al., 2001). In dieser Untersuchung waren 26% der duktaalen und 14% der lobulären Mammakarzinome CA IX-positiv, während Chia et al. (Chia et al., 2001) in 48% der untersuchten Mammakarzinome CA IX nachweisen konnten.

Eine CA IX-Expression unterschiedlichen Ausmaßes ist außerdem für Nierenzellkarzinome (Ivanov et al., 2001), Zervixkarzinome (Liao et al., 1994, Lancaster et al., 2001), Kopf-Hals-Tumoren (Koukourakis et al., 2001), nichtkleinzellige Bronchialkarzinome (Swinson et al., 2003) und andere Karzinome beschrieben.

Die Expression von CA IX in Tumorgewebe ist nach ersten Daten nicht mit einer Mutation der CA9-cDNA verbunden. Sequenzanalysen von CA9-cDNA aus normalem menschlichen Magenepithel und aus HeLa-Zellen zeigten keinen Sequenzunterschied (Pastoreková et al., 1997).

Ein weiteres tumorassoziiertes Isoenzym ist CA XII, welches große strukturelle Ähnlichkeit mit CA IX hat und ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert ist. Allerdings deuten erste Untersuchungen darauf hin, dass eine CA XII-Expression in Mammakarzinomen im Gegensatz zu einer CA IX-Expression mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert ist (Watson et al., 2003).

1.6.2. Kontrolle der tumorassoziierten Carboanhydrasen

Die beiden tumorassoziierten Carboanhydrasen werden in zahlreichen malignen Zelllinien, darunter Mamma-, Zervix- und Bronchialkarzinomzellen, durch Hypoxie induziert. Auch spielt das von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen (VHL) eine wesentliche Rolle, denn in Zelllinien mit einer VHL-Mutation werden beide Isoenzyme konstitutiv, also ohne Regulation durch Hypoxie, exprimiert. Die gleiche Zelllinie mit dem Wildtyp des VHL-Gens reagiert nur bei Hypoxie mit einer vermehrten CA-Expression (Wykoff et al., 2000).

Im CA9-Promoter wurde eine Bindungsstelle für HIF-1 α gefunden und es konnte gezeigt werden, dass eine CA IX-Induktion in Zelllinien mit defektem HIF-1 α nicht erfolgt. Mutationen in dieser Promoterregion verhindern ebenfalls eine entsprechende Antwort auf Hypoxie (Wykoff et al., 2000).

Beim Zervixkarzinom besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Tumorphypoxie in vivo und einer gesteigerten CA IX-Expression in der Tumorbiopsie (Loncaster et al., 2001).

1.6.3. CA IX-Expression in Mammagewebe

In normalem Mammaparenchym sind sowohl die duktales als auch die lobulären Komponenten CA IX-negativ (Ivanov et al., 2001) und in gutartigen Läsionen, wie zystischen Veränderungen oder apokriner Metaplasie, konnte das Protein ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Dagegen findet sich eine CA IX-Expression in In-situ-Karzinomen (DCIS) und invasiven duktalem Karzinomen. Hierbei ist vor allem eine Expression in Tumorzellen zu beobachten, die in unmittelbarer Nähe von Nekrosen liegen (Wykoff et al., 2001).

Es gibt erste Hinweise darauf, dass eine CA IX-Expression beim Mammakarzinom mit kürzerem rezidivfreiem Überleben und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert ist, also einen potentiellen prognostischen Faktor darstellt (Chia et al., 2001). Auch bezüglich des prädiktiven Wertes von CA IX gibt es eine erste Untersuchung, die ergab, dass Patientinnen mit einem niedrigen CA IX-Level eher von einer adjuvanten Therapie zu profitieren scheinen, als diejenigen mit hoher CA IX-Expression (Span et al., 2003).

1.7. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine prädiktive Aussagekraft der hypoxieinduzierbaren Faktoren CA IX, HIF-1 α und HIF-2 α besteht und wie sich die Expression dieser Faktoren unter primär systemischer Chemotherapie und primär systemischer endokriner Therapie verhält. Dazu wurden diese in prätherapeutischen Stanzbiopsien und den posttherapeutischen Operationspräparaten immunhistochemisch angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Außerdem wurden die morphobiologischen Faktoren Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, p53, bcl-2, Ki-67 und c-erbB-2 erfasst und die Expression unter primär systemischer Therapie bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurden retrospektiv Daten von 93 Patientinnen erhoben, bei denen im Zeitraum 07/98 bis 05/02 ein lokal fortgeschrittenes Mammakarzinom (T2-T4) diagnostiziert wurde und die sich einer primär systemischen Therapie unterzogen haben. Alle Patientinnen wurden primär im Brustzentrum der Universitätsfrauenklinik Tübingen behandelt.

Die primär systemische Therapie erfolgte entweder als Chemotherapie mit den Schemata AT, ET oder EC (s. Tabelle 2.1) oder als endokrine Therapie mit den Aromataseinhibitoren Letrozol oder Exemestan. Beide Aromataseinhibitoren wurden im Rahmen eines Studienprotokolls eingesetzt. Zielgruppe waren postmenopausale Frauen mit positivem Hormonrezeptorstatus.

Es wurden jeweils sechs Zyklen Chemotherapie im Abstand von drei Wochen verabreicht, es sei denn ein Zyklus musste wegen einer Leukopenie von unter 1000 Leukozyten/ μl verschoben werden. Die Gabe von Aromataseinhibitoren erfolgte täglich über einen Zeitraum von vier, in Einzelfällen von bis zu sechs Monaten (s. Tab. 2.1).

Anschließend erfolgte entweder eine brusterhaltende Operation mit anschließender Bestrahlung oder eine Mastektomie.

AT	Adriamycin (Doxorubicin) Taxotere [®] (Docetaxel)	50 mg pro m ² Körperoberfläche 75 mg pro m ² Körperoberfläche
ET	Epirubicin Taxol [®] (Paclitaxel)	60 mg pro m ² Körperoberfläche 175 mg pro m ² Körperoberfläche
EC	Epirubicin Cyclophosphamid	60 mg pro m ² Körperoberfläche 600 mg pro m ² Körperoberfläche
	Letrozol	Femara [®] 2,5 mg täglich
	Exemestan	Aromasin [®] 25 mg täglich

Tabelle 2.1: Therapieschemata für die primär systemische Therapie

Entsprechend der Therapie erfolgte die Gruppeneinteilung für die Auswertung der vorliegenden Studie in eine Chemotherapiegruppe und eine Hormontherapiegruppe.

Die Chemotherapiegruppe bestand aus 62 Patientinnen, die Gruppe mit einer endokrinen Therapie aus 31 Patientinnen.

2.2. Diagnosesicherung

Bei allen 93 Patientinnen erfolgte die histologische Diagnosesicherung des Mammakarzinoms durch eine sonographisch gestützte Hochgeschwindigkeitsstanze (Bard, 14G) anhand von durchschnittlich 5 Biopsaten. Die sonographischen Untersuchungen wurden mit einem 15 MHz-Schallkopf durchgeführt.

2.3. Datenerhebung

Die persönlichen und klinischen Daten der Patientinnen wurden anhand der Patientenakten, der histopathologischen Befunde und der Sonographiebefunde erhoben und in einer Excel-Tabelle erfasst. Insbesondere wurden das Alter bei Diagnose, die Art der primär systemischen Therapie, die sonographisch beziehungsweise histopathologisch bestimmte Tumorgröße, die histopathologische Tumorklassifikation und die routinemäßig bestimmten immunhistologischen Parameter (ER, PgR, p53, bcl-2, Mib-1 und c-erbB-2) dokumentiert.

In den Fällen, in denen die letztgenannten Parameter nicht sowohl bei der Stanzbiopsie als auch bei dem OP-Präparat bestimmt worden sind, wurde eine entsprechende Immunhistologie nachgemacht.

2.4. Histologie

Anhand der histopathologischen Befunde wurde das Tumorstadium, der histologische Karzinomtyp, das Grading und die immunhistochemisch bestimmten Parameter erfasst.

2.4.1. Tumorstadium

Die Stadieneinteilung der Mammakarzinome erfolgte nach der TNM-Klassifikation der UICC (s. Anhang, Spiessel et al., 1993).

Für die pTN-Klassifikation wurde die Tumorgöße nach Messung der invasiven Komponente im OP-Präparat bestimmt und mindestens 10 axilläre Lymphknoten untersucht.

In die TNM-Klassifikation gehen auch die Fernmetastasen mit ein, diese wurden aber in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt.

2.4.2. Histologische Klassifikation

Die Einteilung der untersuchten Mammakarzinome erfolgte nach der Nomenklatur der WHO aus dem Jahre 1981 (s. Anhang).

In Fällen, bei denen in den Befunden die WHO-Klassifikation von Stanzbiopsie und OP-Präparat unterschiedlich angegeben war, wurde die Diagnose des OP-Präparates verwendet, da hier eine größere Schnittfläche zur Beurteilung zur Verfügung stand. Die gelegentlich in den Befunden vorkommende Klassifikation „invasives duktulo-lobuläres Karzinom“ wurde den invasiv-duktalem Karzinomen zugeordnet.

2.4.3. Grading

Der histologische Differenzierungsgrad eines Tumors wird durch das Grading charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde das modifizierte Grading nach Bloom und Richardson verwendet (Bloom und Richardson, 1957, Elston und Ellis, 1991, s. Anhang).

2.5. Immunhistochemie

2.5.1. Auswahl und Zuschneiden der Präparate

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie wurden jene Paraffinblöcke herausgesucht, von denen auch die Schnitte der routinemäßig immunhistochemisch bestimmten Parameter ER, PgR, p53, bcl-2, Mib-1 und c-erbB-2 stammten. Dieses Vorgehen gewährleistet, dass die einzelnen Faktoren miteinander vergleichbar sind, da sie an ein und dem selben Tumorblock bestimmt wurden.

Mit dem Schlittenmikrotom Leica SM 2000R wurden circa 4 μm dicke Schnitte angefertigt und auf silanisierte Objektträger der Fa. Sigma (Silane Prep TM Slides, Best.Nr. S4651) aufgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

2.5.2. Immunhistochemische Färbungen

2.5.2.1. HIF-1 α

Für die immunhistochemische Anfärbung des HIF-1 α -Proteins wurde der von Dr. Stephen Fox (Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, John Ratcliffe Hospital, Oxford) zur Verfügung gestellte Primärantikörper ESEE 122 und das EnVision[®] System (DAKO Corporation, USA) verwendet.

Nach der Inkubation des Primärantikörpers werden bei diesem System Sekundärantikörper eingesetzt, die an ein Polymer gekoppelt sind (s. Abb. 2.1). An dieses Polymer sind wiederum Enzyme (Peroxidase) gebunden, die nach Zugabe des Farbstoffes Diaminobenzidin (DAB) durch enzymatische Spaltung zu einem braunen Niederschlag im Bereich des Enzymkomplexes führen. Dieser braune Niederschlag ist lichtmikroskopisch sichtbar. Anschließend wird das Gewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Als Positivkontrolle diente ein Mammakarzinom mit bekannter HIF-1 α -Expression, das uns aus Oxford zur Verfügung gestellt wurde.

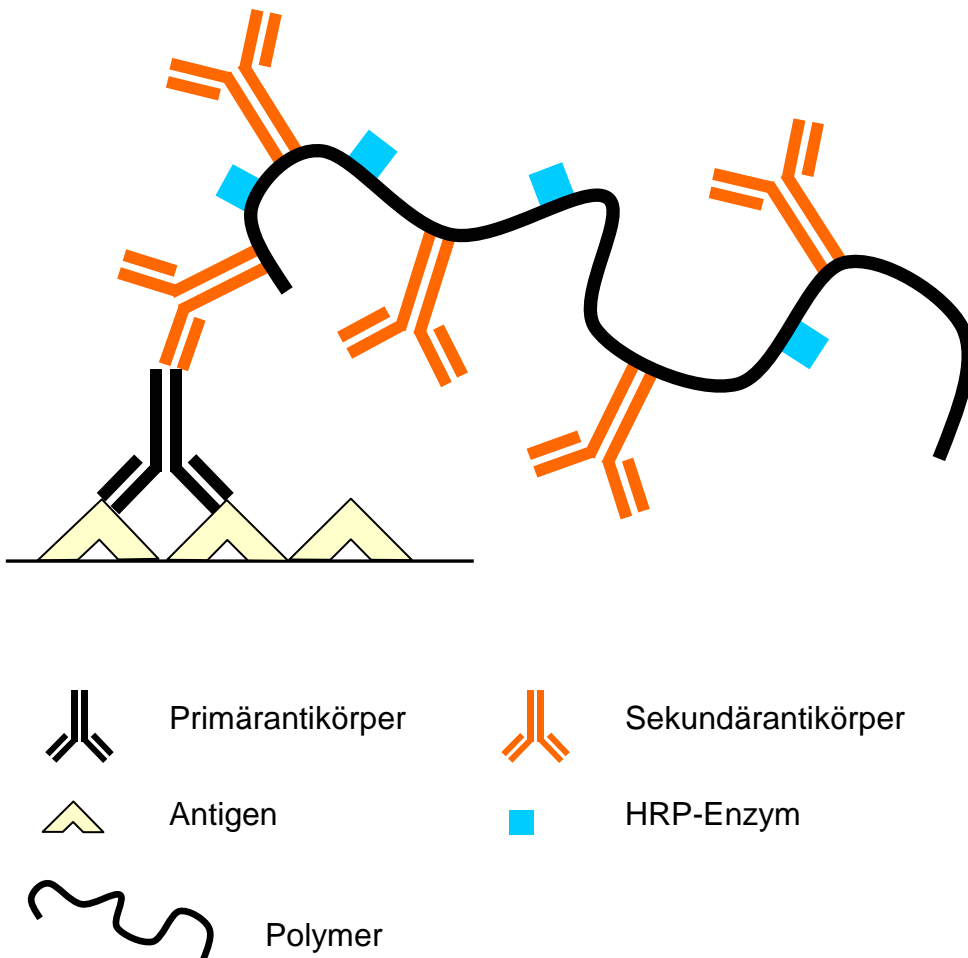


Abbildung 2.1: Prinzip der EnVision®-Methode

Färbeprotokoll für HIF-1 α :

- Entparaffinierung in Xylol (2 mal 10 min)
- absteigende Alkoholreihe (100-, 96- und 70%iges Ethanol, jeweils 5 min)
- waschen in Aqua dest.
- Antigendemaskierung in Bull's Eye Puffer (Biocare Medical, USA), 3 min bei 120°C im Dampftopf (Decloaking Chamber Pro der Firma Biocarta, Deutschland)
- 15 min abkühlen und waschen in TRIS-Puffer
- pro Schnitt Inkubation mit 20 bis 100 μ l ESEE 122 (je nach Schnittgröße) in der Verdünnung 1:30 für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- waschen in TRIS-Puffer

- Inkubation mit dem Sekundärantikörper (DakoCytomation EnVision[®]+ Dual Link System, Peroxidase, Best.Nr. K4063) für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 2 mal waschen in TRIS-Puffer
- Inkubation mit DAB für 10 min bei Raumtemperatur
- spülen mit Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Harris Hämatoxylin
- aufsteigende Alkoholreihe (70-, 80-, 96- und 100%iges Ethanol)
- Xylolbad
- Eindecken mit Pertex[®] (Fa. Medite, Deutschland, Best.Nr. 41-4010-00)

2.5.2.2. Immunhistochemie der übrigen Parameter

Die übrigen Parameter (CA IX, HIF-2 α , ER, PgR, p53, bcl-2, Ki-67 und c-erbB-2) wurden mit der Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) nachgewiesen. Sie beruht auf der hohen Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin.

An den Primärantikörper bindet ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper. Anschließend wird ein Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex auf den Schnitt gegeben, der wiederum an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet (s. Abb. 2.2). Die bräunliche Färbung entsteht wie bei dem EnVision[®]-System durch Zugabe von DAB, das durch die Peroxidase gespalten wird.

Alle Färbungen nach der ABC-Methode wurden mit Hilfe eines Pippetiergerätes (Genesis RSP 100 der Fa. Tecan Deutschland GmbH) und des Vectastain[®] Universal Elite[®] ABC-Kits (Vector Laboratories, USA) durchgeführt. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

Als Positivkontrolle für CA IX dienten HeLa-Zellen (Ivanov et al., 2000).

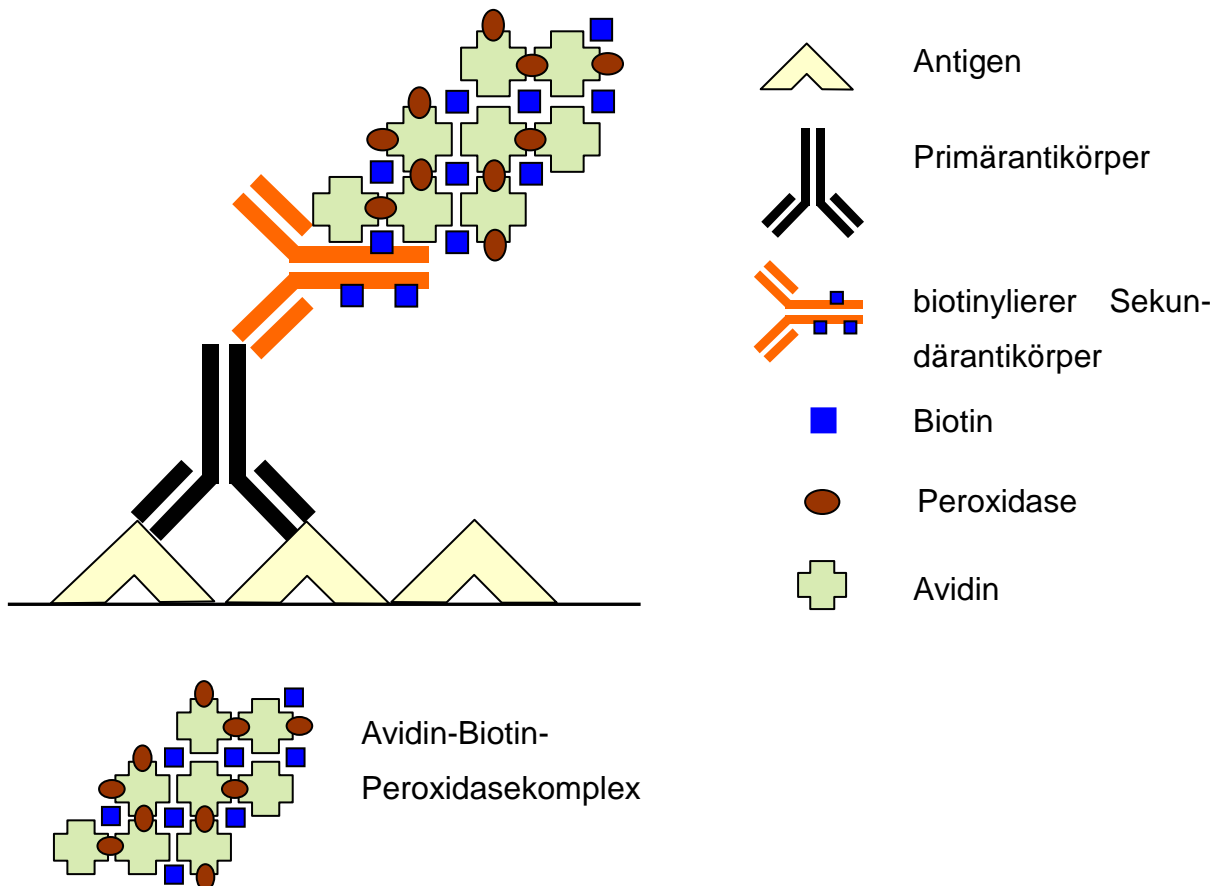


Abbildung 2.2: Prinzip der Avidin-Biotin-Methode

Färbeprotokoll für ER, PgR, p53, bcl-2, Ki-67, c-erbB-2, HIF-2 α und CA IX:

- Entparaffinierung in Xylol (5 mal 5 min)
- absteigende Alkoholreihe (je 2 mal spülen in 100-, 96- und 70%igem Ethanol)
- waschen in Aqua dest.
- Antigendemaskierung in Citratpuffer, 3 min im Dampftopf
- 15 min abkühlen lassen
- waschen in TRIS
- Genesis RSP 100 (Tecan):
 - o spülen mit TRIS (5 min)
 - o Normalserum aus dem ABC-Kit (10 min)
 - o Primärantikörper (Verdünnungen s. Tab. 2.2) für 1 h
 - o spülen mit TRIS (5 min)
 - o Sekundärantikörper aus dem ABC-Kit (15 min)

- spülen mit TRIS (5 min)
- Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex für 15 min, hergestellt aus den Reagenzien A und B aus dem ABC-Kit mindestens 30 min vor Gebrauch
- spülen mit TRIS (5 min)
- DAB (6 min)
- spülen mit TRIS (5 min)
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (1-3 min)
- aufsteigende Alkoholreihe (70-, 80-, 96- und 100%iges Ethanol)
- Xyololbad
- Eindecken mit Pertex[®]

Primärer Antikörper	Spezifität	Isotyp	Verdünnung (in TRIS)	Quelle	Literatur
NCL-ER-6F11	ER	Maus-IgG1	1:100	Novocastra	Bevitt et al., 1997
NCL-PGR-312	PgR	Maus-IgG1	1:300	Novocastra	Bevitt et al., 1997
NCL-p53-DO7	p53	Maus-IgG2b	1:75	Novocastra	Horne et al., 1996
M 0887	bcl-2	Maus-IgG1	1:200	DAKO	Bottini et al., 2000
M 7240	Ki-67	Maus-IgG	1:200	DAKO	Cattoretti et al., 1992
A 0485	c-erbB-2	Kaninchen polyklonal	1:1000	DAKO	Koeppen et al., 2001
ESEE 122	HIF-1 α	Maus-IgG1	1:30	Oxford	Talks et al., 2000
EP 190b	HIF-2 α	Maus-IgG1	unverdünnt	Oxford	Talks et al., 2000
M75	CA IX	Maus	1:200	Oxford	Liao et al., 1994

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Antikörper

2.5.3. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Bei den Färbungen der Faktoren HIF-1 α , HIF-2 α und CA IX wurde der Prozentsatz positiver Zellen abgeschätzt und die Färbeintensität bewertet. Die Färbeintensität wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

- 0 keine Färbung
- 1 schwache Färbeintensität
- 2 mäßige Färbeintensität
- 3 starke Färbeintensität

Aus dem Produkt des Prozentsatzes positiver Zellen und der Färbeintensität wurde ein Score gebildet, der theoretisch die Werte 0 bis 300 annehmen kann (Chia et al., 2001).

Es wurden jeweils die Tumorzellen als positiv gewertet, die für HIF-1 α und HIF-2 α eine nukleäre und/oder cytoplasmatische und für CA IX eine membranständige Färbung aufwiesen (Zhong et al., 1999, Bartošová et al., 2002). Bei den HIF-2 α -Färbungen wurde außerdem festgehalten, ob eine Anfärbung des Stromas vorlag, was als Makrophagenfärbung gewertet wurde (Talks et al., 2000, Leek et al., 2002).

Die Hormonrezeptoren ER und PgR, das Tumorsuppressorgen p53, das Protoonkogen bcl-2, der Tumorzellproliferationsmarker Mib-1 und das Onkoprotein c-erbB-2 wurden bereits in der Routine bestimmt und die Angaben aus den pathologischen Befunden übernommen.

Für die Faktoren p53, bcl-2 und Mib-1 erfolgte die Auswertung allein als Angabe des Prozentsatzes positiver Tumorzellen, für die Faktoren ER, PgR und c-erbB-2 wurde ein Score berechnet.

Für die Hormonrezeptoren ER und PgR hat sich der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele durchgesetzt, bei dem sowohl der Prozentsatz positiver Zellen als auch die Färbeintensität mit eingeht (Remmele und Stegner, 1987, siehe Anhang). Man spricht immer dann von einem positiven Hormonrezeptorstatus, wenn mindestens einer der beiden Rezeptoren einen IRS ≥ 3 aufweist.

Die Expression des Onkoproteins c-erbB-2 wurde gemäß des Dako Hercep-Test-Scores bewertet. Hierbei werden der Anteil der c-erbB-2 exprimierenden Zellen in Prozent abgeschätzt und die Vollständigkeit und Intensität der Membranfärbung bewertet (siehe Anhang).

Für die Bewertung der Faktoren gelten die Cut-off-Werte aus Tabelle 2.3 (Colleoni et al., 1999, Brifford et al., 2000, Faneyete et al., 2003),

	ER	PgR	p53	bcl-2	Mib-1	c-erbB-2	CAIX	HIF-1	HIF-2
positiv	≥ 3	≥ 3	>10%	>10%	>20%	3+	≥ 1	≥ 1	≥ 1
negativ	< 3	< 3	≤10%	≤10%	≤20%	< 3+	0	0	0

Tabelle 2.3: Cut-off-Werte für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

2.6. Ansprechen auf die primär systemische Therapie

Aus den Sonographiebefunden wurde der primäre Tumordurchmesser (prätherapeutisch) übernommen und mit der posttherapeutischen Größenangabe aus den histopathologischen Befunden verglichen.

Je nach Größenänderung wurde das Ansprechen in verschiedene Response-Gruppen eingeteilt (Tab. 2.4, modifiziert nach Kuerer et al., 2000).

