

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

**Expressionsanalyse von Hormonrezeptor-Isoformen
bei neoadjuvant behandelten Mammakarzinom-
Patientinnen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Martin Kurt Friedrich Wurster

aus

Freudenstadt

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. E. Solomayer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Schwarz

Für meine Familie

1. Einleitung	- 1 -
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	- 1 -
1.2 Hormonrezeptoren und ihre Isoformen	- 1 -
1.2.1 Signalkaskade der Östrogenrezeptoren	- 2 -
1.2.2 Östrogenrezeptor α und Östrogenrezeptor β	- 2 -
1.2.3 Östrogenrezeptor β Isoformen	- 4 -
1.2.4 Interaktion der Hormonrezeptoren	- 5 -
1.2.5 Östrogenrezeptoren und Mammakarzinom	- 6 -
1.2.6 Progesteronrezeptoren	- 7 -
1.4 Therapie des Mammakarzinoms	- 8 -
1.5 Prädiktive Faktoren	- 9 -
1.6 Zielsetzung der Arbeit	- 11 -
2. Material und Methoden	- 13 -
2.1 Materialien	- 13 -
2.1.1 Chemikalien	- 13 -
2.1.2 Reagenziensets (Kits)	- 13 -
2.1.3 Antikörper	- 14 -
2.1.4 Puffer und Lösungen	- 15 -
2.1.5 Geräte	- 15 -
2.1.6 Sonstiges	- 16 -
2.2 Methoden	- 16 -
2.2.1 Patienten	- 16 -
2.2.2 Gewebegewinnung	- 18 -
2.2.3 Herstellung der <i>Tissue Microarrays</i>	- 18 -
2.2.4 Hämatoxylin/Eosin Färbung	- 20 -
2.2.5 Prinzip der Immunhistochemie	- 21 -
2.2.6 Vorbereitung der Schnitte	- 22 -
2.2.7 Immunfärbung	- 23 -
2.2.8 Auswertung	- 28 -
3. Ergebnisse	- 32 -
3.1 Studiendesign	- 32 -
3.2 Übersicht über die Gliederung der Ergebnisse	- 33 -

3.3	Östrogenrezeptor α	- 34 -
3.3.1	Immunhistochemie und IRS.....	- 34 -
3.3.2	Hormonrezeptor-Koexpression.....	- 35 -
3.3.3	Östrogenrezeptor α und Proliferation.....	- 35 -
3.3.4	Änderung der ER α -Expression.....	- 36 -
3.3.5	ER α -Expression und Therapieansprechen.....	- 36 -
3.3.6	Änderung der ER α -Expression und Therapieansprechen.....	- 37 -
3.4	Östrogenrezeptor β gesamt	- 37 -
3.4.1	Immunhistochemie und IR-Score.....	- 37 -
3.4.2	Hormonrezeptor-Koexpression.....	- 38 -
3.4.3	ER β gesamt-Expression und Proliferation.....	- 38 -
3.4.4	Änderung der ER β gesamt-Expression.....	- 39 -
3.4.5	ER β gesamt-Expression und Therapieansprechen.....	- 40 -
3.4.6	Änderung der ER β g-Expression und Therapieansprechen.....	- 41 -
3.5	Östrogenrezeptor β1	- 41 -
3.5.1	Immunhistochemie und IR-Score.....	- 41 -
3.5.2	Hormonrezeptor-Koexpression.....	- 42 -
3.5.3	ER β 1-Expression und Proliferation.....	- 42 -
3.5.4	Änderung der ER β 1-Expression.....	- 42 -
3.5.5	ER β 1-Expression / ER β 1-Änderung und <i>Response</i>	- 43 -
3.6	Östrogenrezeptor β2	- 43 -
3.6.1	Immunhistochemie und IRS.....	- 43 -
3.6.2	Hormonrezeptor-Koexpression.....	- 43 -
3.6.3	ER β 2-Expression und Proliferation.....	- 43 -
3.6.4	Änderung der ER β 2-Expression.....	- 45 -
3.6.5	ER β 2-Expression und Therapieansprechen.....	- 45 -
3.6.6	Änderung der ER β 2-Expression und Therapieansprechen.....	- 46 -
3.7	Progesteronrezeptor	- 48 -
3.7.1	Immunhistochemie und IRS.....	- 48 -
3.7.2	Hormonrezeptor-Koexpression.....	- 48 -
3.7.3	PgR-Expression und Proliferation.....	- 48 -
3.7.4	Änderung der PgR-Expression.....	- 48 -

3.7.5	PgR-Expression / PgR-Expressionsänderung und <i>Response</i>	- 49 -
3.8	Übersichtsabbildungen	- 50 -
3.9	Expressionsprofile von <i>Respondern</i> und <i>Nonrespondern</i>	- 52 -
3.9.1	Chemotherapie-Gruppe	- 52 -
3.9.2	Expressionsanalyse getrennt nach der Therapie	- 53 -
4.	Diskussion	- 56 -
4.1	Einordnung des Projekts	- 56 -
4.2	Östrogenrezeptor α	- 56 -
4.2.1	Immunhistochemie und Hormonrezeptor-Koexpression	- 56 -
4.2.2	ER α -Expression und Proliferation	- 56 -
4.2.3	ER α -Entwicklung im Therapieverlauf	- 57 -
4.2.4	ER α als prädiktiver Wert	- 58 -
4.3	Östrogenrezeptor β gesamt	- 60 -
4.3.1	Immunhistochemie und Hormonrezeptor-Koexpression	- 60 -
4.3.2	ER β gesamt-Expression und Proliferation	- 60 -
4.3.3	ER β gesamt-Entwicklung im Therapieverlauf	- 61 -
4.3.4	ER β gesamt als prädiktiver Wert	- 61 -
4.4	Östrogenrezeptor $\beta 1$	- 62 -
4.4.1	ER $\beta 1$ -Expression und Proliferation	- 62 -
4.4.2	ER $\beta 1$ -Entwicklung im Verlauf der Therapie	- 63 -
4.4.3	Prädiktive Eigenschaften von ER $\beta 1$	- 63 -
4.5	Östrogenrezeptor $\beta 2$	- 64 -
4.5.1	ER $\beta 2$ -Expression und Proliferation	- 64 -
4.5.2	ER $\beta 2$ -Entwicklung im Therapieverlauf	- 64 -
4.5.3	ER $\beta 2$ als prädiktiver Wert	- 65 -
4.6	Progesteronrezeptor	- 67 -
4.6.1	PgR-Expression und Proliferation	- 67 -
4.6.2	Änderung der PgR-Expression im Therapieverlauf	- 67 -
4.6.3	PgR als prädiktiver Wert	- 68 -
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	- 69 -
5.	Zusammenfassung	- 71 -
6.	Verzeichnisse	- 73 -

6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	- 73 -
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	- 76 -
6.3	Tabellenverzeichnis.....	- 77 -
6.4	Literaturverzeichnis.....	- 78 -
7.	Anhang	- 89 -

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit jährlich 1,2 Millionen Neuerkrankungen weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau (Katalanic *et al.*, 2006). In Deutschland wurde für das Jahr 2002 eine Inzidenz von 55.000 und eine Mortalität von 18.000 ermittelt (GEKID, 2006). Damit ist Brustkrebs deutschlandweit die häufigste Krebserkrankung und die häufigste Krebstodesursache der Frau. Das mittlere Lebenszeitrisko liegt zwischen 9 % und 10 %. Statistisch gesehen erkrankt also jede zehnte bis elfte Frau im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom (Giersiepen *et al.*, 2005).

Die Entwicklungen von Inzidenz und Mortalität weisen in den letzten Jahren charakteristische Veränderungen auf. So zeigt die Zahl der Neuerkrankungen seit 1970 eine kontinuierliche Zunahme um ca. 2,5 % pro Jahr, wohingegen die Sterblichkeit seit 1995 einen leicht rückläufigen Trend erkennen lässt (GEKID, 2006).