Ansprechen	Abkürzung	Definition
Progressive disease	PD	Größenzunahme des Tumors um ≥10%
No change	NC	Änderung der Tumorgöße um ≤10%
Minor response	MR	Verringerung der Tumorgöße um >10%, aber nicht um mehr als 50%
Partial response	PR	Verringerung der Tumorgöße um >50%
Carcinoma in situ	T _{is}	lediglich Nachweis eines In-Situ-Karzinoms im Operationspräparat
Complete remission	pCR	kein Nachweis eines invasiven Tumors oder eines In-Situ-Karzinoms im Operationspräparat

Tabelle 2.4: Einteilung des Therapieansprechens

2.7. Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Programm JMP 5.0 der Firma SAS. Zum Einsatz kamen der Fishers Exakte Test und der Rangsummentest nach Wilcoxon.

2.8. Fotoaufnahmen

Die in dieser Arbeit aufgeführten Fotografien von histologischen Schnitten wurden an einem Zeiss Axioplan Mikroskop mit der Digitalkamera Cyber-Shot mit 4,1 Megapixels der Firma Sony (Modell-Nr. DSC-S85) aufgenommen. Die Bildbearbeitung erfolgt mit dem Programm Corel Photo-Paint 8.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv und Tumorcharakteristika

3.1.1. Altersverteilung im Patientenkollektiv

Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose eines Mammakarzinoms lag bei 56,3 Jahren, der Median bei 57,0 Jahren. Dabei war die jüngste Patientin 27 Jahre alt, die älteste 84. Aus Abb. 3.1 ist ersichtlich, dass das Erkrankungsmaximum in der 7. Lebensdekade lag.

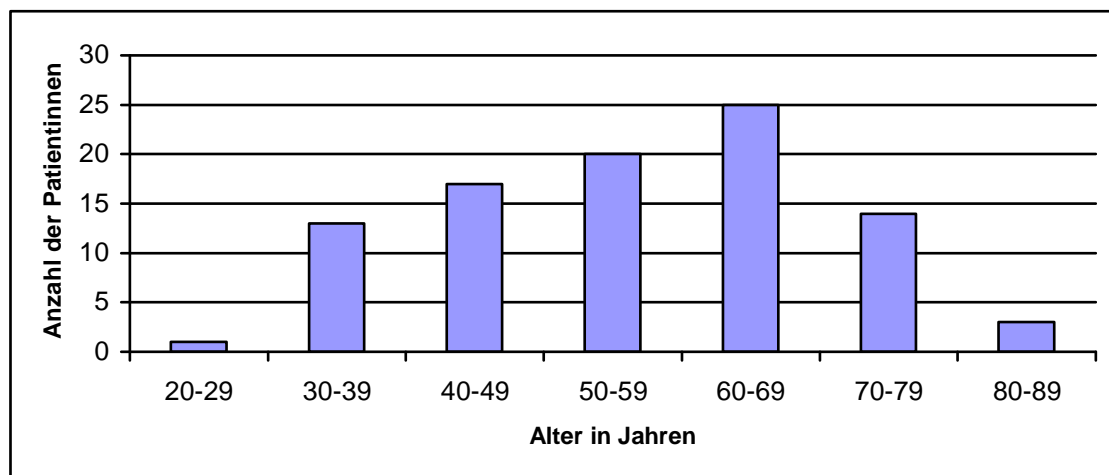


Abbildung 3.1: Altersverteilung im Patientenkollektiv

3.1.2. Tumorgröße und Lymphknotenstatus

Von allen Patientinnen wurde die Tumorgröße vor und nach der primär systemischen Therapie erhoben. Der axilläre Lymphknotenstatus wurde vor der Therapie klinisch mittels hochauflösender Sonographie (15MHz-Schallkopf) und posttherapeutisch anhand von mindestens zehn pathologisch untersuchten Lymphknoten bestimmt. Die Tabellen 3.1 und 3.2 zeigen die Verteilung der genannten Parameter.

T-Stadium/N-Stadium	Anzahl (n=93)	rel. Häufigkeit (%)
T2	54	58,1
T3	10	10,7
T4	29	31,2
N0	30	32,3
N1	57	61,3
N2	5	5,4
Nx	1	1,1

Tabelle 3.1: T/N-Stadium vor der primär systemischen Therapie

Da in den von der Universitätsfrauenklinik Tübingen verwendeten Protokollen eine primär systemische Therapie erst ab einer Tumorgröße von mindestens 2,0 cm oder einem inflammatorischen Mammakarzinom in Frage kommt, finden sich in unserem Kollektiv prätherapeutisch keine Tumoren im T-Stadium T1. Posttherapeutisch hingegen konnte in 28 Fällen (30,1%) das Stadium ypT1 diagnostiziert werden.

Stadium	Anzahl (n=93)	relative Häufigkeit (%)
ypT ₀	5	5,4
ypT _{is}	5	5,4
ypT ₁	28	30,1
ypT _{1a}	7	7,5
ypT _{1b}	8	8,6
ypT _{1c}	13	14,0
ypT ₂	32	34,4
ypT ₃	8	8,6
ypT ₄	11	11,8

keine OP	3	3,2
Unbekannt	1	1,1
ypN ₀	38	40,9
ypN ₁	49	51,6
ypN _{1a}	5	5,4
ypN _{1bi}	11	11,8
ypN _{1bii}	9	9,7
ypN _{1biii}	16	17,2
ypN _{1biv}	8	8,6
ypN ₂	2	2,2
ypN ₃	0	0,0
keine OP	3	3,2
Unbekannt	1	1,1

Tabelle 3.2: T- und N-Stadium nach der primär systemischen Therapie

3.1.3. Tumorhistologie und Grading

Die überwiegende Anzahl der OP-Präparate, nämlich 62,2%, zeigten invasiv duktales Mammakarzinome. Diese sind zu 66,7% (n=34) mäßig und zu 31,4 % (n=16) schlecht differenziert. Nur ein invasiv duktales Karzinom war gut differenziert. Die beiden medullären Karzinome zeigten eine schlechte Differenzierung.

Drei Patientinnen wurden nach der primär systemischen Therapie nicht operiert und es konnte dem entsprechend posttherapeutisch kein Grading und keine Histologie bestimmt werden. Ebenso wenig wurde das Grading in den 10 Fällen mit pathologischen Komplettremissionen (n=5) beziehungsweise In-situ-Karzinomen (n=5) bestimmt.

Histologie	Anzahl (n=90)	rel. Häufigkeit (%)
duktales Carcinoma in situ	4	4,4
lobuläres Carcinoma in situ	1	1,1
invasiv duktales Karzinom	56	62,2
invasiv lobuläres Karzinom	16	17,8
invasiv tubuläres Karzinom	3	3,3
invasiv medulläres Karzinom	2	2,2
invasiv papilläres Karzinom	1	1,1
pathologische Komplettremission	5	5,6
fehlende Angaben	2	2,2

Tabelle 3.3: Histologie des Tumors (OP-Präparat)

Grading	Stanze		OP-Präparat	
	Anzahl (n=93)	rel. Häufigkeit (%)	Anzahl (n=80)	rel. Häufigkeit (%)
G1	1	1,1	2	2,5
G2	64	68,8	47	58,8
G3	20	21,5	24	30,0
unbekannt	8	8,6	7	8,8

Tabelle 3.4: Histopathologisches Grading

3.1.4. Prognosefaktoren

Die Tabelle 3.5 zeigt die Verteilung der Prognosefaktoren in Stanze und OP-Präparat. In den 10 Fällen mit pathologischen Komplettremissionen (n=5) beziehungsweise In-situ-Karzinomen (n=5) wurden keine Prognosefaktoren bestimmt.

	Stanze		OP-Präparat	
	Anzahl (n=93)	rel. Häufigkeit (%)	Anzahl (n=80)	rel. Häufigkeit (%)
ER positiv	69	74,2	55	68,8
ER negativ	24	25,8	18	22,5
ER unbekannt	0	0,0	7	8,8
PgR positiv	41	44,1	25	31,3
PgR negativ	52	55,9	47	58,8
PgR unbekannt	0	0,0	8	10,0
p53 positiv	35	37,6	17	21,3
p53 negativ	58	62,4	54	67,5
p53 unbekannt	0	0,0	9	11,3
bcl-2 positiv	67	74,2	52	65,0
bcl-2 negativ	26	28,0	19	23,8
bcl-2 unbekannt	0	0,0	9	11,3
Mib-1 positiv	57	61,3	17	21,3
Mib-1 negativ	36	38,7	55	68,8
Mib-1 unbekannt	0	0,0	8	10,0
c-erbB-2 positiv	22	23,7	14	17,5
c-erbB-2 negativ	70	75,3	58	72,5
c-erbB-2 unbekannt	1	1,1	8	10,0

Tabelle 3.5: Prognosefaktoren in Stanzen und OP-Präparaten

3.2. Therapie

3.2.1. Primär systemische Therapieschemata

Abbildung 3.2 zeigt die Verteilung des Kollektivs auf die verschiedenen primär systemischen Therapieschemata. 33,3% (n=31) der Patientinnen wurden im Rahmen einer Hormontherapie mit Letrozol oder Exemestan behandelt. Die restlichen 62 Patientinnen (66,7%) unterzogen sich einer Chemotherapie.

Im Anschluss an die primär systemische Therapie wurden 90 der 93 Patientinnen operiert (96,8%). Die drei nicht operierten Frauen stammen aus der Hormontherapiegruppe.

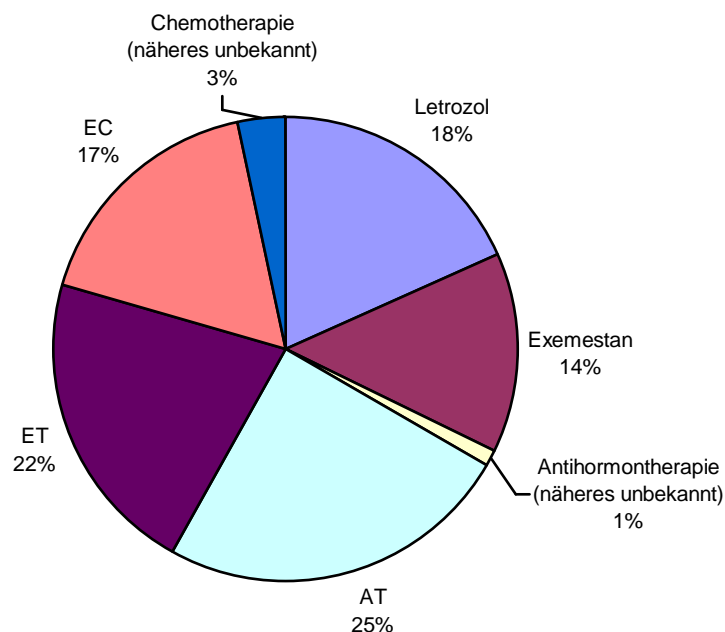


Abbildung 3.2: Verteilung der Therapieschemata

3.2.2. Ansprechen auf die primär systemische Therapie

Bei 10 Patientinnen konnte im Operationspräparat kein invasiver Tumor mehr nachgewiesen werden. Allerdings wiesen von diesen Patientinnen noch fünf ein in-situ-Karzinom auf, von denen wiederum drei einen positiven Lymphknotenstatus hatten (Abb. 3.3). 31,2% der Patientinnen zeigten kein Ansprechen auf die primär systemische Therapie (no change oder progressive disease).

Die Gruppe der Patientinnen, die präoperativ eine Chemotherapie erhielten, zeigte insgesamt ein besseres Ansprechen auf die Therapie als diejenigen, die hormonwirksam therapiert worden waren. Alle Fälle, die eine pathologische Komplettremission oder lediglich ein In-situ-Karzinom zeigten, sind zuvor mit einer Chemotherapie behandelt worden. Auch partielle Remissionen waren in dieser Gruppe häufiger (29% vs. 12,9%). Fasst man diejenigen zusammen, bei denen irgendein Ansprechen auf die Therapie zu verzeichnen war (minor response oder besser), dann liegt erneut die Gruppe der Chemotherapie mit 66,1% vor der Hormontherapiegruppe mit 45,2% (siehe auch Tabelle 3.6 und Abbildung 3.3).

	Chemotherapie		Hormontherapie	
	absolut	relativ (%)	absolut	relativ (%)
pCR	5	8,1	0	0
Tis	5	8,1	0	0
PR	18	29,0	4	12,9
MR	13	20,1	10	32,3
NC	9	14,5	5	16,1
PD	6	9,7	9	29,0
keine OP	0	0	3	9,7
keine Angabe	6	9,7	0	0

Tabelle 3.6: Ansprechen auf die primär systemische Therapie

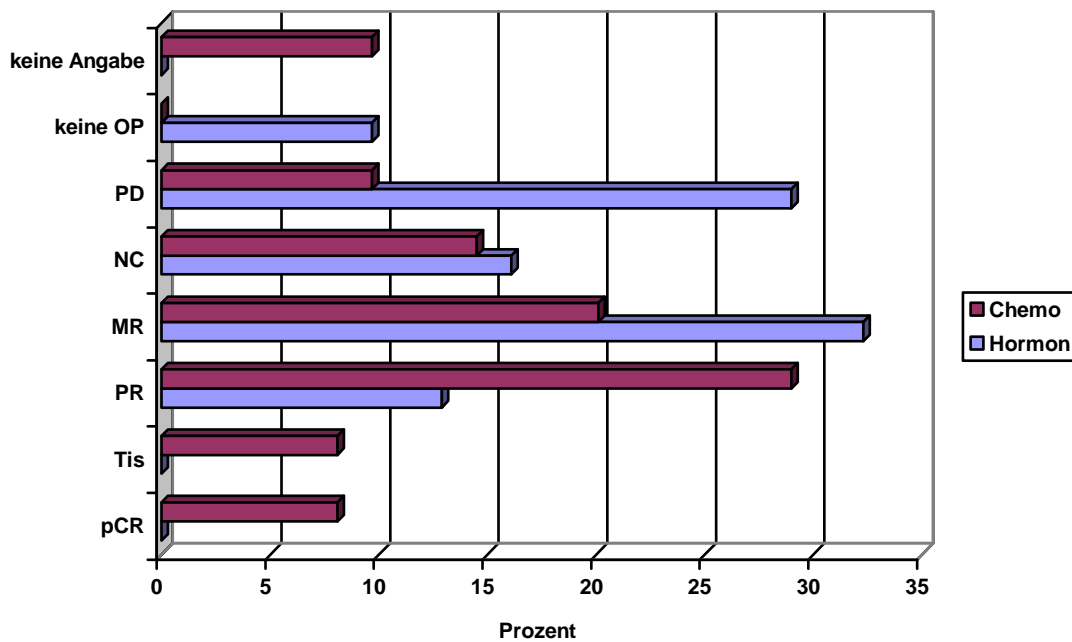


Abbildung 3.3: Ansprechen auf die primär systemische Therapie

3.3. CA IX-Expression

Die immunhistochemische Bestimmung des CA IX-Proteins konnte an 86 der 93 Stanzpräparate und an 73 der 80 OP-Präparate erfolgen. Grund für die fehlenden Werte waren fehlende Blöcke und wiederholt abschwimmende Schnitte. In den Fällen, in denen am OP-Präparat kein invasiver Tumor mehr nachgewiesen werden konnte, erfolgte keine CA IX-Färbung.

Die Tabelle 3.7 zeigt eine Aufstellung der 17 Patientinnen mit positiver CA IX-Färbung.

Nummer	Alter	Therapie	Response	Präparat	Diagnose	CA IX (%)	CA IX (In-tensität)	CA IX (Score)
3	31	CHT	MR	Stanze	IMC	60	2	120
				OP	IMC	30	3	90
4	37	CHT	PR	Stanze	IDC	1	3	3
				OP	IDC	1	3	3
6	34	CHT	PD	Stanze	IDC	30	2	60
				OP	IDC	50	1	50
16	33	CHT	pCR	Stanze	ILC	5	2	10
				OP	pCR	-	-	-
24	69	HT	MR	Stanze	IPC	1	2	2
				OP	IPC	30	3	90
29	49	CHT	PR	Stanze	IDC	10	3	30
				OP	IDC	0	0	0
43	54	CHT	T _{is}	Stanze	IDC	5	1	5
				OP	DCIS	-	-	-
45	60	CHT	MR	Stanze	IDC	10	1	10
				OP	IDC	20	1	20
46	38	CHT	pCR	Stanze	IDC	5	1	5
				OP	pCR	-	-	-
48	68	HT	PR	Stanze	IDC	5	1	5
				OP	IDC	abgeschw.	-	-
54	42	CHT	MR	Stanze	IDC	60	3	180
				OP	IDC	40	2	80
68	51	CHT	PD	Stanze	IDC	5	2	10
				OP	IDC	0	0	0
70	46	CHT	NC	Stanze	IDC	20	2	40
				OP	IDC	0	0	0
72	62	CHT	PR	Stanze	IDC	5	2	10
				OP	IDC	1	2	2

Nummer	Alter	Therapie	Response	Präparat	Diagnose	CA IX (%)	CA IX (Intensität)	CA IX (Score)
83	36	CHT	pCR	Stanze	IDC	40	3	120
				OP	pCR	-	-	-
84	27	CHT	NC	Stanze	IDC	0	0	0
				OP	IDC	30	2	60
85	40	CHT	MR	Stanze	IDC	0	0	0
				OP	IDC	1	3	3

Tabelle 3.7: Patientinnen mit CA IX-Nachweis in Stanze und/oder OP-Präparat

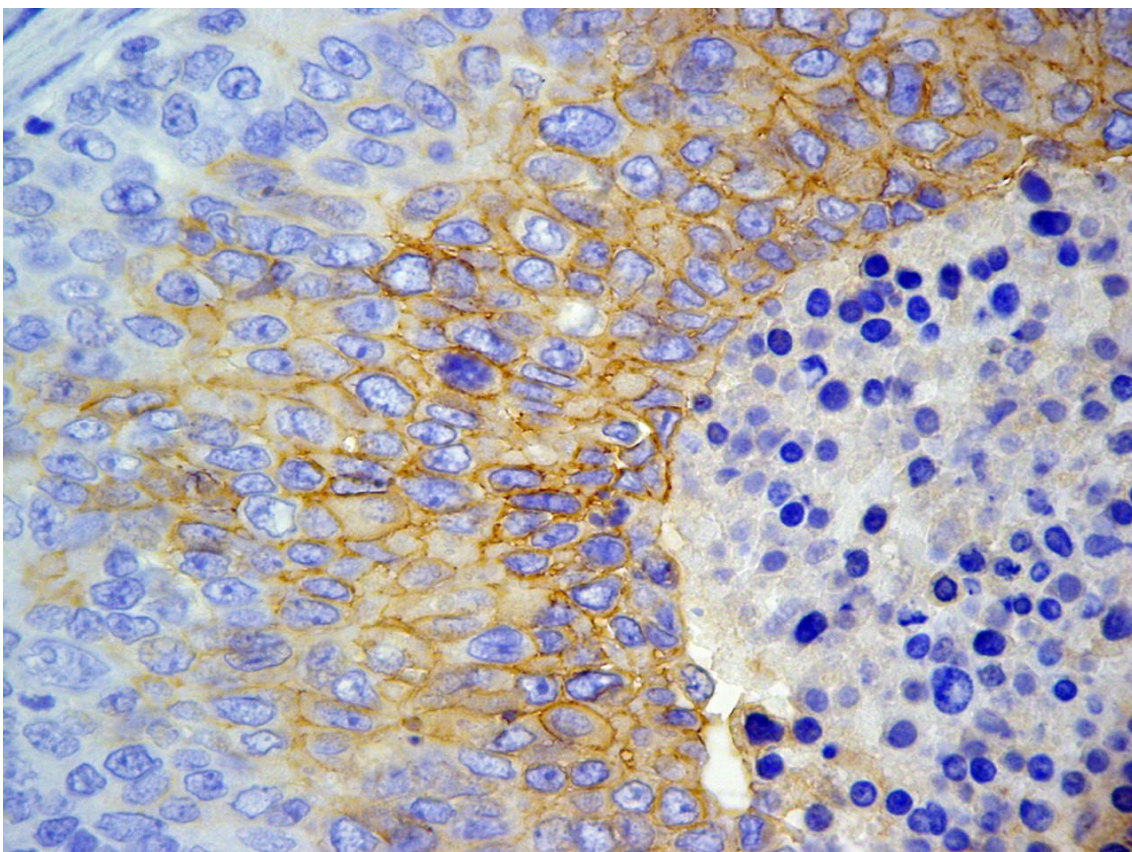


Abbildung 3.4: Invasiv duktales Mammakarzinom: Membranständige Färbung des CA IX-Proteins, mäßige Intensität.

Die 75. Perzentile liegt bei beiden Präparaten noch bei dem Wert 0, die 90. Perzentile der Stanze bei 33,7 und beim OP-Präparat bei 28,9. Der maximal erreichte Score in einer Stanze betrug 180, in einem OP-Präparat 90.

Der CA IX-Status blieb nach einer Chemotherapie in 89% der Fälle unverändert positiv oder negativ, in 7% war die Stanze CA IX-positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 4% war die Stanze negativ und das OP-Präparat CA IX-positiv. Nach einer Aromatasehemmertherapie war der CA IX-Status in 100% unverändert, nur eine der Patientinnen exprimierte überhaupt CA IX.

3.3.2. CA IX und Response

In der Abbildung 3.6 ist dargestellt, wie sich die CA IX-Expression der Stanzen in den verschiedenen Responsegruppen verteilt. Die Gesamtzahl von 77 Stanzen erklärt sich in 7 Fällen durch fehlende Blöcke, in 6 Fällen durch eine nicht exakt zu bestimmende Response.

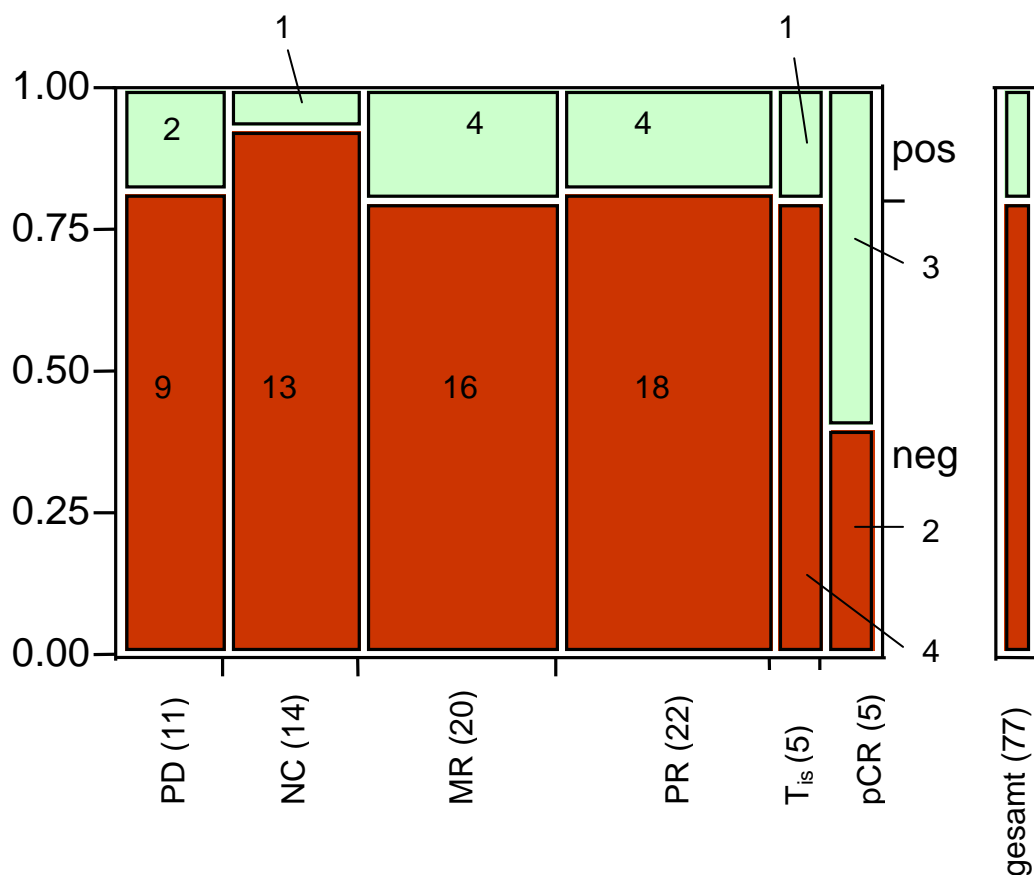


Abbildung 3.6: CA IX-positive Fälle in Abhängigkeit von der Response

Da in der NSABP B-18-Studie in der Gruppe der Patientinnen mit einer pathologischen Komplettremission ein signifikanter Vorteil bezüglich des rezidivfreien Überlebens festgestellt werden konnte (Fisher et al., 1998), wurden zwei Gruppen gebildet, zum einen die Gruppe pCR (n=5) und zum anderen die Gruppe non-pCR (n=81).

Die Gruppe non-pCR beinhaltet alle Patientinnen ohne pathologische Komplettremission nach primär systemsicher Therapie, also auch die drei mit Aromataseinhibitoren behandelten Frauen, die sich keiner Operation unterzogen haben und jene sechs Patientinnen, die nicht eindeutig einer der Response-Gruppen zugeordnet werden konnten. Dies ist gerechtfertigt, da bei allen nicht operierten Patientinnen auch noch nach mindestens achtmonatiger Nachbeobachtung ein sonographisches Korrelat nachzuweisen war und bei den übrigen sechs Patientinnen ein invasives Tumorwachstum unbekanntes Ausmaßes im Operationspräparat zu finden war.

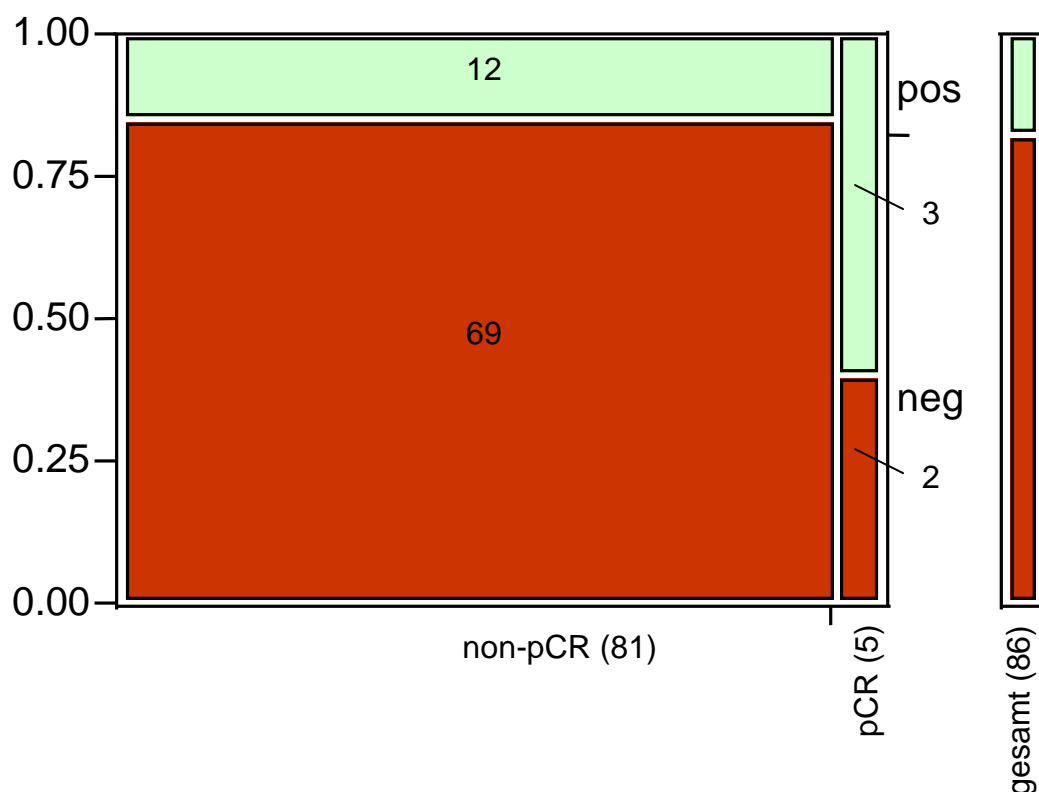


Abbildung 3.7: CA IX-Expression in den Gruppen non-pCR und pCR

Wenn die Gruppe non-pCR gegen die Gruppe pCR im Fishers Exakten Test getestet wird, ergibt sich ein p-Wert von 0,035. Dieser Wert kann aber nicht als signifikant bezeichnet werden, da die Irrtumswahrscheinlichkeit α aufgrund des multiplen Testens korrigiert werden muss (Bonferroni).

3.4. HIF-1 α Expression

Für die immunhistochemische Bestimmung des HIF-1 α -Proteins wurden aus dem Gesamtkollektiv 60 Patientinnen ausgewählt: 30 Patientinnen aus der Hormontherapiegruppe und 30 Patientinnen aus der Chemotherapiegruppe, darunter alle Patientinnen mit einer positiven CA IX-Färbung. Drei Patientinnen der Hormontherapiegruppe wurden nicht operiert.

Eine Bestimmung der HIF-1 α -Expression war an 54 der 60 Stanzpräparate und an 50 der 57 OP-Präparate möglich. Grund für die fehlenden Werte waren erneut fehlende Blöcke und wiederholt abschwimmende Schnitte. In den Fällen, in denen am OP-Präparat kein invasiver Tumor mehr nachgewiesen werden konnte, erfolgte keine HIF-1 α -Färbung.

HIF-1 α konnte in 10 von 54 Stanzpräparaten (18,5%) und in 36 von 50 OP-Präparaten (72%) nachgewiesen werden.

Die HIF-1 α -Expression war bei 7 Patientinnen in beiden Präparaten positiv. Bei 2 Patientinnen zeigte allein die Stanze und bei 24 Patientinnen nur das OP-Präparat eine HIF-1 α -Expression. Bei einer Patientin mit HIF-1 α -Expression in der Stanze konnte im OP-Präparat nur noch ein In-situ-Karzinom diagnostiziert werden. Für 5 Patientinnen, die im OP-Präparat eine HIF-1 α -Expression zeigten, waren keine Paraffinblöcke mit Stanzbiopsien verfügbar.

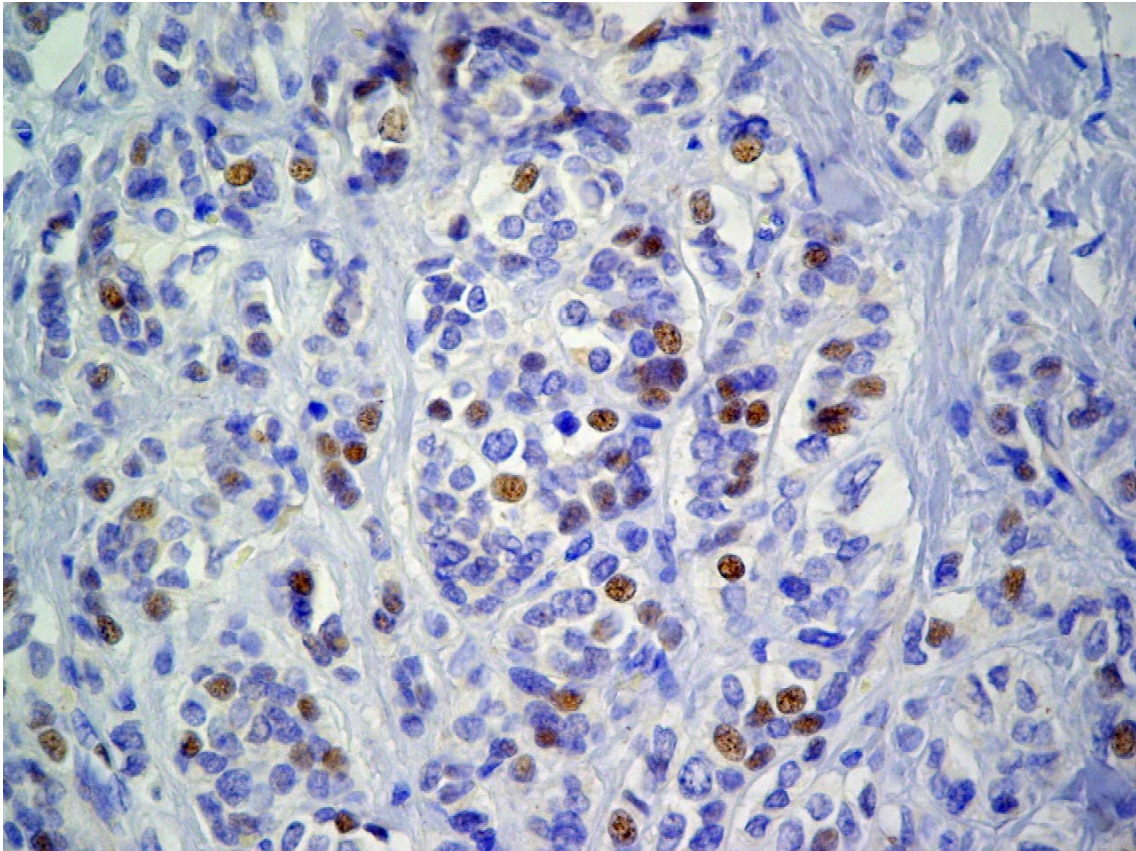


Abbildung 3.8: Invasiv lobuläres Mammakarzinom, nukleäre Färbung des HIF-1 α -Proteins, mäßige Intensität.

3.4.1. Veränderung der HIF-1 α Expression

Für HIF-1 α ist besonders auffällig, dass wesentlich mehr Operationspräparate eine Expression des Proteins zeigen als es in den Stanzten der Fall ist. Dies wird auch in Abbildung 3.9 deutlich. Auch hier wurde wieder die logarithmische Darstellung gewählt, um den unteren Scorebereich besser darstellen zu können (siehe Kapitel 3.3.1) und es sind wiederum nur jene Fälle dargestellt, in denen die Angaben sowohl für die Stanze als auch das OP-Präparat vorhanden waren (n=45).

Der HIF-1 α -Status blieb nach einer Chemotherapie in 44% unverändert positiv oder negativ, in 4% war die Stanze HIF-1 α -positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 52% war die Stanze negativ und das OP-Präparat HIF-1 α -positiv.

Nach einer Aromatasehemmertherapie war der HIF-1 α -Status in 40% unverändert, in 5% prätherapeutisch positiv und posttherapeutisch negativ und in 55% veränderte sich der Status von negativ nach positiv.

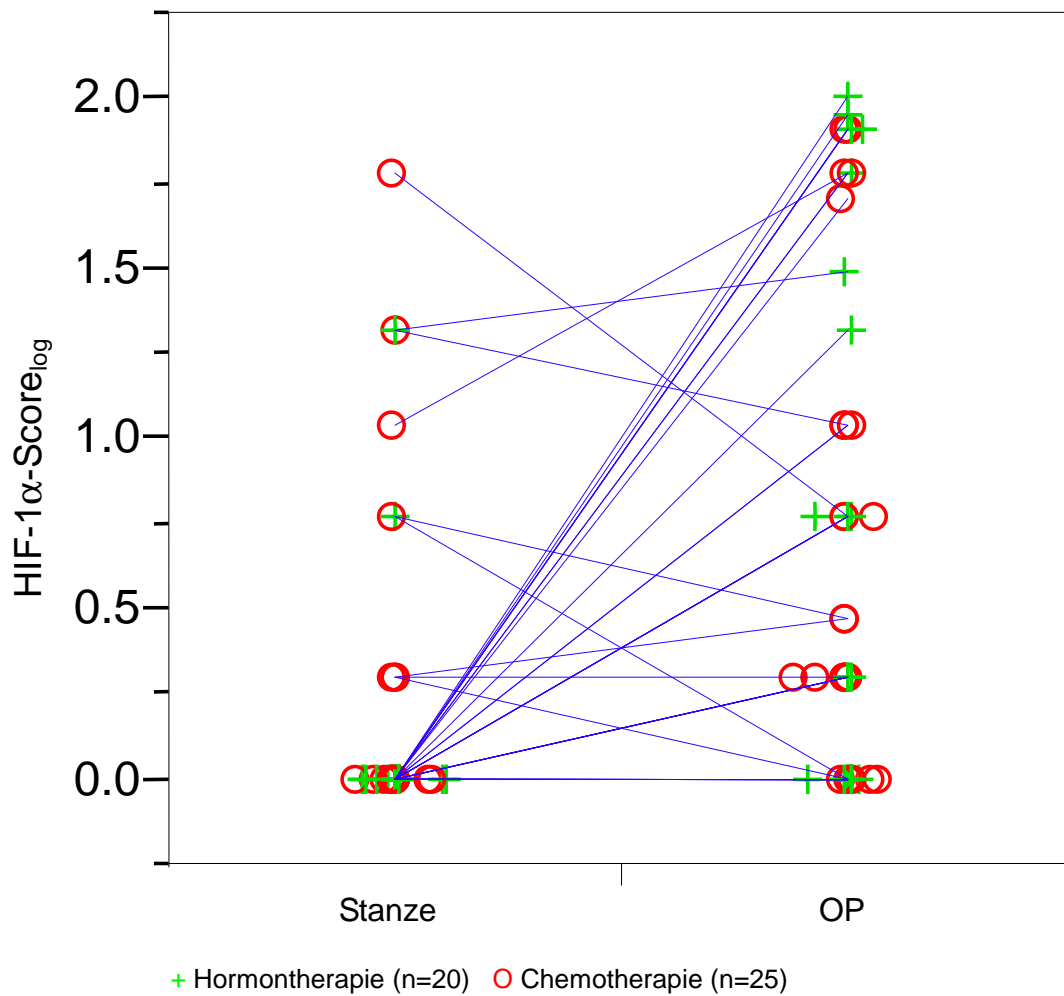


Abbildung 3.9: Quantitative Änderung des HIF-1 α -Scores vor und nach der primär systemischen Therapie

3.4.2. HIF-1 α und Response

Analog zu Kapitel 3.3.2 erfolgt hier die Auswertung des HIF-1 α in Abhängigkeit zur Response nach primär systemischer Therapie. In der Gruppe der pathologischen Komplettremissionen (n=3) zeigt keine der präoperativ entnommenen Biopsien eine HIF-1 α -Expression, während der Anteil HIF-1 α -positiver Stanzungen in der Gruppe non-pCR (n=51) 19,6% beträgt. Dies deutet darauf hin, dass HIF-1 α -negative Karzinome besser auf eine primär systemische Therapie ansprechen als jene, die HIF-1 α exprimieren. Da aber nur 18,5% der Stanzbiopsien überhaupt HIF-1 α exprimieren und die Gruppe der pathologischen Komplettremissionen mit nur drei Patientinnen sehr klein ist, kann daraus nicht auf ein verbessertes Ansprechen auf eine primär systemische Therapie der HIF-1 α -negativen Karzinome geschlossen werden.

Stellt man deshalb die Fälle mit einer guten Response (pCR, T_{is}, PR, n=14) denjenigen mit einer mäßigen oder gar keinen Response (MR, NC, PD, n=36) gegenüber, so beträgt der Anteil HIF-1 α -positiver Stanzungen 21,4% beziehungsweise 19,4%, was die oben genannte Vermutung nicht bestätigt.

3.5. HIF-2 α Expression

Für die immunhistochemische Bestimmung des HIF-2 α -Proteins wurde das gleiche Kollektiv aus 60 Patientinnen wie bei der Bestimmung von HIF-1 α untersucht.

Eine Bestimmung der HIF-2 α -Expression war an 54 der 60 Stanzpräparate und an 50 der 60 OP-Präparate möglich. Zu den Gründen der fehlenden Werte siehe Kapitel 3.4. In OP-Präparaten ohne invasive Tumorkomponente erfolgte keine HIF-2 α -Bestimmung.

Von den 54 Stanzungen konnte in 18 Präparaten eine HIF-2 α -Expression in den Tumorzellen nachgewiesen werden (33,3%), von den 50 OP-Präparaten waren 23 Präparate (46,0%) HIF-2 α -positiv.

Bei 10 Patientinnen waren beide Präparate positiv, bei 5 Patientinnen zeigte allein die Stanze und bei 12 Patientinnen nur das OP-Präparat eine HIF-2 α -Expression. Eine Patientin mit HIF-2 α -positiver Stanze hatte eine pathologische Komplettremission und bei einer weiteren wurde lediglich ein In-situ-Karzinom im OP-Präparat diagnostiziert.

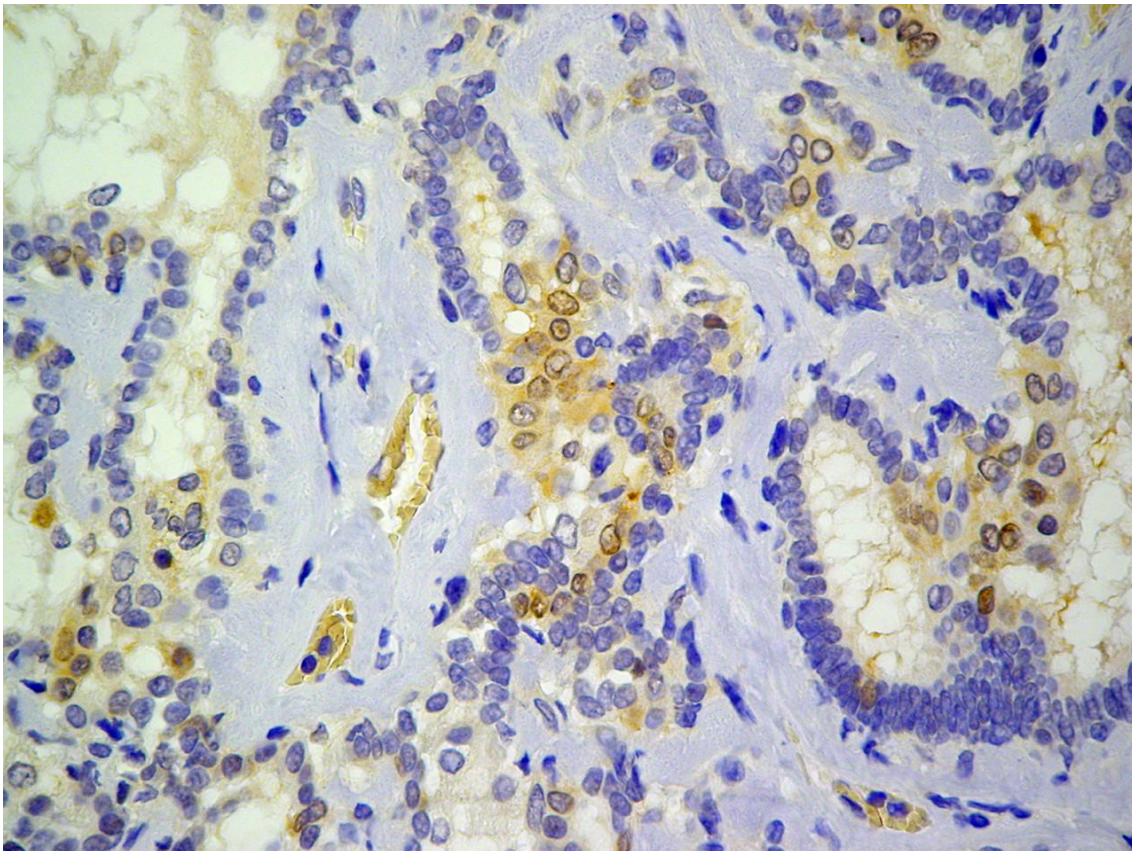


Abbildung 3.10: Invasiv papilläres Mammakarzinom, nukleäre und cytoplasmatische Färbung des HIF-2 α -Proteins, schwache Intensität.

3.5.1. Veränderung der HIF-2 α -Expression in Tumorzellen

Auch für HIF-2 α gilt, dass mehr OP-Präparate eine Expression des Proteins in den Tumorzellen zeigten als die Stanzen. Allerdings ist dieser Unterschied nicht so deutlich wie bei HIF-1 α .

Abbildung 3.11 zeigt die Veränderung des HIF-2 α -Scores in logarithmischer Darstellung (siehe Kapitel 3.3.1) (n=45).

3.5.2. HIF-2 α und Response

Sowohl in der Gruppe der pathologischen Komplettremissionen (n=3), als auch in der Gruppe non-pCR (n=51) beträgt der Anteil HIF-2 α -exprimierender Stanz 33,3%. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist also nicht feststellbar. Vergleicht man hingegen wieder die Gruppe der guten Response (n=14) mit derjenigen der mäßigen oder keinen Response (n=36) so ist der Anteil HIF-2 α -positiven Stanz in der Gruppe mit der guten Response mit 21,4% geringer als in der Gruppe mit einem schlechteren Ansprechen, die in 38,9% HIF-2 α in den präoperativen Biopsien exprimiert. Ein signifikanter Unterschied ist allerdings nicht feststellbar (p=0,33).

3.5.3. HIF-2 α -Expression in Makrophagen

In den Stanz zeigte sich in 18 von 54 Präparaten eine HIF-2 α -Expression der Makrophagen (33,3%), in den OP-Präparaten waren in 35 von 50 Präparaten HIF-2 α -positive Makrophagen zu finden (70,0%).

Dabei war die HIF-2 α -Expression in den Tumorzellen nicht automatisch mit einer HIF-2 α -Expression in den Makrophagen verbunden. Nur in 7 Stanz (13,0%) beziehungsweise 19 OP-Präparaten (38,0%) zeigte sich eine Expression in Tumorzellen und Makrophagen. In 11 Stanz (20,4%) beziehungsweise 4 OP-Präparaten (8,0%) waren nur die Tumorzellen und in 11 Stanz (20,4%) beziehungsweise 16 OP-Präparaten (32,0%) nur die Makrophagen HIF-2 α -positiv. 25 Stanzpräparate (46,3%) und 11 OP-Präparate (22,0%) zeigten weder in den Tumorzellen noch in den Makrophagen eine HIF-2 α -Expression.

Von den Fällen, in denen die HIF-2 α -Färbung sowohl in den Stanz als auch in den OP-Präparaten möglich war, zeigten 60% der Fälle vor und nach primär systemischer Chemotherapie eine unverändert positive oder negative Makrophagenfärbung. In 4% konnte nur in der Stanze und in 36% nur im OP-Präparat eine entsprechende Stromafärbung verzeichnet werden. Unter einer primär systemischen Therapie mit Aromatasehemmern zeigten 55% in beiden Präparaten eine unverändert positive oder negative Färbung der Makrophagen und in den übrigen 45% war die Färbung von HIF-2 α nur im OP-Präparat nachweisbar.

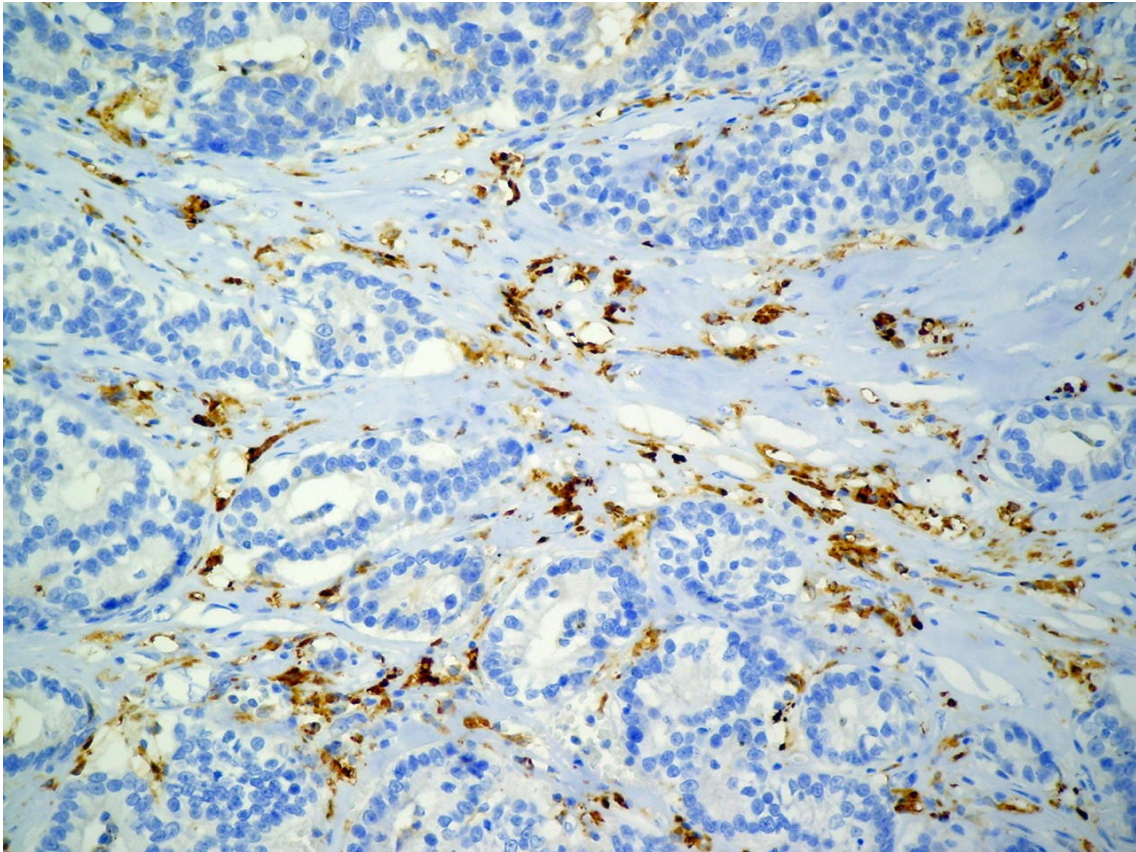


Abbildung 3.12: Invasiv duktales Mammakarzinom, Färbung des HIF-2 α -Proteins in Makrophagen

3.6. Expression der übrigen Faktoren

Die Angaben über die übrigen immunhistochemisch bestimmten Parameter wurden aus den pathologischen Befunden entnommen.

In die folgende Auswertung gehen nur jene Patientinnen mit ein, für die die Angaben sowohl für das Stanz- als auch für das OP-Präparat vorlagen ($n_{ER}=72$, $n_{PgR}=71$, $n_{p53}=71$, $n_{bcl-2}=71$, $n_{Mib-1}=72$, $n_{c-erbB-2}=70$).