Der Entstehung des Mammakarzinoms liegen unterschiedliche Ursachen zu Grunde. Man geht davon aus, dass 90-95 % spontan entstehen und 5-10 % hereditären Ursprungs sind (Honrado *et al.*, 2005).

1.2 Hormonrezeptoren und ihre Isoformen

Die weibliche Brustdrüse gehört zu den Organen, deren Wachstum und Entwicklung durch Hormone reguliert werden. So unterliegt beispielsweise das Wachstum in Pubertät und Schwangerschaft hormonellen Einflüssen (Saji *et al.*, 2000; Sternlicht *et al.*, 2006). Für die Signaltransduktion in der Zelle sind die entsprechenden Hormonrezeptoren notwendig. In der Brustdrüse sind dabei Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren von großer Bedeutung.

Diese beiden Gruppen von Rezeptoren gehören zur „*nuclear receptor superfamily*“ und funktionieren intrazellulär als liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren (Tsai & O'Malley, 1994).

1.2.1 Signalkaskade der Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren liegen im inaktiven Zustand als Monomere im Zytoplasma oder im Zellkern vor. Nach Aktivierung durch Ligandenbindung durchlaufen sie eine Konformationsänderung wodurch die Bildung von Hormonrezeptor-Dimeren ermöglicht wird (Tsai & O'Malley *et al.*, 1994). Dieser Rezeptor-Liganden-Komplex kann im Zellkern am Östrogen-Response-Element (ERE) direkt an die DNA binden und so die Transkription ERE-regulierter Gene steuern (Tsai & O'Malley, 1994) (siehe Abb. 1). Alternativ dazu ist der Komplex auch in der Lage, mit Proteinen zu interagieren, die an anderen Signalkaskaden beteiligt sind. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion mit den Proteinen Fos und Jun und die durch sie induzierte Aktivierung der Aktivator-Protein 1 (AP-1) Kaskade (Speirs *et al.*, 2000) (siehe Abb. 1).

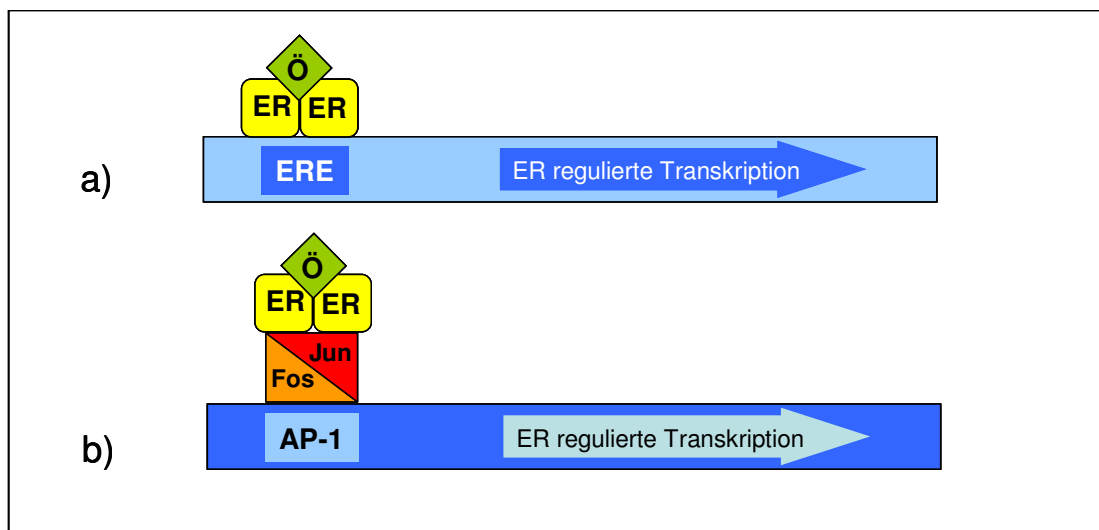


Abb. 1: Zwei Modelle für die ER-Signalkaskade

a) Klassischer Weg über das Östrogen-Response-Element (ERE). b) Alternativer Weg über das Aktivator-Protein 1 (AP-1) Element. Die Rezeptoren werden durch ligandeninduzierte Konformationsänderung aktiviert.