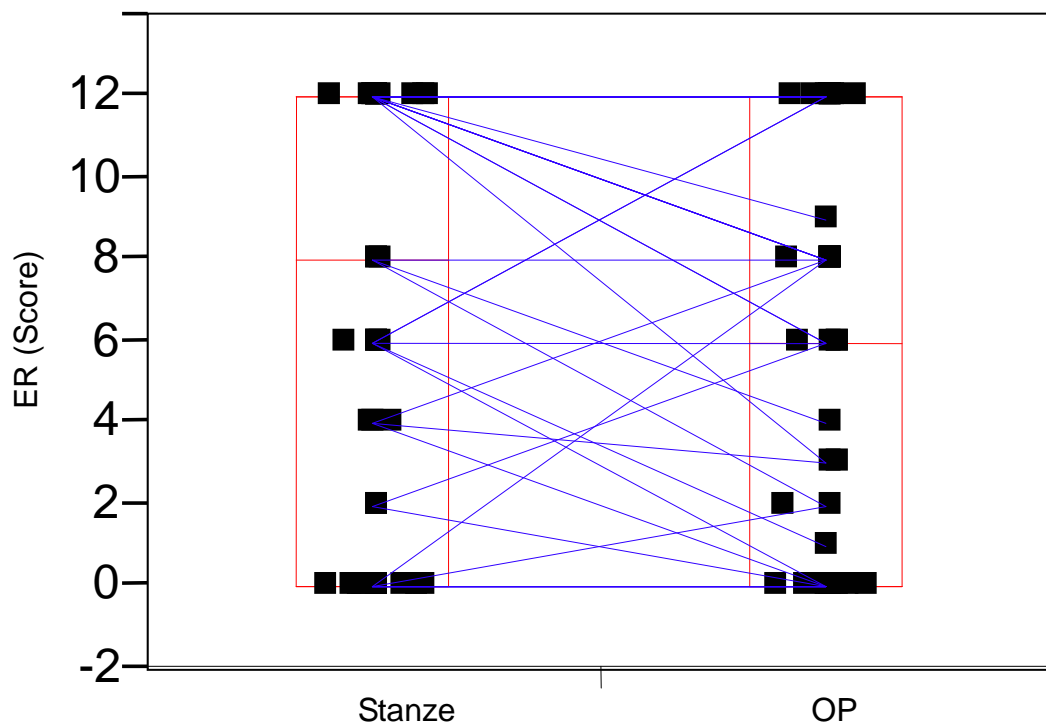
3.6.1. Östrogenrezeptor

In beiden Therapiegruppen konnten Veränderungen des Östrogenrezeptorscores beobachtet werden und es kamen sowohl Anstiege als auch Abfälle des Scores vor, ohne dass ein Trend in eine bestimmte Richtung zu erkennen ist. Die Abbildungen 3.13 und 3.14 zeigen die quantitativen Änderungen des ER-Scores getrennt für die beiden Therapiegruppen. Erwartungsgemäß liegt der durchschnittliche Score in der Gruppe der hormonwirksamen Therapie höher

als in der Chemotherapiegruppe (Median bei Score 8 beziehungsweise bei Score 12).

Der Östrogenrezeptorstatus blieb nach einer Chemotherapie in 87% unverändert positiv oder negativ, in 9% war die Stanze ER-positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 4% war die Stanze negativ und das OP-Präparat ER-positiv. Nach einer Aromatasehemmertherapie war der ER-Status in 89% unverändert, in 7% prätherapeutisch positiv und posttherapeutisch negativ und in 3% veränderte sich der Status von negativ nach positiv.

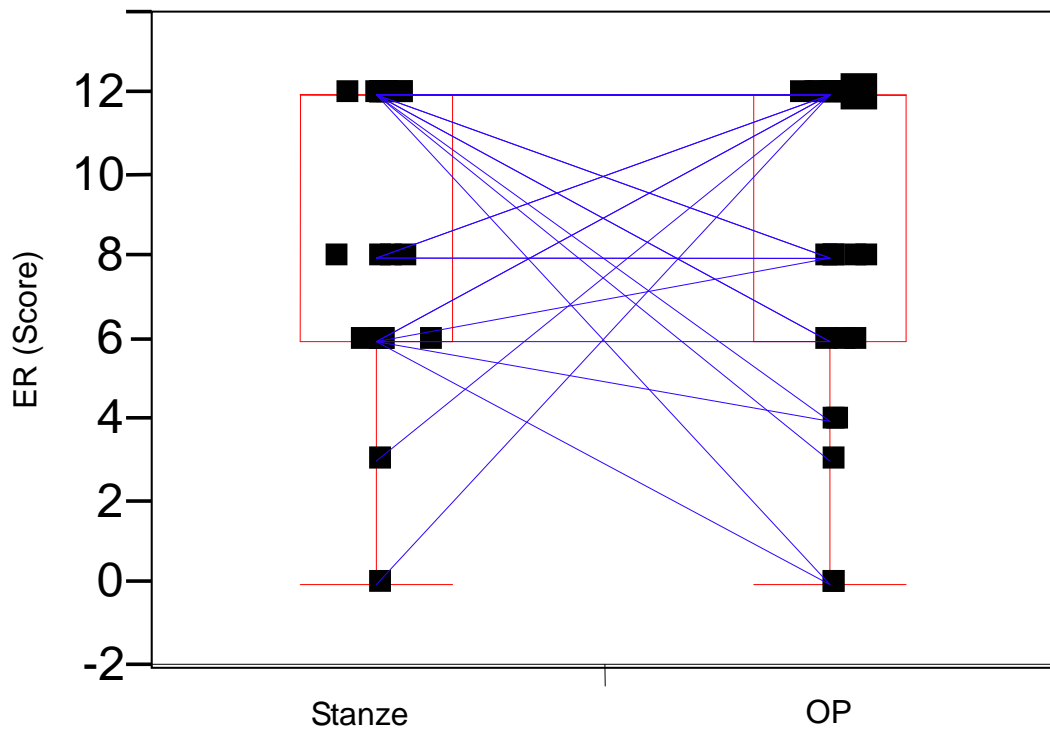
Chemotherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	8	12	12	12
OP	0	0	0	6	12	12	12

Abbildung 3.13: Quantitative Änderung des Östrogenrezeptorscores vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=45).

Antihormontherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	5.4	6	12	12	12	12
OP	0	2.4	6	12	12	12	12

Abbildung 3.14: Quantitative Änderung des Östrogenrezeptorscores vor und nach primär systemischer hormonwirksamer Therapie und Angabe der Perzentilen (n=27).

Um zu überprüfen, ob sich die Östrogenrezeptor-Scores in den beiden Gruppen unter der jeweiligen Therapie unterschiedlich verhalten, wurde für jeden Fall die Differenz aus dem Score der Stanze und dem Score des OP-Präparates gebildet. Das heißt, ist die Differenz von 0 verschieden, hat sich der Score verändert. Ist sie negativ, hat der Score nach der Therapie zugenommen, ist er positiv hat er abgenommen.

Daraufhin folgte eine Rangbildung der Differenzen, die mit Hilfe des Wilcoxon-Tests getestet wurden.

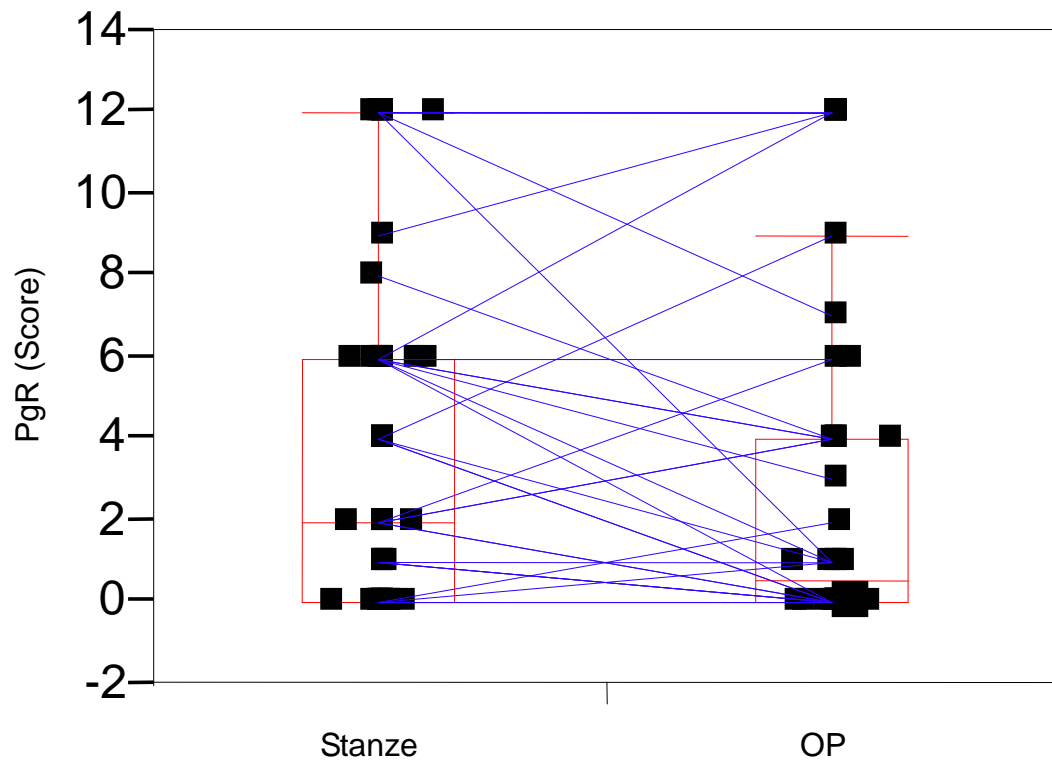
Bezüglich der ER-Score-Änderung unterscheiden sich die beiden Gruppen Chemotherapie und Antihormontherapie nicht ($p=0,65$).

3.6.2. Progesteronrezeptor

Analog zur Auswertung des Östrogenrezeptorscores erfolgt hier die Auswertung des Progesteronrezeptors. In den Abbildungen 3.15 und 3.16 sind die quantitativen Änderungen des PgR-Scores dargestellt. In der Chemotherapiegruppe ist allenfalls ein geringer Trend in Richtung Abnahme des Scores im Operationspräparat zu erkennen. Die endokrin therapierten Patientinnen zeigten im Stanzpräparat erwartungsgemäß häufiger eine Expression des Progesteronrezeptors und es ist eine Abnahme des Scores im OP-Präparat auszumachen.

Der Progesteronrezeptorstatus blieb nach einer Chemotherapie in 80% unverändert positiv oder negativ, in 14% war die Stanze PgR-positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 7% war die Stanze negativ und das OP-Präparat PgR-positiv. Nach einer Aromatasehemmertherapie war der PgR-Status in 68% unverändert, in 29% prätherapeutisch positiv und posttherapeutisch negativ und in 4% veränderte sich der Status von negativ nach positiv.

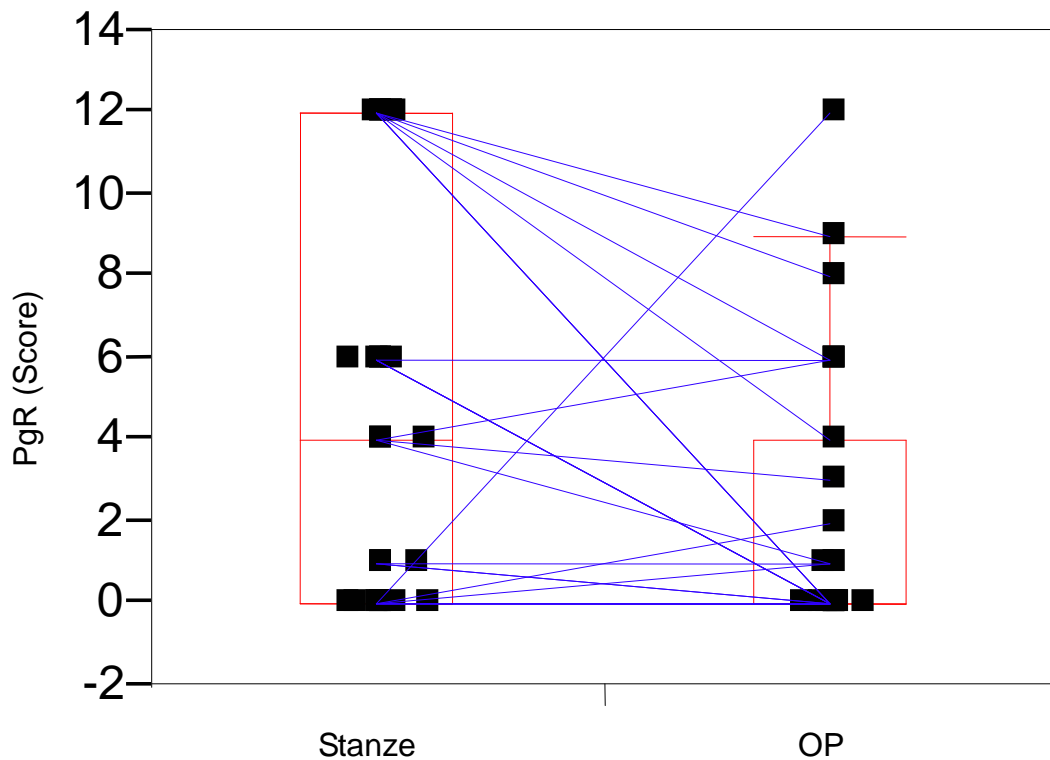
Chemotherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	2	6	12	12
OP	0	0	0	0.5	4	12	12

Abbildung 3.15: Quantitative Änderung des Progesteronrezeptorscores vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=44).

Antihormontherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	4	12	12	12
OP	0	0	0	0	4	8.2	12

Abbildung 3.16: Quantitative Änderung des Progesteronrezeptorscores vor und nach primär systemischer hormonwirksamer Therapie mit Angabe der Perzentilen (n=27).

Abb. 3.17 zeigt, dass die Scoredifferenzen in der Gruppe der Antihormontherapie eher im positiven Bereich liegen als in der Chemotherapiegruppe und damit der Score nach der primär systemischen Therapie abgenommen hat.

Wird nach der Rangbildung der Differenzen wiederum der Wilcoxon-Test angewandt, so ist dieser Gruppenunterschied aber nicht signifikant ($p=0,058$).

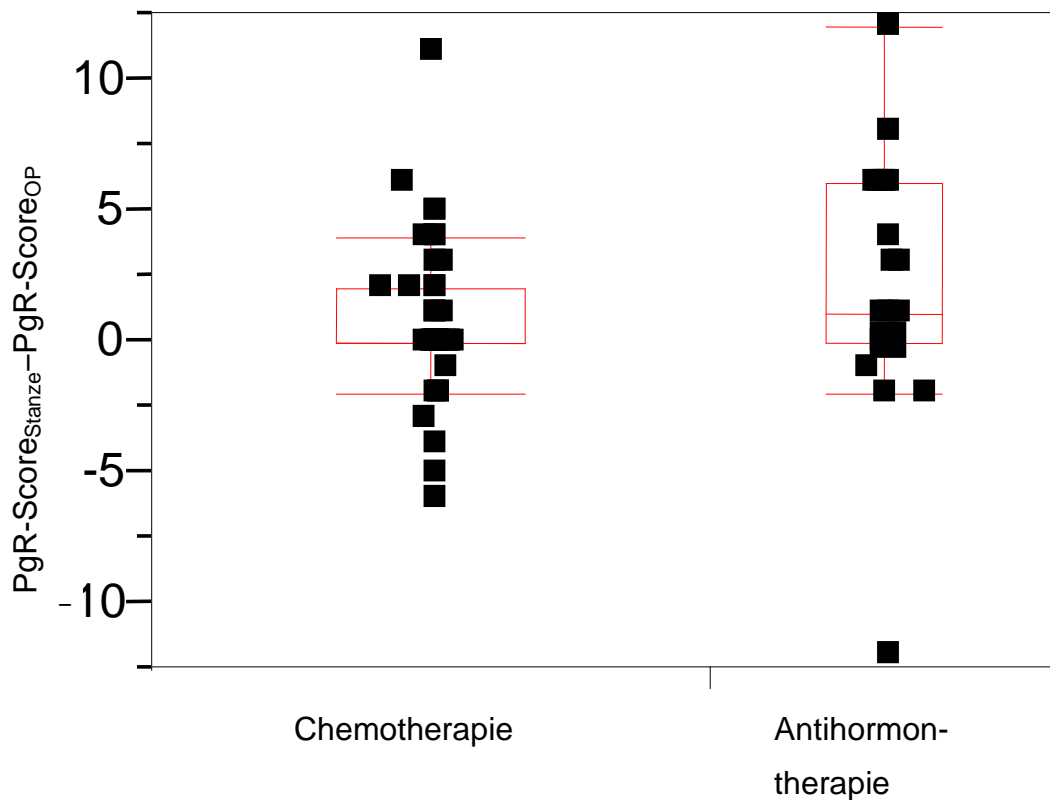


Abbildung 3.17: Scoredifferenzen für den Progesteronrezeptorscore (n=71)

3.6.3. Mib-1

Abb. 3.18 und Abb. 3.19 zeigen, dass die Expression von Mib-1 nach der primär systemischen Therapie in beiden Therapiegruppen abgenommen hat. Liegt der Median in der Gruppe der Chemotherapie in den Stanzeln noch bei 30% positiver Tumorzellen, so liegt er in den Operationspräparaten bei 10%.

Analog dazu hat der Median auch in der Gruppe der Antihormontherapie von 25% positiven Zellen auf 10% Mib-1-positiver Zellen abgenommen.

Im Ausmaß der Abnahme unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht (Wilcoxon-Test nach Rangbildung der Differenzen, s. Kapitel 3.6.1, $p = 0,84$).

Der Mib-1-Status blieb nach einer Chemotherapie in 57% unverändert positiv oder negativ, in 39% war die Stanze Mib-1-positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 7% war die Stanze negativ und das OP-Präparat Mib-1-positiv. Nach einer Aromatasehemmertherapie war der Mib-1-Status in 61% unverändert, in 39% prätherapeutisch positiv und posttherapeutisch negativ und eine Änderung von negativ nach positiv kam in dieser Gruppe nicht vor.

		Minimum	Median	Maximum
Chemotherapie	Stanze	3% pos. Zellen	30% pos. Zellen	90% pos. Zellen
	OP-Präparat	0% pos. Zellen	10% pos. Zellen	80% pos. Zellen
Hormontherapie	Stanze	5% pos. Zellen	25% pos. Zellen	75% pos. Zellen
	OP-Präparat	1% pos. Zellen	5% pos. Zellen	50% pos. Zellen

Tabelle 3.8: Lokalisationsmaße für Mib-1

Chemotherapie

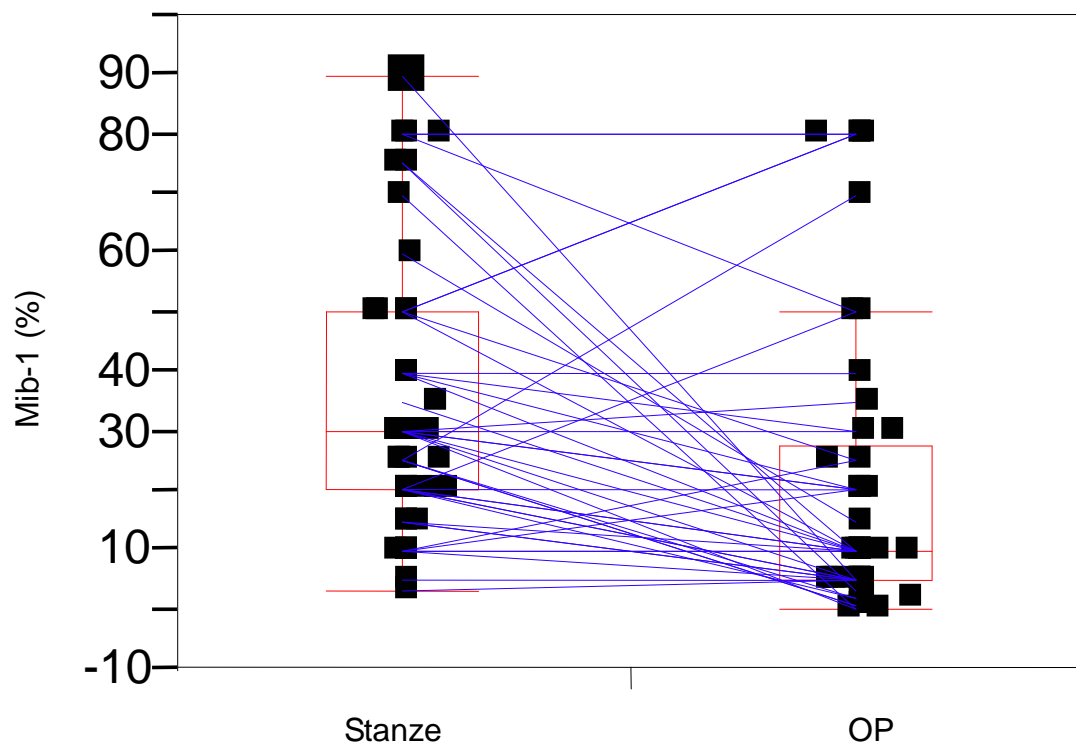


Abbildung 3.18: Quantitative Änderung der Mib-1-Expression vor und nach primär systemischer Chemotherapie (n=45).

Antihormontherapie

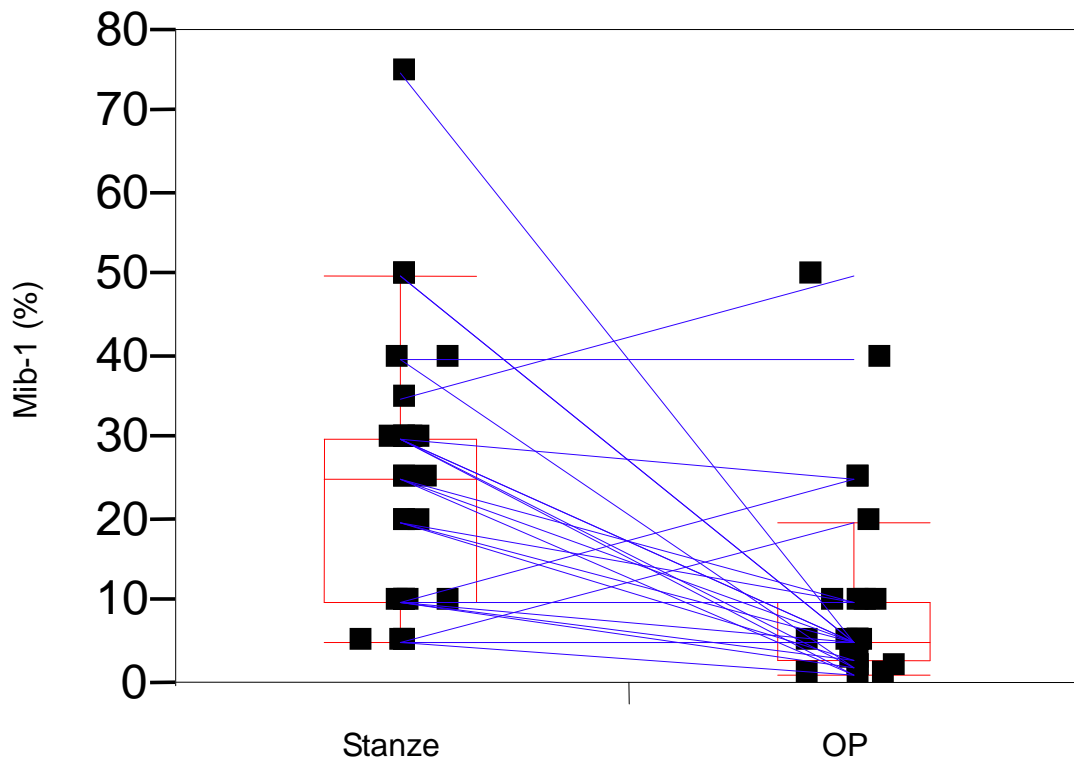


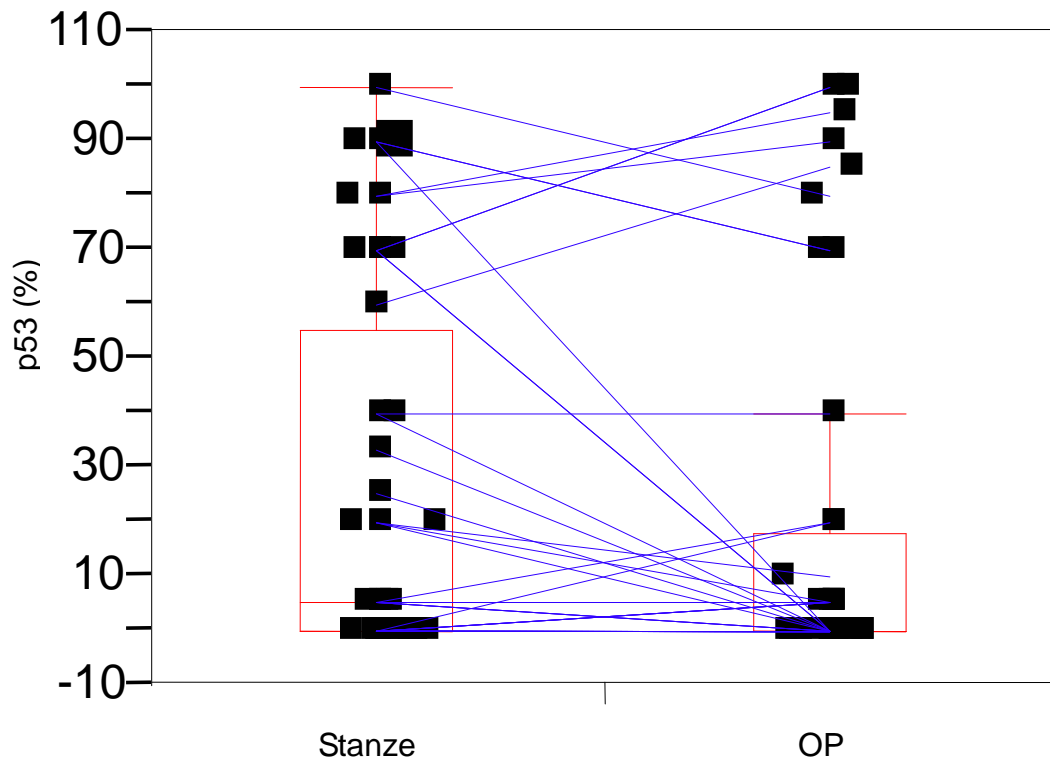
Abbildung 3.19: Quantitative Änderung der Mib-1-Expression vor und nach primär systemischer Antihormontherapie (n=27).

3.6.4. p53

Die Abbildungen 3.20 und 3.21 zeigen sowohl für die Gruppe der Chemotherapie als auch für die der endokrinen Therapie eher eine Abnahme des Prozentsatzes p53-exprimierender Tumorzellen. Ein signifikanter Gruppenunterschied besteht nicht ($p=0,48$ im Rangsummentest nach Wilcoxon).

Der p53-Status blieb nach einer Chemotherapie in 76% unverändert positiv oder negativ, in 19% war die Stanze p53-positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 5% war die Stanze negativ und das OP-Präparat p53-positiv. Nach einer Aromatasehemmertherapie war der p53-Status in 82% unverändert, in 11% prätherapeutisch positiv und posttherapeutisch negativ und in 7% veränderte sich der Status von negativ nach positiv.

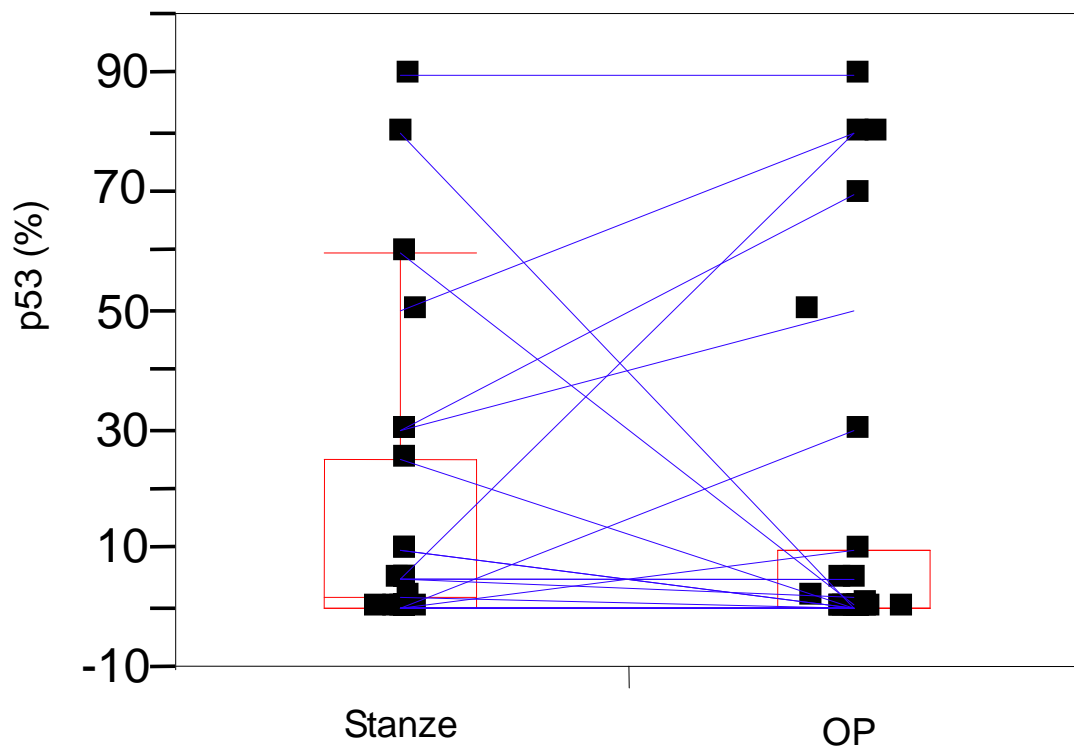
Chemotherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	5	55	85	100
OP	0	0	0	0	17.5	87.5	100

Abbildung 3.20: Quantitative Änderung der p53-Expression vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=44).

Antihormontherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	2	25	64	90
OP	0	0	0	0	10	80	90

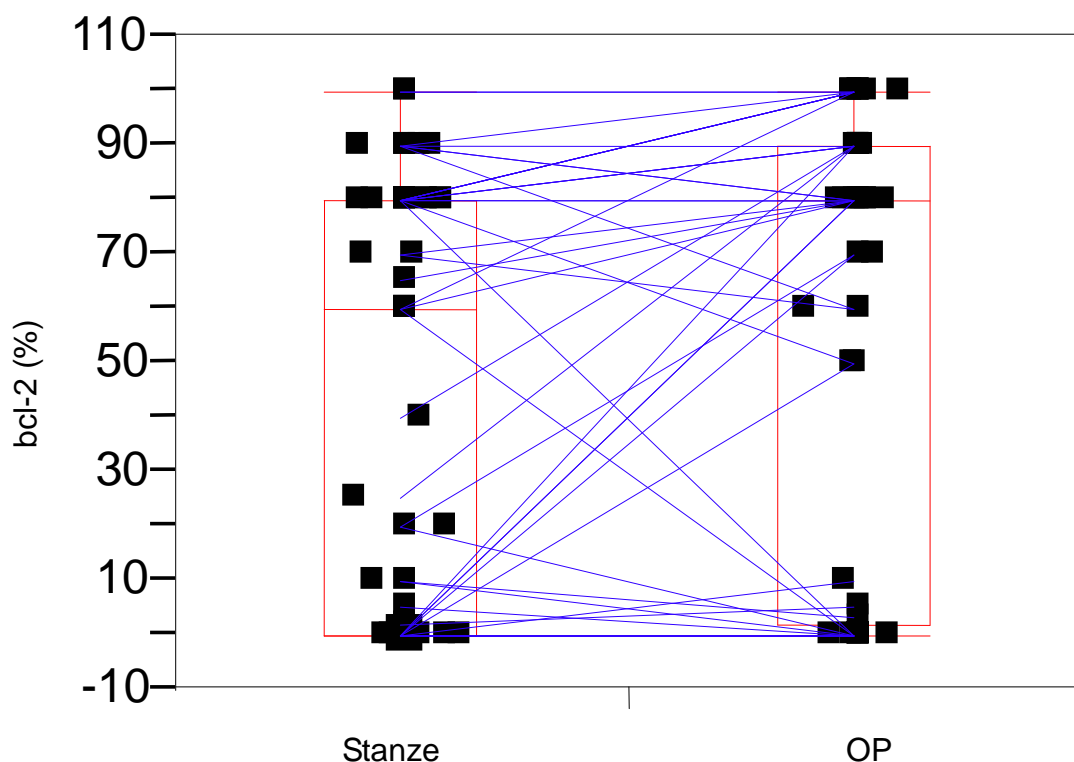
Abbildung 3.21: Veränderung der p53-Expression vor und nach primär systemischer Antihormontherapie mit Angabe der Perzentilen (n=27).

3.6.5. bcl-2

Die Abbildungen 3.22 und 3.23 zeigen die Veränderungen der bcl-2-Expression in den beiden Therapiegruppen. In beiden Gruppen ist die Veränderung gering, es ist aber tendenziell eine Zunahme des Apoptoseinhibitors zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Chemotherapiegruppe der Gruppe der Antihormontherapie besteht im Wilcoxon-Rangsummentest nicht ($p=0,91$).

Der bcl-2-Status blieb nach einer Chemotherapie in 82% unverändert positiv oder negativ, in 9% war die Stanze bcl-2-positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 9% war die Stanze negativ und das OP-Präparat bcl-2-positiv. Nach einer Aromatasehemmertherapie war der bcl-2-Status in 85% unverändert, in 7% prätherapeutisch positiv und posttherapeutisch negativ und in 7% veränderte sich der Status von negativ nach positiv.

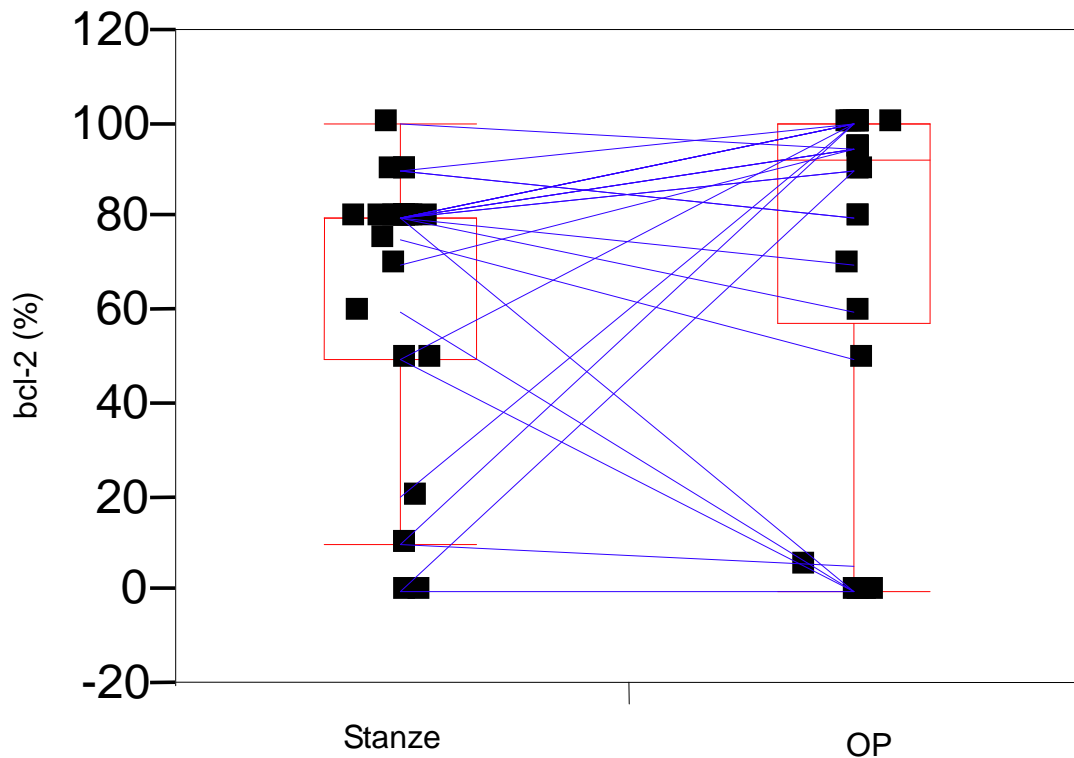
Chemotherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	60	80	90	100
OP	0	0	1.5	80	90	100	100

Abbildung 3.22: Quantitative Änderung der bcl-2-Expression vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=45).

Antihormontherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	7	50	80	80	90	100
OP	0	0	57.5	92.5	100	100	100

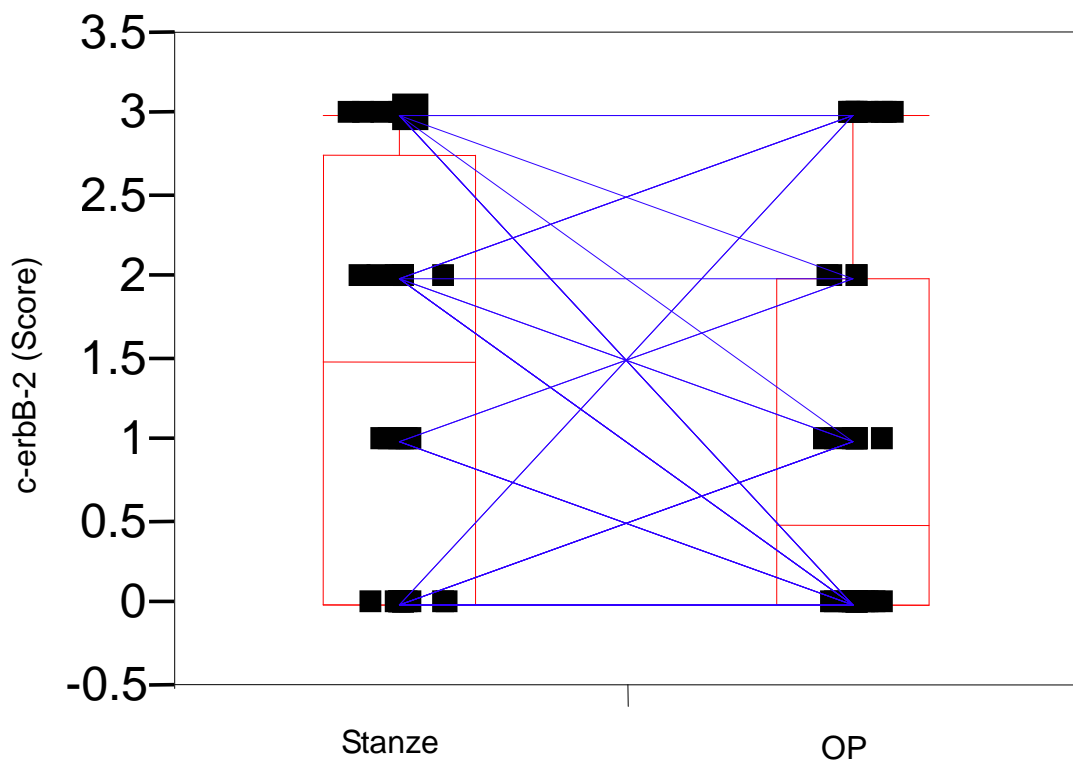
Abbildung 3.23: Quantitative Änderung der bcl-2-Expression vor und nach primär systemischer Antihormontherapie mit Angabe der Perzentilen (n=26).

3.6.6. c-erbB-2

Auch die Veränderungen im DakoHercep-Score sind minimal. Die Abbildungen 3.24 und 3.25 zeigen eine geringe Abnahme des Scores nach den jeweiligen primär systemischen Therapien. Ein Gruppenunterschied konnte im Wilcoxon-Rangsummentest nicht festgestellt werden ($p=0,73$).

Der c-erbB-2-Status blieb nach einer Chemotherapie in 77% unverändert positiv oder negativ, in 12% war die Stanze c-erbB-2-positiv und das entsprechende OP-Präparat negativ, in 12% war die Stanze negativ und das OP-Präparat c-erbB-2-positiv. Nach einer Aromatasehemmertherapie war der c-erbB-2-Status in 86% unverändert, in 11% prätherapeutisch positiv und posttherapeutisch negativ und in 4% veränderte sich der Status von negativ nach positiv.

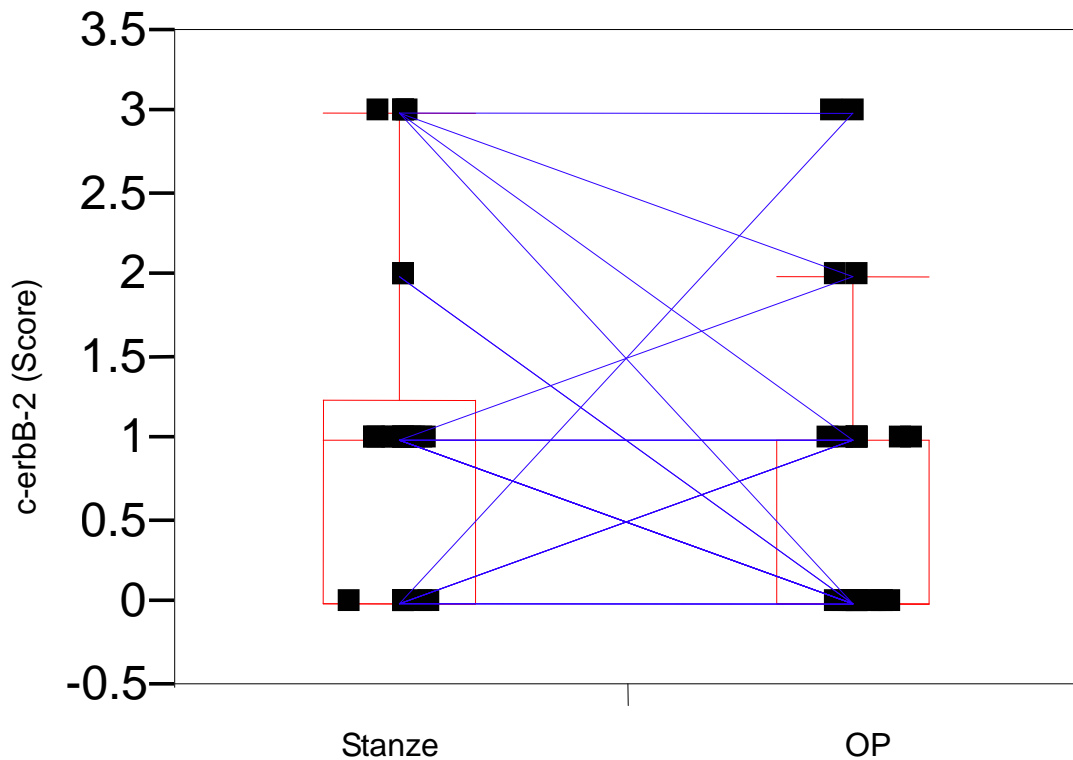
Chemotherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	1.5	2.75	3	3
OP	0	0	0	0.5	2	3	3

Abbildung 3.24: Quantitative Änderung des DakoHercep-Scores vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=44).

Antihormontherapie



Level	Minimum	10%	25%	Median	75%	90%	Maximum
Stanze	0	0	0	1	1.25	3	3
OP	0	0	0	0	1	2.3	3

Abbildung 3.25: Quantitative Änderung des DakoHercep-Scores vor und nach primär systemischer Antihormontherapie mit Angabe der Perzentilen (n=26).

3.7. Multivariates Modell

Ergänzend wurde ein multivariates Modell anhand schrittweiser Variablenfunktion gebildet. Als Einzelfaktoren wurden CA IX, HR, Mib-1, HR-Therapie, p53 und c-erbB-2 eingesetzt und deren mögliche zweifache Wechselwirkung untersucht.

ER und PgR wurden zusammengefasst zum Faktor Hormonrezeptor (HR), denn anhand dieses Faktors entscheidet sich, ob eine Antihormontherapie überhaupt sinnvoll ist. Das heißt alle Patientinnen in der Gruppe Antihormontherapie haben einen positiven Hormonrezeptorstatus. Damit ist der Faktor Therapie nicht unabhängig vom Hormonrezeptor.

Deshalb wurden die beiden Faktoren Therapie und HR für das multivariate Modell zusammengefasst zum Faktor HR-Therapie, welcher also die Variablen Hormontherapie (immer HR-positiv), Chemotherapie HR-positiv und Chemotherapie HR-negativ beinhaltet.

Obwohl von dieser Variablenliste durch eine vorwärtsgerichtete Selektion nur drei Terme ausgewählt werden (HR-Therapie, CA IX und die Wechselwirkung zwischen beiden) ist eine Erzielung stabiler Schätzwerte mit diesem Modell nicht möglich.

3.8. Abhängigkeit von CA IX, HIF-1 α und HIF-2 α

Um zu überprüfen, ob zwischen den Faktoren CA IX, HIF-1 und HIF-2 eine Abhängigkeit besteht wurde der χ^2 -Test auf Unabhängigkeit angewendet. Ist der p-Wert in diesem Test kleiner 0,05, kann die Nullhypothese abgelehnt werden und eine Abhängigkeit ist anzunehmen.

χ^2 -Test auf Unabhängigkeit von	p-Wert
HIF-1 α und CA IX	0,66
HIF-2 α und CA IX	0,19
HIF-1 α und HIF-2 α	0,10

Tabelle 3.9: χ^2 -Test auf Unabhängigkeit von HIF-1 α , HIF-2 α und CA IX

Aus Tabelle 3.9 geht hervor, dass alle p-Werte größer 0,05 sind, das heißt, die Nullhypothese, dass zwischen den Faktoren keine Abhängigkeit besteht, kann nicht verworfen werden.

4. Diskussion

4.1. Patientenkollektiv

Die Altersverteilung im vorliegenden Patientenkollektiv weicht nur unwesentlich von der eines größeren Feldstudienkollektivs mit 3210 primär operierten Mammakarzinompatientinnen ab (Engel et al., 2003). Der Altersmittelwert dieser Studie lag bei 61,4 Jahren, der Median bei 60, während in unserem Kollektiv ein Mittelwert von 56,3 und ein Median von 57 Jahren bei Diagnosestellung vorlag. Die meisten Neuerkrankungen traten in der genannten Münchner Studie im Alter zwischen 50 und 59 Jahren auf, in unserem Kollektiv lag das Erkrankungsmaximum in der 7. Lebensdekade, also zwischen 60 und 69 Jahren.

Allerdings muss man beachten, dass unser Kollektiv nur Patientinnen beinhaltet, die bereits einen fortgeschrittenen Tumor entwickelt haben und das Vergleichskollektiv auch Patientinnen mit T1-Tumoren und In-situ-Karzinomen einschließt, die im Durchschnitt ein geringeres Alter bei Diagnosestellung hatten.

Aus demselben Grund lassen sich auch die T-Stadien der beiden Kollektive nicht ohne weiteres miteinander vergleichen. Berechnet man allerdings die Verteilung der Stadien pT2 bis pT4 (n=1390) aus den Daten von Engel et al., so erhält man die Vergleichswerte aus Tabelle 4.1.

pT-Stadium (Engel et al., 2003)			T-Stadium (klinisch, vor prim. Therapie)		
	absolut	rel. Häufigkeit		absolut	rel. Häufigkeit
pT2	1072	77,1 %	T2	54	58,1 %
pT3	157	11,3 %	T3	10	10,7 %
pT4	161	11,6%	T4	29	31,2 %

Tabelle 4.1: Vergleich des Kollektivs mit Daten aus einer Feldstudie mit 3210 Patientinnen

Das relative Überwiegen der T4-Tumoren in unserem Kollektiv ergibt sich aus der hohen Anzahl an inflammatorischen Mammakarzinomen (T4d), da dieses eine etablierte Indikation für die primär systemische Therapie darstellt, während T2-Tumoren häufiger primär operiert werden.

Bezüglich der postoperativ bestimmten Histologie zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zu Angaben aus der Literatur (Lebeau et al., 2003). Tabelle 4.2 vergleicht diese mit den Ergebnissen unseres Kollektivs.

Histologie	Anzahl (n=80)	rel. Häufigkeit (%)	Literatur (%)
invasiv duktales Karzinom	56	70	65-80
invasiv lobuläres Karzinom	16	20	6-15
invasiv tubuläres Karzinom	3	3,75	1-15
invasiv medulläres Karzinom	2	2,5	ca. 3
invasiv papilläres Karzinom	1	1,25	1-7
fehlende Angaben	2	2,5	0

Tabelle 4.2: Vergleich der Häufigkeit der histologischen Klassifikationen mit Angaben aus der Literatur

Auch hinsichtlich der in unserem Kollektiv bestimmten etablierten Prognosefaktoren Grading und Hormonrezeptorstatus ist dieses im Wesentlichen repräsentativ für alle Mammakarzinome. Die Tabellen 4.3 und 4.4 vergleichen unsere eigenen Ergebnisse mit verschiedenen Angaben aus der Literatur.

Quelle	G1	G2	G3
eigene Ergebnisse (n=93)	1,1%	68,8%	21,5%
Le Doussal et al., 1989 (n=1262)	11%	55%	34%
Elston, Ellis, 1991 (n=1830)	19%	34%	47%
Bloom, Richardson, 1957 (n=1409)	26%	45%	29%

Tabelle 4.3: Übersicht über die Häufigkeiten histologischer Differenzierungsgrade bei verschiedenen Untersuchern.

Quelle	ER+	PgR+
eigene Ergebnisse (n=93)	74,2%	44,1%
Wulf, Schmid-Matthiesen, 1996 (n=7841), Literaturzusammenstellung	53%	33%
Thorpe et al., 1987 (n=807)	75%	65%
Mason et al., 1983 (n=374)	60%	49%
Keen, Davidson 2003 (Review)	70-80%	ca. 40%

Tabelle 4.4: Übersicht über die Verteilung der Hormonrezeptoren bei verschiedenen Untersuchern.

Die deutlichen Abweichungen bei den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchern bezüglich der Hormonrezeptoren liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kollektive. So wurden bei Thorpe et al. nur nodal negative Patientinnen untersucht. Allerdings fanden Mason et al. in den beiden Gruppen der nodal positiven und der nodal negativen Patientinnen einen annähernd gleichen Anteil von hormonrezeptorpositiven Karzinomen.

Die Verteilung in unserem Kollektiv liegt innerhalb der relativ großen Spannbreite der genannten Untersuchungsergebnisse und ist deshalb als repräsentativ anzusehen.