Abkürzungen: ER = Östrogenrezeptor, ERE = Estrogen-Response-Element, AP-1 = Aktivator-Protein 1, Ö = Östrogen (verändert nach Speirs *et al.*, 2000).

1.2.2 Östrogenrezeptor α und Östrogenrezeptor β

Bereits 1966 wurde ein Protein entdeckt, das als Östrogenrezeptor identifiziert werden konnte (Toft *et al.*, 1966). Dieser war und ist Gegenstand intensiver Forschung. 1986 wurde die Sequenz des Proteins (Greene *et al.*, 1986) und

zwei Jahre später die des vollständigen Gens ermittelt (Ponglikitmongkol *et al.*, 1988). Lange Zeit ging man von der Existenz lediglich eines Östrogenrezeptors aus. Diese Annahme wurde 1996 durch die Entdeckung eines weiteren Rezeptors korrigiert, der als Östrogenrezeptor β (ER β) bezeichnet wird. Seither wird der zuerst entdeckte Rezeptor ER α genannt. ER β konnte zuerst bei der Ratte (Kuiper *et al.*, 1996) und später auch beim Menschen identifiziert werden (Mosselman *et al.*, 1996; Dotzlaw *et al.*, 1997). Von ER α und ER β sind heute jeweils diverse Isoformen bekannt.

Die Proteine der beiden Rezeptoren weisen gewisse Ähnlichkeiten in ihrer Struktur auf, wie sie für die „*nuclear receptor superfamily*“ charakteristisch sind. Sie bestehen aus sechs funktionellen Domänen, die mit A bis F bezeichnet werden (Speirs *et al.*, 2000) (siehe Abb. 2).

ER α	1	185	251	355	549	595	
	H ₂ N-	TAF-1	DNA	Hinge	Ligand	TAF-2	-COOH
ER β	1	104	170	259	455	485	
Domäne		A/B	C	D	E	F	
Homologie		17,5%	96%	30%	59%	18%	

Abb. 2: Die Strukturdomänen von ER α und ER β

Die Domänen werden mit den Buchstaben A bis F bezeichnet. Unterhalb der Domänen sind die dazu gehörenden Homologien von ER α und ER β in Prozent angegeben. Die Zahlen über und unter der Rezeptordarstellung geben die Aminosäure-Positionen wieder.

Abkürzungen: ER α = Östrogenrezeptor α , ER β = Östrogenrezeptor β , TAF-1/-2 = Bindungsstelle der Transkriptions-Aktivierungs-Faktoren, DNA = DNA-Bindungsstelle, Ligand = Liganden-Bindungsstelle (verändert nach Speirs *et al.*, 2000 und Balfe *et al.*, 2004 a).

Die Domäne A/B beinhaltet eine ligandenunabhängige Bindungsstelle für Transkriptions-Aktivierungs-Faktoren (TAF-1). An TAF-1 schließt sich eine DNA-Bindungsstelle an, welche als Domäne C bezeichnet wird. Diese besteht aus zwei Zink-Finger-Strukturen und ist entscheidend für die Interaktion mit der DNA und für die Dimerisierung der Hormonrezeptoren. Die Domäne D ist eine

variable „*hinge*“-Region, die für Konformationsänderungen des Proteins von Bedeutung ist. Die Bindungsstelle rezeptorspezifischer Liganden ist in Domäne E lokalisiert (Tsai & O'Malley, 1994). Am C-terminalen Ende in Domäne F befindet sich eine weitere Bindungsstelle für Transkriptions-Aktivierungs-Faktoren (TAF-2). Ihre Funktion ist jedoch im Gegensatz zu TAF-1 liganden-abhängig.