Auch bezüglich der neuen Prognosefaktoren zeigt unser Kollektiv die erwartete Verteilung. Die Häufigkeit der c-erbB-2-Expression wird mit 20-30% angegeben (Winstanley et al., 1991, Wulf, Schmid-Matthiesen, 1996, Slamon et al., 2001), in unserem Kollektiv zeigten 23,7% eine Überexpression.

Der Proliferationsmarker Mib-1 konnte in einer Gruppe von 136 unselektierten Mammakarzinomen in 54% nachgewiesen werden (Bouzubar et al., 1989), während er in unserem Kollektiv in 61,3% der Fälle immunhistochemisch sichtbar war.

Der Apoptoseinhibitor bcl-2 kann immunhistochemisch in etwa 80% der Mammakarzinome nachgewiesen werden (Krajewski et al., 1999), wobei auch bezüglich dieses Faktors unser Kollektiv mit 74,2% bcl-2-Positivität repräsentativ erscheint.

Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 wird in 20-30% der primären Mammakarzinome beobachtet (Bergh et al., 1995, Keen, Davidson 2003), während im vorliegenden Kollektiv 37,6% der Karzinome eine nukleäre Akkumulation des mutierten p53-Proteins zeigten.

4.2. Ansprechen auf die primär systemische Therapie

4.2.1. Chemotherapie

Eine pathologische Komplettremission trat in 5,4% aller Patientinnen auf, wobei diese nur nach einer Chemotherapie beobachtet wurde. In der Gruppe der Patientinnen mit Chemotherapie liegt die Rate der pCR also bei 8,1%.

Nach der pathomorphologischen Definition schließt der Nachweis residualer intraduktaler Tumorzellen eine pCR aus, dennoch wurden in zahlreichen Studien auch In-situ-Karzinome mit in die Gruppe der pathologischen Komplettremissionen aufgenommen, was den Vergleich der Studien untereinander erschwert. Im vorliegenden Kollektiv beträgt der Anteil an pCR und Tis zusammen nach primär systemischer Therapie 10,8%, in der Chemotherapiegruppe allein 16,1%.

Eine Verkleinerung des Tumorumfanges, also eine minor response oder besser, konnte in 66,1% der Chemotherapiefälle erreicht werden.

Die größte Studie zur primär systemischen Chemotherapie war das multizentrische National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 (NSABP-B-18). In diese Studie wurden 1.523 Patientinnen eingeschlossen und erhielten entweder prä- oder postoperativ eine Chemotherapie mit Adriamycin und Cyclophosphamid. 36% der Patientinnen des primär systemischen Therapiearms erreichten eine klinische Komplettremission, davon konnten in 26% pathologisch keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden, was einem Anteil von 9% des gesamten Therapiearms entspricht, beziehungsweise 13%, wenn man die In-situ-Karzinome mit einschließt (Fisher et al., 1997).

Zwischen den beiden Therapiearmen gab es nach fünf Jahren keinen Unterschied bezüglich des krankheitsfreien Überlebens, des DDFS und des Gesamtüberlebens. Adjuvante und primär systemische AC-Chemotherapien sind demnach also als gleichwertig anzusehen.

Patientinnen, die unter primär systemischer Therapie eine klinische Komplettremission zeigten, hatten eine signifikant bessere Rate an krankheitsfreiem Überleben ($p=0,0014$) als diejenigen ohne klinische Komplettremission. Allerdings konnte kein verbessertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten für die Gruppe der Patientinnen mit einer pathologischen Komplettremission (inklusive In-situ-Karzinome) nicht nur bessere Raten für das DFS ($p=0,0001$), das RFS ($p<0,0001$) und das DDFS ($p=0,0004$) festgestellt werden, sondern auch ein verbessertes Gesamtüberleben ($p=0,06$) (Fisher et al., 1998).

Ähnliche Ergebnisse brachte eine Studie der European Organization for Research and Treatment of Cancer mit primär systemischer Gabe von 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid, bei der ebenfalls die pathologische, nicht aber die klinische Komplettremission einen Überlebensvorteil brachte ($p=0,008$) (van der Hage et al., 2001).

Dass es sinnvoll ist, die In-situ-Karzinome nicht mit in die Gruppe der pathologischen Komplettremissionen zu zählen, zeigen die Zahlen von Chollet et al. Hier konnte in der Gruppe der pathologischen Komplettremissionen inklusive der In-situ-Karzinome kein verbessertes Gesamtüberleben verzeichnet werden. Wenn aber die pathologischen Komplettremissionen allein gegen die übrigen Gruppen getestet wurden, wurde der Unterschied signifikant ($p=0,047$), das 15-Jahresüberleben betrug 85,1% gegenüber 66,7% (Chollet et al., 2002).

4.2.2. Hormonwirksame Therapie

In der Gruppe der endokrin therapierten Patientinnen war das Ansprechen auf die primär systemische Therapie zum Zeitpunkt der Operation schlechter als in der Gruppe der Chemotherapie. Dies zeigt sich am deutlichsten daran, dass in dieser Gruppe keine pathologischen Komplettremissionen und keine residualen In-situ-Karzinome zu verzeichnen waren. Auch der Anteil der partiellen Remissionen liegt mit 12,9% bei den hormontherapierten Frauen deutlich unter dem in der Chemotherapiegruppe (29%).

Eine Verkleinerung des Tumorumfanges konnte in 45,2% der Hormontherapiefälle erreicht werden.

Pathologische Komplettremissionen unter primär systemischer hormonwirksamer Therapie sind eher ungewöhnlich, was aber nicht unbedingt als Nachteil angesehen werden sollte, so lange die Tumoren verkleinert werden und eine Verbesserung der operativen Möglichkeiten erreicht wird (Ellis, 2001).

Eine mit der NSABP-B-18 in der Größe vergleichbare Studie zur primär systemischen Therapie mit Aromataseinhibitoren existiert zum heutigen Zeitpunkt nicht.

Dixon et al. untersuchten eine Gruppe von 24 postmenopausalen Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven, lokal fortgeschrittenen oder großen operablen Mammakarzinomen, die präoperativ Anastrozol (Arimidex[®]) erhielten. Das Ansprechen wurde sonographisch beurteilt. 75% der Patientinnen zeigten eine Reduktion des Tumolvolumens um mehr als 50% nach zwölf Wochen. Dadurch konnten 15 der 17 Patientinnen, die bei Diagnosestellung eine Mastektomie benötigt hätten, brusterhaltend operiert werden (Dixon et al., 2000).

Eine weitere Untersuchung, ebenfalls mit 24 Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen hormonrezeptorpositiven Karzinomen, beobachtete das Ansprechen auf Letrozole (Femara[®]). 87,5% der Patientinnen zeigten klinisch eine Verkleinerung des Tumors, eine Patientin erreichte sogar eine pathologische Komplettremission (Dixon et al., 2001).

Ellis et al. verglichen Letrozole und Tamoxifen in der primär systemischen Situation. Ein klinisches Ansprechen (komplette oder partielle Remission) war in der Letrozolgruppe bei 74 von 124 Patientinnen (60%) und in der Tamoxifengruppe bei 52 von 126 Patientinnen (41%) zu verzeichnen ($p=0,004$). Sonographisch waren die Ansprechraten geringer und lagen bei 39% bzw. 29% ($p=0,118$), mammographisch bei 38% bzw. 20% ($p=0,002$). Eine Auswertung des pathologisch beurteilten Ansprechens erfolgte nicht.

Interessanterweise zeigten c-erbB-1 und/oder c-erbB-2 positive Tumoren unter Letrozole ein signifikant besseres Ansprechen als unter Tamoxifen (88% vs. 21%, $p=0,0004$) (Ellis et al., 2001).

Da in den genannten Untersuchungen keine Auswertung der Remission anhand der pathologischen Präparate erfolgte, also nicht klar ist, ob es tatsächlich auch zu einem entsprechenden Rückgang an Tumorzellen gekommen ist, sind diese auch nur bedingt mit unseren Ergebnissen vergleichbar. Die Zahlen von Ellis et al. zeigen, wie deutlich schon der Unterschied zwischen den klinisch und den sonographisch oder mammographisch bestimmten Responderaten ist.

Unter primär systemischer Therapie kann es sowohl zu einer konzentrischen Verkleinerung des Knotens als auch zu einer Ausdünnung des Tumors mit clusterartig aggregierten Tumorzellkomplexen und tumorfreien Fibrosezonen kommen (Bauerfeind et al., 2003, Lebeau et al., 2003), die die Unterschiede zwischen klinisch, sonographisch, mammographisch und pathologisch gemessener Tumorgröße nach primär systemischer Hormon- oder Chemotherapie erklärt.

Die beste Korrelation zwischen der tatsächlichen, im pathologischen Präparat gemessenen Tumorgröße besteht zur sonographisch und zur mammographisch bestimmten Größe, weshalb auch die Sonographie als Methode der Wahl gilt, um Mammakarzinome unter primär systemischer Therapie zu beobachten (Fourouhi et al., 1994).

Eine Untersuchung mit 48 Patientinnen beurteilte auch die pathologische Remission unter Letrozole und Tamoxifen. Nach dreimonatiger Therapie mit Letrozole wurde bei 17 von 24 Patientinnen (71%) pathologisch zumindest ein deutlicher Rückgang der Zelldichte und/oder ein Anstieg der Fibrose verzeichnet. Unter Tamoxifen konnte dies in 15 von 24 der Fälle (63%) beobachtet werden (Miller et al., 2003).

4.3. CA IX- Expression

In der vorliegenden Untersuchung wurde entgegen der Erwartungen eine Rate von 16% CA IX-positiver Stanzeln und 12% CA IX-positiver OP-Präparate beobachtet. Eine zum Teil wesentlich höhere Expression zeigte sich in vorangegangenen Studien an Mammakarzinomen. Chia et al. (2001) fanden eine CA IX-Expression in 49% (n=103), Bartošova et al. (2002) in 42% (n=19) und Ivanov et al. (2001) in 24% (n=38) der invasiven Mammakarzinome.

Ein Grund für die niedrige Expressionsrate im zugrunde liegenden Kollektiv ist möglicherweise der fokale Charakter der CA IX-Expression, die besonders in Regionen um Nekrosen zu finden ist (Ivanov et al., 2001, Chia et al., 2001, Wykoff et al., 2001). Vor allem bei der Entnahme der ultraschallgesteuerten Stanzbiopsien wurde aber darauf geachtet möglichst kein Gewebe aus nekrotischen Tumorarealen zu entnehmen.

Aber auch in den Operationspräparaten lag die Expression deutlich unter dem erwarteten Prozentsatz. Zu beachten ist, dass oben genannte Untersucher Mammakarzinome untersuchten, die primär operiert wurden und nicht wie im vorliegenden Fall zunächst systemisch therapiert worden sind. Über die Expression von CA IX nach primär systemischer Therapie liegen bisher noch keine Untersuchungen vor.

Bisherigen Studien zufolge ist eine CA IX-Expression in Mammakarzinomgewebe mit einer schlechteren Prognose bezüglich des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens assoziiert (Chia et al., 2001) und die CA9-mRNA ein unabhängiger prognostischer Faktor und prädiktiver Marker für ein kürzeres rezidivfreies Überleben nach adjuvanter Therapie (Span et al., 2003).

Dementsprechend wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Assoziation zwischen erhöhtem CA IX und einer schlechten Response nach primär systemischer Therapie erwartet.

Im Gegensatz dazu, konnte bei Patientinnen, die auf die primär systemische Chemotherapie mit einer pCR ansprechen eher CA IX in der Stanzbiopsie nachgewiesen werden ($p=0,035$). Dieser Wert kann aber nicht als signifikant bezeichnet werden, da die Irrtumswahrscheinlichkeit α aufgrund des multiplen Testens korrigiert werden muss (Bonferroni).

Es ist allerdings ein wichtiger Hinweis auf einen Gruppenunterschied, der in einem größeren Kollektiv bestätigt werden sollte. Möglicherweise kann CA IX als prädiktiver Faktor für die prognostisch relevante Gruppe der pathologischen Komplettremission herangezogen werden.

Da in der Gruppe der endokrin therapierten Patientinnen keine pathologischen Komplettremissionen aufgetreten sind, konnte hier eine vergleichbare Beobachtung nicht gemacht werden.

In der vorliegenden Untersuchung sind die Tumoren eher groß (T_2 bis T_4), was möglicherweise zu Hypoxie und damit zu einer Hochregulierung von CA IX führt. Es wurde bisher aber keine Korrelation zwischen CA IX-Expression und Tumorgroße gefunden (Bartošová et al., 2002, Span et al., 2003).

Dies ist ein Hinweis darauf, dass, obwohl Hypoxie via HIF wichtig für die CA IX-Regulation ist, auch andere Transkriptionsfaktoren und Einflüsse eine wichtige Rolle spielen (Kaluzova, 2001, Opavský et al., 1996). Unterstützt wird diese Annahme durch eine fehlende Assoziation zwischen CA IX und HIF-1 α .

Die Halbwertszeit des CA IX-Proteins beträgt in vitro auch nach Reoxygenierung noch etwa 38 Stunden (Rafajová et al., 2004), während HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von 5-10 Minuten rasch abnimmt (Salceda und Caro, 1997). Damit zeigt eine CA IX-Expression möglicherweise auch eher eine zurückliegende, als eine aktuelle Hypoxie an.

So könnte eine hypoxiegetriggerte Reaktion bereits zurückliegen, mit dem Ergebnis, dass eine schnelle Reoxygenierung erfolgte, was wiederum eine erfolgreiche primär systemische Chemotherapie ermöglicht. Auch dieses Modell wird durch die fehlende Assoziation zwischen HIF-1 α und CA IX gestützt.

Das CA IX-Protein ist auch an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt (Pastorek et al., 1997) und in Kolonkarzinomen exprimieren CA IX-positive Tumorzellen auch den Proliferationsmarker Ki-67 (Saarnio et al., 1998). Beim primär systemisch mit Anthracyclinen therapierten Mammakarzinom ist die Ki-67-Expression mit einer besseren Response assoziiert (Faneyete et al., 2003), was sich durch die erhöhte Chemosensitivität von proliferierenden Zellen erklären lässt.

4.4. HIF-1 α -Expression

In den Stanzbiopsien war HIF-1 α nur in 18,5% immunhistochemisch anfärbbar, während in den Operationspräparaten HIF-1 α in einem wesentlich höheren Prozentsatz, nämlich in 72% nachweisbar war. Auch in der Literatur sind meist höhere Expressionsraten angegeben. Zhong et al. konnten HIF-1 α in primären Mammakarzinomen nur in 29% der Fälle nachweisen, jedoch fanden sie in Mammakarzinometastasen in 69% das HIF-1 α -Protein (Zhong et al., 1999).

Eine wesentlich höhere Rate an HIF-1 α -exprimierenden Tumoren beschrieben Talks et al., HIF-1 α war hier in 83% der Mammakarzinome nachweisbar (Talks et al., 2000). Auch bei Schindl et al. war mit 76% der Anteil deutlich höher als bei den Stanzen in der vorliegenden Untersuchung, obwohl erst eine Expression von mehr als 10% positiver Zellen als HIF-1 α -positiv gewertet wurde (Schindl et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für die geringe Expressionsrate in den präoperativen Biopsien ist die geringe Größe des Zellzylinders und der fokale Charakter der HIF-1 α -Expression. Wie auch CA IX wird HIF-1 α vornehmlich im Randbereich von Nekrosen exprimiert (Talks et al., 2000) und bei der Entnahme von Stanzbiopsien wird darauf geachtet möglichst kein Material aus nekrotischen Arealen zu entnehmen.

Die im Vergleich deutlich höhere Expression in den Operationspräparaten mag zum einen an häufigeren Nekrosearealen und größeren Schnittflächen liegen, zum anderen könnte aber auch die primär systemische Therapie Auswirkungen auf die HIF-1 α -Expression haben.

Die Mikrogefäßdichte (microvessel density) nimmt unter primär systemischer chemoendokriner Therapie signifikant ab, was zum einen an einer verminderten Expression von angiogenetischen Faktoren liegen könnte, andererseits aber auch durch eine direkte Wirkung der primär systemischen Therapie auf die proliferierenden Blutgefäße (Makris et al., 1999). Letzteres wiederum würde zu Hypoxie im Tumor führen und die erhöhte HIF-1 α -Expression in den Operationspräparaten erklären. Für Paclitaxel, ein Chemotherapeutikum, das auch ein Teil der von uns untersuchten Patientinnen erhielten, konnte eine antiangiogenetische Wirkung nachgewiesen werden (Belotti et al., 1996).

Ein Zusammenhang zwischen der Response nach primär systemischer Therapie und der HIF-1 α -Expression in den prätherapeutisch entnommenen Stanzbiopsien konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Entsprechende Untersuchungen, die die prädiktive Wertigkeit der HIF-1 α -Expression vor primär systemischer Chemo- oder Hormontherapie darstellen, liegen derzeit nicht vor. Lediglich eine kleine Studie untersuchte die Assoziation zwischen dem Ansprechen auf eine photodynamische Therapie und der Expression von HIF-1 α , die ergab, dass eine hohe HIF-1 α -Expression signifikant mit einem schlechteren Ansprechen assoziiert war ($p=0,04$, Koukourakis et al., 2001).

Die prognostische Bedeutung von HIF-1 α hingegen wurde bisher in mehreren Studien nachgewiesen. Schindl et al. untersuchten 206 nodal positive Patientinnen, die meisten davon mit T1- oder T2-Tumoren, und konnten in Fällen mit HIF-1 α -Expression ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($p=0,003$) und ebenso ein schlechteres krankheitsfreies Überleben ($p=0,001$) beobachten (Schindl et al., 2002). Auch Gruber et al. fanden in der Gruppe der T1- und T2-Tumoren in der uni- und multivariaten Analyse ein signifikant schlechteres krankheitsfreies und fernmetastasenfreies Überleben ($p=0,01$ in beiden Fällen) für HIF-1 α -exprimierende Fälle. Wurden die T3- und T4-Karzinome in die multivariate Analyse mit eingeschlossen, war der Unterschied nicht mehr signifikant (Gruber et al., 2004).

Bos et al. fanden dagegen einen signifikanten Zusammenhang zwischen HIF-1 α -Expression und dem Gesamtüberleben nur in der Gruppe der nodal negativen Patientinnen ($p=0,008$). Das untersuchte Kollektiv beinhaltete ebenfalls in erster Linie T1- oder T2-Karzinome (139 von 150 Patientinnen) (Bos et al., 2003).

HIF-1 α scheint also in erster Linie in frühen Stadien des Tumorwachstums eine prognostische Aussagekraft zu besitzen und in fortgeschritteneren Stadien von anderen Faktoren in den Hintergrund gedrängt zu werden. Da unser Kollektiv auch einen erheblichen Anteil T3- und T4-Karzinome beinhaltet, sind die Ergebnisse der genannten Autoren nicht ohne weiteres darauf zu übertragen.

Das bisher größte Kollektiv untersuchte eine aktuelle retrospektive Studie mit 745 Mammakarzinompatientinnen und einer medianen Nachbeobachtungszeit von 13,5 Jahren. Hier bestätigte sich das schlechtere Gesamtüberleben der HIF-1 α -positiven Fälle ($p=0,019$) und das höhere Metastasierungsrisiko ($p=0,008$) in der univariaten Analyse (Dales et al., 2005).

Eine weitere Untersuchung unterschied zwischen der perinekrotischen Expression von HIF-1 α und der diffusen Expression und konnte für die perinekrotische Expression ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben als für die Fälle mit diffuser Expression feststellen. Des Weiteren war nur die perinekrotische Färbung des HIF-1 α -Proteins mit einer CA IX- und GLUT-1-Expression assoziiert (Vleugel et al., 2005).

Letztere Beobachtung wiederum ist eine mögliche Erklärung für die fehlende Assoziation von HIF-1 α und CA IX in unserem Kollektiv. Eine Differenzierung zwischen perinekrotischer und diffuser Expression von HIF-1 α wurde nicht vorgenommen, weshalb die Gruppe mit perinekrotischer Expression nicht getrennt auf eine Assoziation mit CA IX hin ausgewertet werden konnte.

4.5. HIF-2 α -Expression

4.5.1. HIF-2 α in Tumoren

Eine Expression des HIF-2 α -Proteins konnte in 33,3% der Stanzbiopsien und in 46% der OP-Präparate nachgewiesen werden. Damit stieg die Expressionsrate von HIF-2 α nach primär systemischer Therapie nicht so deutlich wie die von HIF-1 α . Über die Häufigkeit der HIF-2 α -Expression in Mammakarzinomen liegen nur sehr wenige Daten vor. Talks et al. konnten von den 12 untersuchten Mammakarzinomen das HIF-2 α -Protein in 11 Fällen nachweisen (92%). Werden alle untersuchten malignen Tumoren (darunter unter anderem Blasen-, Kolon-, Ovarial- und Prostatakarzinome) zusammengefasst, beträgt die Expressionsrate 59,6% (Talks et al., 2000). Damit liegt die Expressionsrate in unserem Kollektiv deutlich unter der in der Literatur beschriebenen, die aber nur in einem sehr kleinen Kollektiv untersucht wurde.

Auch in vitro wird HIF-2 α in Mammakarzinomzelllinien exprimiert, und zwar in den weniger aggressiven Zelllinien stärker als in den aggressiveren (Blancher et al., 2000).

In anderen malignen Tumoren sind die Expressionsraten sehr variabel. In einem Kollektiv von 89 Nasopharynxkarzinomen war HIF-2 α in nur 7% nachweisbar (Hui et al., 2002), während die Expressionsrate in Endometriumkarzinomen bei 17% lag (Sivridis et al., 2002, n=81). Koukourakis et al. fanden in Kopf-Hals-Tumoren in 33% eine hohe HIF-2 α -Expression (Koukourakis et al., 2002, n=75) und in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wurde in 51,4% der Fälle eine hohe HIF-2 α -Expression beobachtet (Giatromanolaki et al., 2001, n=107).

Bezüglich der Veränderung von HIF-2 α unter primär systemischer Chemo- oder Hormontherapie liegen weder zu Mammakarzinomen, noch zu anderen Karzinomen des Menschen Untersuchungen vor. Lediglich die Expression von HIF-1 α und HIF-2 α in Kopf-Hals-Tumoren vor und nach einer fraktionierten Bestrahlung mit 20 Gy wurde an 12 Fällen untersucht. Hier fand sich eine vermehrte Expression der HIF- α -Proteine nach der Therapie, in etwa 35% der Patienten waren die Proteine hochreguliert (Koukourakis et al., 2002).

Auch in der vorliegenden Untersuchung stieg die Expressionsrate des HIF-2 α -Proteins etwas an, wobei aber der Anstieg des HIF-1 α wesentlich deutlicher ausfiel.

Eine Studie mit zwei Mammakarzinomzelllinien ergab, dass das HIF-1 α -Protein und nicht das HIF-2 α -Protein für die Induktion einer Reihe von hypoxie-induzierbaren Proteinen, darunter VEGF, CA IX und GLUT-1, verantwortlich ist. Ähnliches zeigte sich für eine Endothelzelllinie (Sowter et al., 2003).

Demzufolge könnte die deutlich erhöhte HIF-1 α -Expression in den OP-Präparaten die Reaktion der Tumorzellen auf eine hypoxische Situation widerspiegeln, während HIF-2 α in Mammakarzinomzellen eine untergeordnetere Rolle spielt.

Der Anteil HIF-2 α -exprimierender Karzinome ist in der Gruppe der pathologischen Komplettremissionen gleich groß wie in der Gruppe non-pCR. Im Vergleich der Gruppen mit guter Response und schlechter Response ist ein Unterschied dahingehend zu beobachten, dass in der Gruppe mit der schlechten Response mehr Karzinome vor der Therapie HIF-2 α exprimierten. Der Unterschied wird aber nicht signifikant.

Zur prädiktiven Wertigkeit des HIF-2 α für das Ansprechen auf primär systemische Chemo- oder Hormontherapie liegen noch keine Studien vor, ebenso wenig wurde bisher die prognostische Aussagekraft des Proteins in Mammakarzinomen untersucht. Die in bereits Kapitel 4.4 genannte Studie untersuchte auch die Assoziation von HIF-2 α und dem Ansprechen auf eine photodynamische Therapie, konnte aber keinen signifikanten Zusammenhang mit einem guten oder schlechten Ansprechen feststellen (Koukourakis et al., 2001).

Für Kopf-Hals-Tumoren, die mit einer Strahlentherapie behandelt wurden, konnte kein signifikanter prognostischer Vor- oder Nachteil für HIF-2 α -exprimierende Karzinome gefunden werden. Interessanterweise wurde hier ein Überlebensvorteil für HIF-1 α -positive Karzinome beobachtet (Beasley et al., 2002), ganz im Gegensatz zu radiotherapierten Zervix- oder Oropharynxkarzinomen, die bei HIF-1 α -Expression ein schlechteres Outcome hatten (Birner et al., 2000, Aebbersold et al., 2001). In einer weiteren Studie mit 75 Fällen von inoperablen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich war dagegen sowohl die HIF-1 α - als auch die HIF-2 α -Überexpression mit einer inkompletten Response auf die Radiochemotherapie vergesellschaftet und auch das Gesamtüberleben war in beiden Fällen schlechter. In der multivariaten Analyse erwies sich HIF-2 α sogar als unabhängiger prognostischer Parameter (Koukourakis et al., 2002).