Die beiden Östrogenrezeptoren sind in 47 % ihrer Proteinsequenz identisch (Enmark *et al.*, 1997), wobei sich der Anteil an übereinstimmenden Aminosäuren von Domäne zu Domäne unterscheidet. So weisen die Domänen C und E von Östrogenrezeptor α und Östrogenrezeptor β eine große Ähnlichkeit auf, wohingegen sich die Regionen A/B, D und F deutlich unterscheiden (Speirs *et al.*, 2000).

1.2.3 Östrogenrezeptor β Isoformen

Das Gen für Östrogenrezeptor β ist auf Chromosom 14 lokalisiert und besteht aus acht Exons (Enmark *et al.*, 1997). Die wichtigsten heute bekannten Isoformen sind ER β 1 (Wildtyp), ER β 2 (identisch mit ER β cx), ER β 3, ER β 4, ER β 5, ER β Δ 5, ER β 5/6 und ER β 6. Diese Rezeptoren unterscheiden sich vor allem im Bereich des C-Terminus. Sie weisen im menschlichen Brustgewebe unterschiedliche Verteilungsmuster auf, wobei nur wenig über ihre biologische Funktion bekannt ist (Vladusic *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 2002; Poola *et al.*, 2002). Die bisherige Erkenntnis über die Verteilung und Funktion der ER β Isoformen stützt sich in erster Linie auf Untersuchungen der mRNA-Expression. Als Protein konnten bislang nur die Östrogenrezeptoren β 1 und β 2 nachgewiesen werden (Palmieri *et al.*, 2002).

Der Östrogenrezeptor β 1 hat eine Länge von 530 Aminosäuren (Bhat *et al.*, 1998). Er weist eine vergleichbare Affinität zu Östrogen auf wie ER α (Kuiper *et al.*, 1997) und aktiviert östrogenabhängig die Transkription von Genen (Balfe *et al.*, 2004 b).

Von den ER β -Isoformen wurde ER β 2 bisher am intensivsten untersucht. Er hat im Vergleich zu ER β 1 ein verkürztes C-terminales Ende und ein verändertes

achtes Exon, das zusätzlich 26 Aminosäuren enthält. Der Östrogenrezeptor $\beta 2$ hat keine messbare Affinität zu 17β -Östradiol. Er ist daher ohne die Interaktion mit anderen Isoformen kein durch Östrogene regulierter Transkriptionsfaktor (Ogawa *et al.*, 1998).

1.2.4 Interaktion der Hormonrezeptoren

Um als Transkriptionsfaktoren zu fungieren, müssen die Östrogenrezeptoren Dimere bilden. So können entweder α/β -Homodimere oder $\alpha\beta$ -Heterodimere entstehen (Speirs *et al.*, 2004). Die Zielgene, deren Transkription durch $\alpha\alpha$ - oder $\beta\beta$ -Homodimere aktiviert wird, überschneiden sich teilweise, wobei sie sich hinsichtlich der Stärke ihrer Aktivierbarkeit unterscheiden (Cowley *et al.*, 1999). Am ERE haben alle durch Östrogen aktivierten Rezeptoren eine ähnliche Wirkung. Sie bewirken eine Aktivierung der Transkription spezifischer Gene. Über die AP-1 Signalkaskade haben die Östrogenrezeptoren einen gegensätzlichen Effekt: nach Bindung von Östrogen aktiviert ER α die Transkription, wohingegen ER β diese hemmt (Balfe *et al.*, 2004 a). Durch die Bindung von Tamoxifen an die Homodimere wird die Transkription über ERE sowohl durch Östrogenrezeptor α als auch durch Östrogenrezeptor β gehemmt. Die Wirkung über AP-1 ist wie bei Östrogen kontrovers: über ER α wird die Transkription gehemmt, über ER β wird sie aktiviert (Balfe *et al.*, 2004 a) (siehe Abb. 3).

Durch die Bildung von ER- $\alpha\beta$ -Heterodimeren kann die Aktivität der einzelnen Rezeptoren moduliert werden. So wurde gezeigt, dass ER $\beta 1$, ER $\beta 2$ und ER $\beta 5$ die Aktivität von Östrogenrezeptor α hemmen (Peng *et al.*, 2003). Außerdem modulieren die Isoformen ER $\beta 2$, ER $\beta 4$ und ER $\beta 5$ durch die Bildung von ER β -Isoform-Heterodimeren mit ER $\beta 1$ dessen Aktivität (Leung *et al.*, 2006).

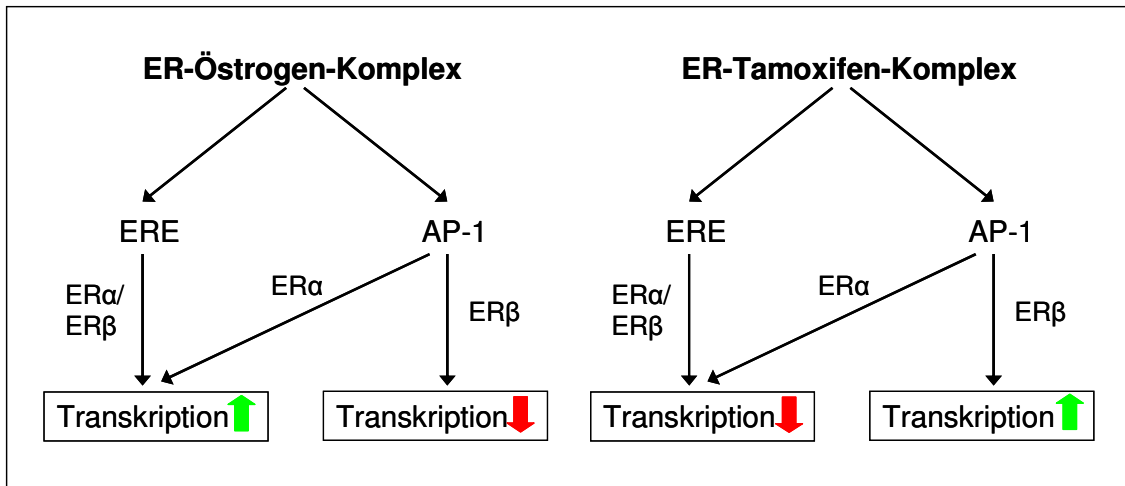


Abb. 3: Einfluss der Östrogenrezeptoren auf die Transkription

Über das ERE haben beide Rezeptorisoformen die gleiche Auswirkung auf die Transkription. Dagegen wirken sie über AP-1 gegensätzlich. Diese Beobachtungen sind für Östrogen und Tamoxifen zu beobachten.

Abkürzungen: ER = Östrogenrezeptor, ERE = Östrogen-Response-Element, AP-1 = Aktivator-Protein 1, ER α = Östrogenrezeptor α , ER β = Östrogenrezeptor β (verändert nach Balfe *et al.*, 2004 a).

1.2.5 Östrogenrezeptoren und Mammakarzinom

Die Entstehung des Mammakarzinoms steht in engem Zusammenhang mit der Östrogenexposition des Brustdrüsengewebes. So weisen Patientinnen mit einer späten Menarche und einer frühen Menopause ein signifikant geringeres Risiko auf, an Brustkrebs zu erkranken als solche mit früher Menarche und später Menopause (de Waard *et al.*, 2005). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen das Risiko erhöht, ein Mammakarzinom zu entwickeln (Bernstein *et al.*, 2006; Reeves *et al.*, 2006; Beral *et al.*, 2003). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Gabe hoher Östrogendosen Mammakarzinome induziert (Russo *et al.*, 1996).