Sivridis et al. konnten zwar für HIF-1 α -positive Endometriumkarzinome ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben feststellen, für HIF-2 α -positive Karzinome war das Überleben aber nicht signifikant schlechter (Sivridis et al., 2002). Entsprechendes gilt für Karzinome des Nasopharynx (Hui et al., 2002).

Alles in allem konnte also keine Studie einen prädiktiven Wert für HIF-2 α nachweisen und auch bezüglich der prognostischen Bedeutung ist die Datenlage dünn. Nur eine Studie an Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs konnte eine sig-

nifikante Prognoseverschlechterung für HIF-2 α -exprimierende Tumoren feststellen. Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte der prädiktive Wert von HIF-2 α nicht abschließend geklärt werden.

4.5.2. HIF-2 α in tumorassoziierten Makrophagen

Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) tragen durch Sekretion von angiogenetischen Cytokinen wie VEGF und TNF α wesentlich zur Angiogenese in malignen Tumoren bei. Es zeigte sich, dass eine erhöhte Makrophageninfiltration in Mammakarzinomen mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist (Leek et al., 1996).

Die HIF-2 α -Färbungen im Stroma von Mammakarzinomen erwiesen sich als Färbung in tumorassoziierten Makrophagen. Normale Gewebsmakrophagen exprimieren kein HIF-2 α , lediglich in Kupferzellen und in Knochenmarksmakrophagen konnte HIF-2 α nachgewiesen werden (Talks et al., 2000).

In der vorliegenden Untersuchung wurde in 33,3% der Stenzen und in 70% der OP-Präparate eine HIF-2 α -Färbung im Tumorstroma beobachtet. Ähnlich wie bei HIF-1 α lag damit die Rate an positiven OP-Präparaten deutlich über der der Stenzen. Das mag wiederum zum einen an der kleineren Schnittfläche der Stanzbiopsien liegen, zum anderen könnte aber auch die primär systemische Therapie zu einer Anreicherung von Makrophagen im Tumor geführt haben.

Gegen erstgenannte Vermutung spricht, dass auch in einer Studie mit 139 primär operierten Patientinnen die HIF-2 α -Expression in TAMs bei 35% der Fälle lag und damit praktisch genauso hoch wie in unseren Stanzbiopsien (Leek et al., 2002).

Die beiden Therapiegruppen unterschieden sich bezüglich der Veränderung der HIF-2 α -Expression in TAMs nicht wesentlich voneinander. Dementsprechend konnte auch für CA IX, HIF-1 α und HIF-2 α in Tumorzellen kein Unterschied der Expressionsänderung zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass obwohl die beiden Therapieansätze das Tumorstromawachstum auf sehr unterschiedliche Weise hemmen, die Wirkung auf die hypoxie-induzierbaren Faktoren doch sehr ähnlich ist.

4.6. Expressionsänderung der Prognosefaktoren unter primär systemischer Therapie

4.6.1. Östrogenrezeptor

Nach primär systemischer Therapie kam es weder in der Gruppe der Chemotherapie noch in der der hormonwirksamen Therapie mit Aromataseinhibitoren zu einer Änderung der Östrogenrezeptor-Expression. Es konnte auch kein Unterschied bezüglich der Scoreveränderung zwischen den beiden Therapiegruppen festgestellt werden. Dies deckt sich mit bisherigen Untersuchungen an primär systemisch therapierten Kollektiven.

Unter primärer Chemotherapie blieb die Expression des Östrogenrezeptorproteins entweder negativ, gleich hoch oder sie nahm in gleichen Teilen zu oder ab (Daidone et al., 1995, Faneyete et al., 2003).

Unter hormonwirksamer Therapie sind die Veränderungen der ER-Expression abhängig von der Art der Therapie. Unter Tamoxifen, einem Antiöstrogen mit partiell agonistischer Wirkung, das in dem vorliegenden Kollektiv nicht in der primär systemischen Situation eingesetzt wurde, kommt es zu einer signifikanten Abnahme der ER-Expression (Makris et al., 1999, Miller et al., 2003, Dowsett et al., 2005). Werden Aromataseinhibitoren wie Letrozole oder Arimidex als primär systemische Therapie eingesetzt, lassen sich solche Veränderungen nicht finden (Diesig et al., 2002, Anderson et al., 2002, Dowsett et al., 2005).

Miller et al. fanden im direkten Vergleich von Letrozole und Tamoxifen einen signifikanten Unterschied bezüglich der ER-Score-Veränderung in den beiden Therapiegruppen mit einer deutlicheren Abnahme des Scores unter Tamoxifen ($p=0,04$) (Miller et al., 2003).

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten des Östrogenrezeptors unter den beiden hormonwirksamen Therapien ist die unterschiedliche Wirkungsweise von Tamoxifen und den Aromataseinhibitoren. Während Tamoxifen direkt am Östrogenrezeptor ansetzt und diesen kompetitiv blockiert, wirken die Aromataseinhibitoren durch Hemmung der Umwandlung von Androgenen in Östrogene in Nebenniere und Fettgewebe und senken damit den Östrogen Spiegel.

4.6.2. Progesteronrezeptor

Der Progesteronrezeptor-Score hat in der Chemotherapiegruppe kaum abgenommen, während die Fälle nach primär systemischer Hormontherapie einen Abfall des PgR-Scores zeigen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen kann mit einem $p=0,058$ aber nicht als signifikant bezeichnet werden.

Unter Chemotherapie fanden Daidone et al. zwar quantitative Veränderungen der PgR-Konzentration in 90% der Fälle, doch die Änderungen waren zu gleichen Teilen durch eine Zu- oder Abnahme der prätherapeutischen Werte gekennzeichnet (Daidone et al., 1995).

Nach primär systemischer Therapie mit Aromataseinhibitoren wurde bereits mehrfach eine Abnahme der Expression des Progesteronrezeptors beschrieben. Diesing et al. fanden in einer kleinen Untersuchung mit 17 Patientinnen lediglich eine Tendenz zu abnehmender PgR-Expression unter Letrozole oder Exemestane (Diesing et al., 2002). Anderson et al. beschrieben nach primär systemischer Gabe von Anastrozole eine Abnahme des Progesteronrezeptors in 17 von 18 Fällen (Anderson et al., 2002) und auch Miller et al. verzeichneten unter Letrozole in fast allen ursprünglich PgR-exprimierenden Karzinomen eine Abnahme im Operationspräparat. Nach primär systemischer Tamoxifentherapie wurde eher eine Zunahme der PgR-Expression beobachtet und der Gruppenunterschied war hochsignifikant ($p<0,0001$) (Miller et al., 2003). Entsprechende Veränderungen konnten auch im Vergleich von Anastrozole und Tamoxifen in einem Kollektiv von 330 Patientinnen der IMPACT-Studie beobachtet werden (Dowsett et al., 2005).

Die Abnahme der PgR-Expression unter Aromatasehemmern lässt sich durch die reduzierten Östrogenspiegel erklären. Der Progesteronrezeptor wird durch Östrogene induziert und deshalb bei niedrigen Östrogenspiegeln weniger exprimiert. Der Anstieg des Rezeptors unter Tamoxifen beruht ebenfalls auf diesem Mechanismus, da Tamoxifen eine gewisse agonistische Restaktivität besitzt (Miller et al., 2003).

4.6.3. Mib-1

Der Proliferationsmarker Mib-1 nahm in der vorliegenden Untersuchung erwartungsgemäß sowohl in der Chemotherapiegruppe als auch in der Antihormongruppe posttherapeutisch in den meisten Fällen ab. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden.

Auch Faneyete et al. stellten eine Abnahme der Proliferationsfraktion anhand von Ki67-Immunhistochemie unter einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie fest. Der Unterschied zwischen den prä- und den posttherapeutischen Biopsien war statistisch signifikant ($p=0,000053$) (Faneyete et al., 2003). Unter chemoendokriner Therapie mit Mitoxantron, Methotrexat und Tamoxifen wurde ebenfalls eine signifikante Ki-67-Reduktion beobachtet ($p=0,005$) (Makris et al., 1999), ebenso unter Letrozol oder Exemestan (Diesig et al., 2002, Miller et al., 2003, Dowsett et al., 2005) und unter Anastrozol (Anderson et al., 2002).

Interessanterweise konnte in einigen Studien ein Zusammenhang zwischen der Veränderung der Ki-67-Expression und des Ansprechens auf chemoendokrine Therapie beziehungsweise Letrozol festgestellt werden (Makris et al., 1999, Miller et al., 2003), während bei Anderson et al. und Dowsett et al. unter Anastrozol und Tamoxifen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ki-67-Abnahme und dem klinischen Ansprechen zu verzeichnen war (Anderson et al., 2002, Dowsett et al., 2005). Ein signifikanter Unterschied bezüglich des Therapieansprechens konnte in einer Untersuchung an 73 primär chemotherapierten Patientinnen festgestellt werden. Patientinnen mit einer prätherapeutisch hohen Expression von Mib-1 mit mehr als 20% positiver Tumorzellen sprachen signifikant besser auf die Therapie an als diejenigen mit einer niedrigeren Expression ($p=0,05$) (Colleoni et al., 1999).

4.6.4. p53

Die Expression des p53-Proteins nahm unter primär systemischer Therapie tendenziell ab, ohne dass ein Gruppenunterschied zwischen Chemo- und Hormontherapie zu erkennen war ($p=0,48$).

Daidone et al. untersuchten ebenfalls die Veränderung der p53-Expression unter primär systemischer Chemotherapie und konnten bei Tumoren mit mindestens 5% p53-positiven Zellen eine signifikante Abnahme der Expression verzeichnen (Daidone et al., 1995, $p=0,01$). Faneyete et al. fanden unter antrazyklinhaltiger Chemotherapie keine signifikanten Änderungen der p53-Expression, dafür waren unerwarteterweise p53-positive Fälle signifikant häufiger mit einem guten Ansprechen assoziiert (Faneyete et al., 2003, $p=0,05$). Unerwartet deshalb, weil es bisher mehrere Studien gab, die keinen prädiktiven Wert der p53-Färbung bezüglich des Ansprechens auf primär systemisch verabreichte Chemotherapeutika erkennen ließen, beziehungsweise wenn überhaupt mit einer Chemoresistenz (Übersicht in Cleator et al., 2002).

In einer Studie mit 448 Patientinnen, die primär systemisch eine dosisintensierte epirubicinhaltige Chemotherapie erhielten, war die p53-Positivität in der multivariaten Analyse mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben ($p=0,0008$) und einem kürzeren Gesamtüberleben ($p=0,002$) assoziiert (Bonnetoi et al., 2003).

Auch unter primär systemischer hormonwirksamer Therapie sind keine wesentlichen Veränderungen der p53-Expression beschrieben (Diesing et al., 2002).

Der prädiktive Wert des p53 bei endokriner Therapie ist nicht abschließend geklärt. Es existieren widersprüchliche Ergebnisse unterschiedlicher Untersuchungen und deshalb spielt p53 momentan keine prädiktive Rolle für das Ansprechen oder das Outcome in der primär systemischen Hormontherapie (Übersicht in Ring und Ellis, 2002).

4.6.5. bcl-2

Die Expression des Apoptoseinhibitors bcl-2 nahm unter primär systemischer Therapie tendenziell eher zu, ein Gruppenunterschied zwischen Chemotherapie und Hormontherapie bestand nicht. Die meisten Untersuchungen zeigen keine signifikanten Änderungen nach primär systemischer Therapie. Faneyete et al. beobachteten nach anthrazyklinhaltiger Chemotherapie in 56% der Fälle einen unveränderten bcl-2-Status, in 23% war die präoperative Biopsie negativ und das OP-Präparat positiv, in 21 % der Fälle war bcl-2 vor der Chemotherapie positiv und negativ danach (Faneyete et al., 2003). In einer kleinen Studie mit präoperativer Chemotherapie konnte dagegen ein signifikanter Anstieg der bcl-2-Expression posttherapeutisch nachgewiesen werden (Ellis et al., 1998b).

Unter chemoendokriner und endokriner Therapie wurden keine signifikanten Expressionsveränderungen beschrieben (Makris et al., 1999, Diesing et al., 2002, Miller et al., 2003).

Bezüglich des prädiktiven Wertes der bcl-2-Expression sind die Ergebnisse uneinheitlich und zum Teil widersprüchlich. Es wurde zum einen ein Trend zu einem verbesserten Ansprechen bcl-2-überexprimierender Tumoren auf primär systemische Chemotherapie beschrieben (Makris et al., 1997, $p=0,08$), zum anderen wurde beobachtet, dass bcl-2-negative Tumoren mit einer besseren Response auf primär systemische Chemotherapie assoziiert sind (Bonetti et al., 1998, $p=0,019$).

4.6.6. c-erbB-2

Eine wesentliche Änderung der c-erbB-2-Expression war in der vorliegenden Untersuchung weder unter Chemo- noch unter Hormontherapie zu beobachten. Bei Faneyete et al. blieb die Expression ebenfalls in den meisten (94%) Fällen unverändert (Faneyete et al., 2003), ebenso wenig wurde unter Aromataseinhibitoren eine signifikante Veränderung festgestellt (Diesing et al., 2002).

Es gab zahlreiche Studien mit dem Ziel den prädiktiven Wert der Her-2neu-Expression für verschiedene Chemotherapeutika zu ermitteln. Adjuvante Studien deuten darauf hin, dass Her-2neu-negative Patientinnen im Gegensatz zu Her-2neu-positiven Patientinnen von einer Chemotherapie mit Alkylantien profitieren, während eine Her-2neu-Überexpression mit einer Anthrazyklinsensibilität assoziiert ist (Übersicht in Cleator et al., 2002).

In der primär systemischen Situation fanden Gregory et al. eine Assoziation zwischen c-erbB-2-Negativität und einer kompletten Remission nach chemoendokriner Therapie (Gregory et al., 2000). Ellis et al. beobachteten, dass östrogenrezeptorpositive Patientinnen, die auch c-erbB-1 und/oder c-erbB-2 exprimierten signifikant besser auf Letrozole ansprachen als diejenigen, die weder eine c-erbB-1- noch c-erbB-2-Expression zeigten (Ellis et al., 2001). Unter wöchentlicher Gabe von Doxorubicin zeigte sich die Expression von c-erbB-2 prädiktiv für eine Chemoresistenz (Geisler et al., 2001, $p=0,041$). Auf anthrazyklinhaltige Chemotherapieschemata wiederum scheinen Her-2neu-positive Karzinome auch in der primär systemischen Situation gut anzusprechen (Wang et al., 2002).

5. Zusammenfassung

Hypoxie ist ein wesentlicher Faktor in der Entwicklung zahlreicher Tumoren, darunter auch in der des Mammakarzinoms.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die hypoxieinduzierbaren Faktoren CA IX, HIF-1 α und HIF-2 α einen prädiktiven Wert für das Ansprechen auf eine primär systemische Chemo- oder Hormontherapie haben und wie sich die Expression der genannten Faktoren unter der primär systemischen Therapie verändert.

Außerdem wurden die morphobiologischen Faktoren Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, p53, bcl-2, Ki-67 und c-erbB-2 erfasst und ihr Verhalten unter primär systemischer Therapie untersucht.

Als Grundlage diente ein Kollektiv aus 93 Mammakarzinom-Patientinnen, die primär systemisch mit einer Chemo- oder Hormontherapie behandelt wurden.

Eine CA IX-Expression wurde prätherapeutisch in 16% und posttherapeutisch in 12% der Fälle beobachtet. Für HIF-1 α stieg die Expressionsrate von 18,5% in Stanzbiopsien auf 72% der Fälle in den Operationspräparaten, für HIF-2 α von 33,3% prätherapeutisch auf 46% posttherapeutisch.

Ein Hinweis auf eine prädiktive Aussagekraft besteht für CA IX: Patientinnen, die auf die primär systemische Chemotherapie mit einer pathologischen Komplettremission reagierten, exprimierten häufiger CA IX als diejenigen ohne pathologische Komplettremission ($p=0,035$, ns wegen multiplen Testens).

Für HIF-1 α und HIF-2 α wurden keine Hinweise auf eine prädiktive Aussagekraft bei primär systemischer Therapie gewonnen.

Für den Östrogenrezeptor konnte weder unter einer Chemotherapie noch unter einer Hormontherapie eine wesentliche Änderung festgestellt werden. Der Progesteronrezeptor blieb unter Chemotherapie weitgehend unverändert, während unter Hormontherapie ein Trend zu einer Expressionsabnahme zu beobachten war. p53 nahm tendenziell unter der Therapie ab, wobei ein Gruppenunterschied nicht nachweisbar war. Die Abnahme der Expression von Ki-67 war deutlich, ohne dass ein Unterschied zwischen Chemotherapie und Hormonthe-

rapie bestand. Für bcl-2 konnte tendenziell ein Zunahme beobachtet werden, ebenfalls ohne Gruppenunterschied und die Expression von c-erbB-2 blieb in beiden Gruppen weitgehend unverändert.

Schließlich ist festzuhalten, dass CA IX möglicherweise ein prädiktiver Faktor für eine pathologische Komplettremission bei primär systemische Chemotherapie ist. Dies muss an einem größeren Kollektiv überprüft werden.

Anhang

1. Abkürzungen

AT	Adriamycin und Taxotere®
CA 9	Carboanhydrase 9 (Gen)
CA IX	Carboanhydrase IX (Protein)
CLIS	Carcinoma lobluare in situ
CHT	Chemotherapie
DCIS	duktales Carcinoma in situ
EC	Epirubicin und Cyclophosphamid
ET	Epirubicin und Taxol®
HR	Hormonrezeptor
HT	Hormontherapie
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
T _{is}	In-situ-Karzinom
MR	minor response
NC	no change
ER	Östrogenrezeptor
PR	partial response
pCR	pathologische Komplettremission
PgR	Progesteronrezeptor
PD	progressive disease

2. TNM-Klassifikation

(Spiessel et al., 1993)

- pTx Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- pT0 kein Anhalt für einen Primärtumor
- pTis Carcinoma in situ
- pT1a 0,5 cm oder weniger in der größten Ausdehnung
- pT1b mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1,0 cm in der größten Ausdehnung
- pT1c mehr als 1,0 cm, aber nicht mehr als 2,0 cm in der größten Ausdehnung
- pT2 mehr als 2,0 cm, aber nicht mehr als 5,0 cm in der größten Ausdehnung
- pT3 mehr als 5,0 cm in der größten Ausdehnung
- pT4 Tumor jeder Größe mit Brustwandinfiltration, Ödembildung, Hautulzeration und entzündliche (inflammatorische) Karzinome
-
- pNx regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- pN0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
- pN1a nur Mikrometastasen (keine größer als 0,2 cm)
- pN1bi Metastasen in 1-3 Lymphknoten, eine größer als 0,2 cm, aber alle kleiner als 2,0 cm
- pN1bii Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten, eine größer als 0,2 cm aber alle kleiner als 2,0 cm
- pN1biii Ausdehnung der Metastasen über die Lymphknotenkapsel hinaus (alle kleiner als 2,0 cm in der größten Ausdehnung)
- pN1biv Metastasen in Lymphknoten mit 2,0 cm oder mehr in der größten Ausdehnung
- pN2 Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten untereinander oder an andere Strukturen fixiert
- pN3 Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna

Ein y wird vor die pTNM-Klassifikation gestellt, wenn es sich um eine pathologische Einschätzung nach primär systemischer Therapie handelt.

3. WHO-Klassifikation der Mammakarzinome

(Stegner, 1985)

1. Nichtinvasive Veränderungen:

- intraduktale Karzinome (DCIS)
- Carcinoma lobulare in situ (CLIS)

2. Invasive Veränderungen:

- invasives duktales Karzinom mit vornehmlich intraduktaler Komponente
- invasives duktales Karzinom (ohne spezielle Differenzierung)
- invasives lobuläres Karzinom
- muzinöses Karzinom
- medulläres Karzinom
- papilläres Karzinom
- tubuläres Karzinom
- adenoid-zystisches Karzinom
- sekretorisches (juveniles) Karzinom
- apokrines Karzinom
- Karzinom mit Metaplasie:
 - o squamöser Typ
 - o Spindelzelltyp
 - o kartilaginärer und ossärer Typ
 - o gemischter Typ
- andere

3. Morbus Paget

4. Grading

(Bloom und Richardson, 1957, Elston und Ellis, 1991)

Merkmal	Kriterium	Score
Tubulusbildung	> 75%	1
	10-75%	2
	< 10%	3
Kernpleomorphie	gering	1
	mittelgradig	2
	stark	3
Mitoserate	0-10/10 HPF	1
	11-20/10 HPF	2
	> 20/10 HPF	3

Aus diesen drei Kriterien wird eine Scoresumme gebildet, die die Werte 3 bis 9 annehmen kann. Den Scoresummen sind die Differenzierungsgrade G1 bis G3 wie folgt zugeordnet.

Scoresumme	Grading	Differenzierung	Malignität
3, 4 und 5	G1	gut	gering
6 und 7	G2	mäßig	mäßig
8 und 9	G3	schlecht	hoch

5. Dako HercepTest-Score

Art der Anfärbung	Score	Einschätzung der c-erbB-2 Überexpression
Keine Färbung oder eine Membrananfärbung in weniger als 10% der Tumorzellen	0	Negativ
Schwache oder kaum sichtbare unvollständige Membrananfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen	1+	Negativ
Schwache bis mäßige vollständige Membrananfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen	2+	Schwach positiv
Starke vollständige Membrananfärbung in mehr als 10 % der Tumorzellen	3+	Stark positiv

6. Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

	Bewertung	Punkte
Prozentsatz positiver Zellen	keine positiven Kerne	0
	< 10% positive Kerne	1
	10-50% positive Kerne	2
	51-80% positive Kerne	3
	> 80% positive Kerne	4
Färbintensität	keine Färbereaktion	0
	schwache Färbereaktion	1
	mäßige Färbereaktion	2
	starke Färbereaktion	3

Der immunreaktive Score (IRS) ergibt sich aus dem Produkt der beiden Kriterien und kann die Werte 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12 annehmen (Remmele und Stegner, 1987).

Abbildungen und Tabellen

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Prinzip der EnVision [®] -Methode	22
Abbildung 2.2: Prinzip der Avidin-Biotin-Methode.....	24
Abbildung 3.1: Altersverteilung im Patientenkollektiv	29
Abbildung 3.2: Verteilung der Therapieschemata.....	34
Abbildung 3.3: Ansprechen auf die primär systemische Therapie	36
Abbildung 3.4: Invasiv duktales Mammakarzinom: Membranständige Färbung des CA IX-Proteins, mäßige Intensität.	38
Abbildung 3.5: Quantitative Änderung des CA IX-Scores vor und nach der primär systemischen Therapie.	39
Abbildung 3.6: CA IX-positive Fälle in Abhängigkeit von der Response	40
Abbildung 3.7: CA IX-Expression in den Gruppen non-pCR und pCR	41
Abbildung 3.8: Invasiv lobuläres Mammakarzinom, nukleäre Färbung des HIF-1 α -Proteins, mäßige Intensität.	43
Abbildung 3.9: Quantitative Änderung des HIF-1 α -Scores vor und nach der primär systemischen Therapie	44
Abbildung 3.10: Invasiv papilläres Mammakarzinom, nukleäre und cytoplasmatische Färbung des HIF-2 α -Proteins, schwache Intensität.....	46
Abbildung 3.11: Quantitative Änderung des HIF-2 α -Scores vor und nach der primär systemischen Therapie.	47
Abbildung 3.12: Invasiv duktales Mammakarzinom, Färbung des HIF-2 α - Proteins in Makrophagen	49
Abbildung 3.13: Quantitative Änderung des Östrogenrezeptorscores vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=45).....	50

Abbildung 3.14: Quantitative Änderung des Östrogenrezeptorscores vor und nach primär systemischer hormonwirksamer Therapie und Angabe der Perzentilen (n=27).	51
Abbildung 3.15: Quantitative Änderung des Progesteronrezeptorscores vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=44).....	53
Abbildung 3.16: Quantitative Änderung des Progesteronrezeptorscores vor und nach primär systemischer hormonwirksamer Therapie mit Angabe der Perzentilen (n=27).	54
Abbildung 3.17: Scoredifferenzen für den Progesteronrezeptorscore (n=71).....	55
Abbildung 3.18: Quantitative Änderung der Mib-1-Expression vor und nach primär systemischer Chemotherapie (n=45).....	57
Abbildung 3.19: Quantitative Änderung der Mib-1-Expression vor und nach primär systemischer Antihormontherapie (n=27).....	58
Abbildung 3.20: Quantitative Änderung der p53-Expression vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=44).....	59
Abbildung 3.21: Veränderung der p53-Expression vor und nach primär systemischer Antihormontherapie mit Angabe der Perzentilen (n=27).....	60
Abbildung 3.22: Quantitative Änderung der bcl-2-Expression vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=45).....	61
Abbildung 3.23: Quantitative Änderung der bcl-2-Expression vor und nach primär systemischer Antihormontherapie mit Angabe der Perzentilen (n=26).....	62
Abbildung 3.24: Quantitative Änderung des DakoHercep-Scores vor und nach primär systemischer Chemotherapie mit Angabe der Perzentilen (n=44).....	63
Abbildung 3.25: Quantitative Änderung des DakoHercep-Scores vor und nach primär systemischer Antihormontherapie mit Angabe der Perzentilen (n=26).....	64

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Therapieschemata für die primär systemische Therapie.....	18
Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Antikörper	25
Tabelle 2.3: Cut-off-Werte für die Auswertung der immunhisto- chemischen Färbungen.....	27
Tabelle 2.4: Einteilung des Therapieansprechens	27
Tabelle 3.1: T/N-Stadium vor der primär systemischen Therapie	30
Tabelle 3.2: T- und N-Stadium nach der primär systemischen Therapie.....	31
Tabelle 3.3: Histologie des Tumors (OP-Präparat)	32
Tabelle 3.4: Histopathologisches Grading	32
Tabelle 3.5: Prognosefaktoren in Stanzen und OP-Präparaten	33
Tabelle 3.6: Ansprechen auf die primär systemische Therapie.....	35
Tabelle 3.7: Patientinnen mit CA IX-Nachweis in Stanze und/oder OP- Präparat	38
Tabelle 3.8: Lokalisationsmaße für Mib-1	56
Tabelle 3.9: χ^2 -Test auf Unabhängigkeit von HIF-1 α , HIF-2 α und CA IX	65
Tabelle 4.1: Vergleich des Kollektivs mit Daten aus einer Feldstudie mit 3210 Patientinnen	66
Tabelle 4.2: Vergleich der Häufigkeit der histologischen Klassifikationen mit Angaben aus der Literatur	67
Tabelle 4.3: Übersicht über die Häufigkeiten histologischer Differen- zierungsgrade bei verschiedenen Untersuchern.....	67
Tabelle 4.4: Übersicht über die Verteilung der Hormonrezeptoren bei ver- schiedenen Untersuchern.	68

Literaturverzeichnis

Acker T, Plare KH (2002): A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology.

J Mol Med 80; 562-575.

Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL (2001): Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : A novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer.

Cancer Res 61; 2911-2916.

American Cancer Society (2001): Breast Cancer Facts & Figures 2001-2002. Atlanta, Georgia.

Anderson TJ, Dixon JM, Stuart M, Sahmoud T, Miller WR (2002): Effect of neoadjuvant treatment with anastrozole on tumour histology in postmenopausal women with large operable breast cancer.

Br J Cancer 87; 334-338.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002): Krebs in Deutschland.

3., erweiterte Ausgabe
Saarbrücken

Bartošová M, Parkkila S, Pohlodek K, Karttunen TJ, Galbavý Š, Mucha V, Harris AL, Pastorek J, Pastoreková (2002): Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2.

J Pathol 197; 314-321.

Bauerfeind I, von Bismark F von, Eiermann W, Harbeck N, von Koch F, Kuchenbauer F, Lebeau A, Raab G, Rutke S, Salat C, Untch M (2003): Primär systemische Therapie. In: Manual Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Tumorzentrum München, 104-110. W. Zuckerschwerdt Verlag, München, Wien, New York.

Beasley NJP, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S, Harris AL (2002): Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in head and neck cancer: Relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients.

Cancer Res 62; 2493-2497.

Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli R, Viale G, Giavazzi R, Taraboletti G (1996): The microtubule-affecting drug Paclitaxel has antiangiogenic activity.

Clin Cancer Res 2; 1843-1849.

- Bergh J, Norberg T, Sjögren S, Lindgren A, Holmberg L (1995):** Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy.
Nat Med 1; 1029-1034.
- Bevitt DJ, Milton ID, Piggot N, Henry L, Carter MJ, Toms GL, Lennard TWJ, Westley B, Angus B, Horne CH (1997):** New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry.
J Pathol 183; 228-232.
- Bilik R, Mor C, Wolloch Y, Dintsman M (1986):** Histopathologic high risk factors influencing the prognosis of patients with early breast cancer (T₁N₀M₀).
Am J Surg 151; 460-464.
- Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G (2000):** Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer.
Cancer Res 60; 4693-4696.
- Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL (2000):** Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines.
Cancer Res 60; 7106-7113.
- Bloom HJG, Richardson WW (1957):** Histological grading and prognosis in breast cancer – A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.
Br J Cancer 11; 359-377.
- Bloom HJG, Richardson WW, Harries EJ (1962):** Natural history of untreated breast cancer (1805-1933) – Comparison of untreated and treated cases according to histological grade of malignancy.
Br Med J II; 213-221.
- Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, Ferrari L, Luini A, Bartoli C, Coopmans de Yoldi G, Zucali R, Rilke F, Andreola S, Silvestrini R, Di Fronzo G, Valagussa P (1990):** Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more.
J Natl Cancer Inst 82; 1539-1545.
- Bonetti A, Zaninelli M, Leone R, Cetto GL, Pelosi G, Biolo S, Menghi A, Manfrin E, Bonetti F, Piubello Q (1998):** Bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer.
Clin Cancer Res 4; 2331-2336.

- Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Therasse P, Hamilton A, van de Vijver M, MacGrogan G, Shepherd L, Amaral N, Duval C, Drijkoningen R, Larsimont D, Piccard M (2003):** Locally advanced/inflammatory breast cancers treated with intensive epirubicin-based neoadjuvant chemotherapy: Are there molecular markers in the primary tumour that predict for 5-year clinical outcome?
Ann Oncol 14; 406-413.
- Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E (2003):** Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma.
Cancer 97; 1573-1581.
- Bos R, Zhong H, Colleen FH, Mommers ECM, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E (2001):** Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis.
J Natl Cancer Inst 93; 309-314.
- Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Brunelli A, Gorzegno G, DiMarco B, Aguggini S, Bolsi G, Cirillo F, Filippini L, Betri E, Bertoli G, Alquati P, Dogliotti L (2000):** p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients.
Clin Cancer Res 6; 2751-2758.
- Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JFR, Blamey RW, Nicholson RI (1989):** Ki67 immunostaining in primary breast cancer: Pathological and clinical associations.
Br J Cancer 59; 943-947.
- Brenner H (2002):** Long-term survival rates of cancer patients achieved by the end of the 20th century: A period analysis.
Lancet 360; 1131-1135.
- Briffod M, Hacène K, Le Doussal V (2000):** Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases.
Mod Pathol 13; 841-850.
- Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW (1996):** Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma.
Cancer Res 56; 941-943.

- Brown JM, Giaccia AJ (1998):** The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58; 1408-1416.
- Carter CL, Allen C, Henson DE (1988):** Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer* 63; 181-187.
- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992):** Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168; 357-363.
- Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, Gatter K, Ratcliffe P, Harris AL (2001):** Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 19; 3660-3668.
- Chollet P, Amat S, Cure H, de Latour M, Le Bouedec G, Mournet-Reynier M-A, Ferriere L-P, Dauplat J, Penault-Llorca F (2002):** Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer. *Br J Cancer* 86; 1041-1046.
- Cleator S, Parton M, Dowsett M (2002):** The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Endocr Rel Cancer* 9; 183-195.
- Colleoni M, Orvieto E, Nolé F, Orlando L, Minchella I, Viale G, Peruzzotti G, Robertson C, Noberasco C, Galimberti V, Sacchini V, Veronesi P, Zurrida S, Orecchia R, Goldhirsch A (1999):** Prediction of response to primary chemotherapy for operable breast cancer. *Eur J Cancer* 35; 574-579.
- Daidone MG, Luisi A, Veneroni S, Benini E, Silvestrini R (1999):** Clinical studies of bcl-2 and treatment benefit in breast cancer patients. *Endocr Rel Cancer* 6; 61-68.
- Dales JP, Garcia S, Meunier-Carpentier S, Andrac-Meyer L, Haddad O, Lavaut MN, Allasia C, Bonnier P, Charpin C (2005):** Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1 α predicts early relapse in breast cancer: Retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer – Online-Publikation vor dem Druck*

Diesig D, Krainick U, Fersis N, Vogel U, Siegmann K, Schwabe R, Wallwiener D, Huober J (2002): Neoadjuvant endocrine therapy (NET) in postmenopausal patients with hormone receptor positive breast cancer: Changes in immunohistochemistry.

ASCO, Abstr. No. 2057.

Dixon JM, Love CDB, Bellamy COC, Cameron DA, Leonard RCF, Smith H, Miller WR (2001): Letrozole as primary medical therapy for locally advanced and large operable breast cancer.

Breast Cancer Res Treat 66; 191-199.

Dixon JM, Renshaw L, Bellamy C, Stuart M, Hochtin-Boes G, Miller WR (2000): The effects of neoadjuvant anastrozole (Arimidex) on tumor volume in postmenopausal women with breast cancer: A randomized, double-blind, single-center study.

Clin Cancer Res 6; 2229-2235.

Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, Boeddinghaus I, Salter J, Detre S, Hills M, Ashley S, Francis S, Walsh G, Smith IE (2005): Biomarker changes during neoadjuvant Anastrozole, Tamoxifen or the combination: Influence of hormonal status and HER-2 in breast cancer – A study from the IMPACT trialists.

J Clin Oncol 23; 2477-2492.

Duncan W, Kerr GR (1976): The curability of breast cancer.

Br Med J II; 781-783.

Ellis MJ (2001): Neoadjuvant endocrine therapy for breast cancer: Medical perspectives.

Clin Cancer Res 7; 4388s-4391s.

Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Jänicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M (2001): Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than Tamoxifen for erbB-1- and/or erbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: Evidence from a phase III randomized trial.

J Clin Oncol 19; 3808-3816.

Ellis PA, Smith IE, Detre S, Burton SA, Salter J, A'Hern R, Walsh G, Johnston SR, Dowsett M (1998): Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy.

Breast Cancer Res Treat 48, 107-16.

Elston CW, Ellis IO (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; 403-410.

Engel J, Hölzel D, Kerr J, Schubert-Fritschle G (2003): Epidemiologie. In: *Manual Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, Tumorzentrum München, 1-11. W. Zuckerschwerdt Verlag, München, Wien, New York.

Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van de Vijver MJ (2003): Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: Predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer* 88; 406-412.

Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB, Fisher ER, Wickerham DL, Wolmark N, DeCillis A, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV (1997): Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: Findings from national surgical adjuvant breast and bowel project B-18. *J Clin Oncol* 15; 2483-2493.

Fisher B, Bryant J, Wolmark N, Mamounas E, Brown A, Fisher ER, Wickerham DL, Begovic M, DeCillis A, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV, Bear H (1998): Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 16; 2672-2685.

Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B (1993): Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project protocol B-06. *Cancer* 71; 2507-2514.

Folkman J (1995): Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333; 1757-1763.

Forouhi P, Walsh JS, Anderson TJ, Chetty U (1994): Ultrasonography as a method of measuring breast tumour size and monitoring response to primary systemic treatment. *Br J Surg* 81; 223-225.

Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnson H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL (2001): Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 61; 2505-2512.

- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, 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; 1710-1715.
- Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Porta VG, Semiglazov V, Garcia-Conde J, Zambetti M, Valagussa P, Bonadonna G, for the ECTO Study Group, Milano, Italy (2002):** First report of the European Cooperative Trial in operable breast cancer (ECTO): Effects of primary systemic therapy (PST) on local-regional disease.
Proc ASCO 21; abstr 132.
- Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL (2001):** Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer.
Cancer Res 61; 7992-7998.
- Goonewardene TI, Sowter HM, Harris AL (2002):** Hypoxia-induced pathways in breast cancer.
Microsc Res Tech 59; 41-48.
- Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA (1953):** The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy.
Br J Radiol 26; 638-648.
- Gregory RK, Powles TJ, Salter J, Chang JC, Ashley S, Dowsett M (2000):** Prognostic relevance of *cerbB2* expression following neoadjuvant chemotherapy in patients in a randomised trial of neoadjuvant versus adjuvant chemoendocrine therapy.
Breast Cancer Res Treat 59; 171-175.
- Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, Djonov V (2004):** Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: An independent prognostic parameter?
Breast Cancer Res 6; R191-R198.
- Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, Altman DG (1991):** C-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes.
Br J Cancer 63; 434-438.

Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Abazhagan R, Styles J, Rudenstam C-M, Golouh R, Martinez-Tello F, Tiltman A, Torhorst J, Grigolato P, Bettelheim R, Neville AM, Bürki K, Castiglione M, Collins J, Lindtner J, Senn H-J (1992): Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer.

J Clin Oncol 10; 1049-1056.

Höckel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schäffer U, Vaupel P (1996): Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the cervix.

Cancer Res 56; 4509-5415.

Horne GM, Anderson JJ, Tiniakos DG, McIntosh GG, Thomas MD, Angus B, Henry JA, Lennard TWJ, Horne CHW (1996): p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma: A comparison of four antibodies for immunohistochemistry.

Br J Cancer 73; 29-35.

Høst H, Eiliv L (1986): Age as a prognostic factor in breast cancer.

Cancer 57; 2217-2221.

Hui EP, Chan ATC, Pezzella F, Turley H, To K, Poon TCW, Zee B, Mo F, Teo PML, Huang DP, Gatter KC, Johnson PJ, Harris AL (2002): Coexpression of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α , carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival.

Clin Cancer Res 8; 2595-2604.

Ivanov S, Liao S-Y, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ (2001): Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer.

Am J Pathol 158; 905-919.

Jiang B-H, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996a): Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1.

J Biol Chem 271; 17771-17778.

Jiang B-H, Semenza GL, Bauer C, Marti HM (1996b): Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiological relevant range of O₂ tension.

Am J Physiol 271C; 1172-1180.

Kaluzová M, Pastoreková S, Svastová E, Pastorek J, Stanbridge EJ, Kaluz S (2001): Characterization of the MN/CA 9 promoter proximal region: A role for specificity protein (SP) and activator protein 1 (AP1) factors. *Biochem J* 359; 669-677.

Keen JC, Davidson NE (2002): The biology of breast carcinoma. *Cancer Supplement* 97; 825-833.

Knight W, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL (1977): Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 37; 4669-4671.

Koepfen HKW, Wright BD, Burt AD, Quirke P, McNicol AM, Dybdal NO, Sliwowski MX, Hillan KJ (2001): Overexpression of HER2/neu in solid tumours: An immunohistochemical survey. *Histopathology* 38; 96-104.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, Gatter KC, Harris AL (2002): Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53; 1192-1202.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Patorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL (2001): Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 7; 3399-3403.

Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, Frenkel V, Robertson S, Ionov Y, Yamamoto H, Peruchó M, Takayama S, Reed JC (1999): Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Rel Cancer* 6; 29-40.

Kreienberg R, Volm T, Möbus V, Alt D (Hrsg.) (2002): Management des Mammakarzinoms: Ein Leitfaden für die Praxis. 2., vollst. überarb. und erw. Auflage
Springer-Verlag – Berlin, Heidelberg, New York

Kuerer HM, Hunt KK, Newman LA, Ross MI, Ames FC, Singletary SE (2000): Neoadjuvant chemotherapy in women with invasive breast carcinoma: Conceptual basis and fundamental surgical issues. *J Am Coll Surg* 190; 350-363.

Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H (2001): Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells.
Jpn J Cancer Res 92; 1093-1101.

Lane DP (1992): p53, guardian of the genome.
Nature 358; 15-16.

Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M (1989): Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR) – An improved score modification based on a multivariant analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas.
Cancer 64: 1914-1921.

Lebeau A, Nathrath W, Permanetter W (2003): Pathomorphologie des Mammakarzinoms. In: Manual Mammakarzinome – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge, Tumorzentrum München, 1-11.
W. Zuckerschwerdt Verlag, München, Wien, New York.

Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE (1999): Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast.
Br J Cancer 79; 991-995.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996): Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma.
Cancer Res 56; 4625-4629.

Leek RD, Talks KL, Pezzella F, Turley H, Campo L, Brown NS, Bicknell R, Taylor M, Gatter KC, Harris AL (2002): Relation of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and oxidative thymidine phosphorylase pathway in human breast cancer.
Cancer Res 62, 1326-1329.

Leyland-Jones B (2002): Trastuzumab: Hopes and realities.
Lancet Oncol 3; 137-144.

Liao SY, Brewer C, Závada J, Pastorek J, Pastorekova S, Manetta A, Berman ML, DiSaia PJ, Stanbridge EJ (1994): Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas.
Am J Pathol 145; 598-609.

- Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ, West CML (2001):** Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: Correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix.
Cancer Res 61; 6394-6399.
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T (1994):** p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo.
Science 266; 807-810.
- Makris A, Powles TJ, Dowsett M, Osborne CK, Trott PA, Fernando IN, Ashley SE, Ormerod MG, Titley JC, Gregory RK, Allred DC (1997):** Prediction of response to neoadjuvant chemoendocrine therapy in primary breast carcinomas.
Clin Cancer Res 3; 593-600.
- Makris A, Powles TJ, Kakolyris S, Dowsett M, Ashley SE, Harris AL (1999):** Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma.
Cancer 85; 1996-2000.
- Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH, Kay RG (1983):** Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer.
Cancer Res 43; 2985-2990.
- Miller WR, Dixon JM, Macfarlane L, Cameron D, Anderson TJ (2003):** Pathological features of breast cancer response following neoadjuvant treatment with either letrozole or tamoxifen.
Eur J Cancer 39; 462-468.
- Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, Gibadulinová A, Stanbridge EJ, Závada J, Kettmann R, Pastorek J (1996):** Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: Structure and exon to protein domain relationships.
Genomics 33; 480-487.
- Paik S, Bryant J, Park C, Fisher B, Tan-Chiu E, Hyams D, Fisher ER, Lippman ME, Wickerham DL, Wolmark N (1998):** ErbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer.
J Natl Cancer Inst 90; 1361-1370.

- Pastorek J, Pastoreková S, Callebaut I, Mornon JP, Zelník V, Opavský R, Zat'ovičová M, Liao S, Portetelle D, Stanbridge EJ, Závada J, Burny A, Kettmann R (1994):** Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and putative helix-loop-helix DNA binding segment.
Oncogene 9; 2877-2888.
- Pastoreková S, Parkkila S, Parkkila A-K, Opavský R, Zelník V, Saarnio J, Pastorek J (1997):** Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: Analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts.
Gastroenterology 112; 398-408.
- Piccart M, Lohrisch C, Di Leo A, Larsimont D (2001):** The predictive value of HER2 in breast cancer.
Oncology 61 (suppl 2); 73-82.
- Potter CPS, Harris AL (2003):** Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer.
Br J Cancer 89; 2-7.
- Rafajová M, Zatovicová M, Kettmann R, Pastorek J, Pastoreková S (2004):** Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells.
Int J Oncol 24; 995-1004.
- Remmele W, Stegner HE (1987):** Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe.
Pathologie 8: 138-140.
- Ring AE, Ellis PA (2002):** Predictors of response to systemic therapy in breast cancer.
Forum (Genova) 12; 19-32.
- Rochefordiere A de la, Asselain B, Campana F, Scholl SM, Fenton J, Vilcoq JR, Durand J-C, Pouillart P, Magdelenat H, Fourquet A (1993):** Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma.
Lancet 341; 1039-1043.
- Saarnio J, Parkkila S, Parkkila A-K, Haukipuro K, Pastoreková S, Pastorek J, Kairaluoma MI, Karttunen TJ (1998):** Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation.
Am J Pathol 153; 279-285.

Salceda S, Caro J (1997): Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions.

J Biol Chem 272; 22642-22647.

Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G, and the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (2002): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer.

Clin Cancer Res 8; 1831-1837.

Semenza GL (1999): Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1.

Annu Rev Cell Dev Biol 15; 551-578.

Semenza GL (2000): HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch.

Cancer Metastasis Rev 19; 59-65.

Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI, for the Tumor and Angiogenesis Research Group (2002): Association of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma.

Cancer 95; 1055-1063.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.

N Engl J Med 344; 783-792.

Sly W, Hu PY (1995): Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies.

Annu Rev Biochem 64:375-401.

Sowter HM, Raval R, Moore J, Ratcliffe PJ, Harris AL (2003): Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1 α versus Hif-2 α in regulation of their transcriptional response to hypoxia.

Cancer Res 63; 6130-6134.

Span PN, Bussink J, Manders P, Beex LVAM, Sweep CGJ (2003): Carbonic anhydrase-9 expression levels and prognosis in human breast cancer: association with treatment outcome.

Br J Cancer 89; 271-276.

Spiessl B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O, Sobin LH, Wagner G (Hrsg) (1993): TNM-Atlas.

3. Auflage

Springer-Verlag – Berlin, Heidelberg, New York.

Sutter CH, Laughner E, Semenza GL (2000): Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations.

Proc Natl Acad Sci USA 97; 4748-4753.

Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, Taub N, Harris AL, O'Byrne KJ (2003): Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer.

J Clin Oncol 21; 473-482.

Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000): The Expression and Distribution of the Hypoxia-inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α in Normal Human Tissues, Cancers and Tumor-associated Macrophages.

Am J Pathol 157 (2); 411-421.

Thames HD, Peterson C, Peterson S, Nieder C, Baumann M (2002): Immunohistochemically detected p53 mutations in epithelial tumors and results of treatment with chemotherapy and radiotherapy – A treatment-specific overview of the clinical data.

Stahlether Onkol 8; 411-421.

Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB, Mouridsen HT, Bayer T, Keiding N on behalf of the Danish Breast Cancer Cooperative Group (1987): Prognostic value of steroid hormone receptors: Multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer.

Cancer Res 47; 6126-6133.

van der Hage JA, van der Velde CJH, Julien J-P, Tubiana-Hulin M, Vandervelden C, Duchateau L (2001): Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: Results from the european organization for research and treatment of cancer trial 10902.

J Clin Oncol 19; 4224-4237.

Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel (1991): Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements.

Cancer Res 51; 3316-3322.

Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, van Tinteren H, Harris AL, van Diest PJ, van der Wall E (2005): Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 α expression in invasive breast cancer.

J Clin Pathol 58; 172-177.

Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.

Proc Natl Acad Sci USA 92; 5510-5514.

Wang J, Buchholz TA, Middleton LP, Allred DC, Tucker SL, Kuerer HM, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA (2002): Assessment of histologic features and expression of biomarkers in predicting pathologic response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma.

Cancer 94; 3107-3114.

Watson PH, Chia SK, Wykoff CC, Han C, Leek RD, Sly WS, Gatter KC, Ratcliffe P, Harris AL (2003): Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma.

Br J Cancer 88; 1065-1070.

Wiesener MS, Turley H, Allan WE, William C, Eckardt K-U, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (1998): Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: Characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α .

Blood 92, 2260-2268.

Winstanley J, Cooke T, Murray GD, Platt-Higgins A, George WD, Holt S, Myskov M, Spedding A, Barraclough BR, Rudland PS (1991): The long term prognostic significance of c-erbB-2 in primary breast cancer.

Br J Cancer 63; 447-450.

Wulf K-H, Schmid-Matthiesen (Hrsg.) (1996): Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Band 12, Spezielle gynäkologische Onkologie II.

3. Auflage 1996

Urban & Schwarzenberg, München – Wien – Baltimore

Wykoff CC, Beasley N, Watson PH, Campo L, Chia SK, English R, Pastorek J, Sly WS, Ratcliffe P, Harris AL (2001): Expression of hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast.

Am J of Pathol 158; 1011-1019.

Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000): Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases.

Cancer Res 60; 7075-7083.

Yang E, Korsmeyer SJ (1996): Molecular thanatopsis: A discourse on the bcl-2 family and cell death.

Blood 88; 386-401.

Závada J, Zavadová Z, Pastoreková S, Čiampor F, Pastorek J, Zelník V (1993): Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and clinical specimens.

Int J Cancer 54; 268-274.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in common human cancers and their metastases.

Cancer Res 59; 5830-5835.

Danksagung

Ich danke

allen voran Dr. med. Brigitte Smyczek-Gargya für ihre unermüdliche und umfassende Unterstützung und Hilfe, die sie mir während der gesamten Zeit zuteil werden ließ. Ohne ihre Motivation wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

meinem Doktorvater PD Dr. med. Nikos Fersis für die Auswahl und Überlassung des interessanten Themas und für die Korrektur der Arbeit.

Dr. med. Ulrich Vogel für die Einführung in die Pathologie des Mammakarzinoms und in die Kunst der immunhistochemischen Färbungen. Ihm ist es zu verdanken, dass eine Vielzahl technischer Probleme gelöst werden konnte.

Prof. Dr. Adrian L. Harris und Dr. Stephen Fox für die Überlassung der Antikörper und ihre Hilfestellung bei deren Anwendung.

Elisabeta Gagulic und Perikles Kosmidis für ihre Hilfe bei der Auswahl und Färbung der sehr zahlreichen Präparate.

Dr. Hans-Peter Dürr für die ausführliche Beratung und Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Tilmann Rossow für seine Hilfe bei allen Computerfragen und vor allem für seinen moralischen Beistand.

und schließlich meinen Eltern, die immer für mich da sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anja Ingrid Schönfelder
Geburtstag	21. Februar 1979
Geburtsort	Weiden in der Oberpfalz
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. Georg Schönfelder Angelika Schönfelder

Schulbildung

1985 - 1989	Grundschule Tiefenbronn
1989 - 1998	Theodor-Heuss-Gymnasium Pforzheim
Juni 1998	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

Oktober 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 2000	Ärztliche Vorprüfung
August 2001	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
2001 - 2002	Famulaturen in den Fächern Gynäkologie, Innere Medizin und Anästhesie, davon 5 Wochen am Victoria Hospital in Kirkcaldy, Großbritannien
April 2004	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
April 2004 - März 2005	Praktisches Jahr an den Kreiskliniken Reutlingen, Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe
28. April 2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
seit Juni 2005	Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Kreiskliniken Reutlingen