Über welche Mechanismen Östrogen auf die Karzinogenese Einfluss nimmt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Ein möglicher Zusammenhang besteht in der mutagenen Wirkung von 17- β -Östradiol und seiner Abbauprodukte, vor allem Katechol-Östrogen-3,4-Chinon, auf Brustepithelzellen (Russo *et al.*, 2006; Cavalieri *et al.*, 2004). Außerdem hat Östrogen eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation und ist daher von entscheidender Bedeutung für Wachstum und Differenzierung sowohl in der gesunden Brustdrüse als auch in

Mammatumoren. Die gesteigerte Proliferation kann entweder eine direkte Folge der Östrogenwirkung sein, oder aus der östrogenabhängigen Expression von Wachstumsfaktoren resultieren (Russo *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2004).

Das Mammakarzinom weist im Vergleich zum Normalgewebe eine veränderte Hormonrezeptorexpression auf. Im Verlauf der Krebsentstehung kann eine Zunahme der ER α - und eine Abnahme der ER β -Expression beobachtet werden (Roger *et al.*, 2001; Leygue *et al.*, 1998; Shaaban *et al.*, 2003). Dies lässt vermuten, dass Östrogenrezeptor β als eine Art Tumorsuppressor fungiert. Weiterhin sind relative Veränderungen der Isoformen zu erkennen. So zeigt sich eine Zunahme der Expression von ER β 2, ER β 5 (Leygue *et al.*, 1999) und einer ER α -Isoform, die eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Östradiol aufweist (Fuqua *et al.*, 2000). Durch diese Beobachtungen wird die Komplexität der Rezeptorregulation und der Karzinogenese deutlich. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die veränderte Rezeptorexpression eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Brustkrebs spielt.

1.2.6 Progesteronrezeptoren

Die Progesteronrezeptoren (PgR) sind neben den Östrogenrezeptoren die zweite wichtige Rezeptorgruppe im Brustgewebe. Sie werden auch zur „*nuclear receptor superfamily*“ gezählt. Unter ihnen können zwei Isoformen unterschieden werden: Progesteronrezeptor A (PgRA) und Progesteronrezeptor B (PgRB) (Horwitz *et al.*, 1983). Diese Isoformen werden vom selben Gen codiert und entstehen unter Einfluss von Östrogen durch alternative Startstellen der Transkription im Promotor. Beide Rezeptoren sind in der Lage, Progesteron zu binden. Sie unterscheiden sich jedoch in Bezug auf Aminosäurekettenlänge und Funktion (Conneely *et al.*, 2000; Bain *et al.*, 2000). Das Gen für den Progesteronrezeptor stellt eine wichtige Zielstruktur für aktivierte Östrogenrezeptoren dar (Couse *et al.*, 1999). Die Expressionsstärke der PgR kann daher als Maß für die Aktivität der Östrogenrezeptor-Kaskade gesehen werden. Der regulierende Effekt der gleichzeitigen Expression von ER α und ER β zeigt sich darin, dass das Vorhandensein von ER β 2 im ER α -

positiven Mammakarzinom mit einer schwachen Expression des Progesteronrezeptors korreliert (Saji *et al.*, 2002).

1.4 Therapie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist als potentiell systemische Erkrankung anzusehen und erfordert daher ein mehrschichtiges therapeutisches Vorgehen. Zu den drei Therapieansätzen gehören Chirurgie, Strahlentherapie und die systemische Therapie. Ziel der Chirurgie ist es, den Tumor *in sano* zu entfernen. Aufgabe der Strahlentherapie ist es, das Risiko eines Lokalrezidivs zu reduzieren. Bei der systemischen Therapie wird zwischen adjuvanter und neoadjuvanter Therapie unterschieden.

Die adjuvante Therapie hat zum Ziel, Mikrometastasen und disseminierte Tumorzellen abzutöten. Hierbei kommen drei Prinzipien zum Einsatz:

- Chemotherapie
- endokrine Therapie
- Immuntherapie

Als Chemotherapeutika werden vor allem Anthrazykline (Epirubicin, Adriamycin) und Taxane (Paclitaxel, Docetaxel) angewendet. Als Medikamentengruppen für die endokrine Therapie stehen Antiöstrogene (Tamoxifen, Toremifen), Aromatasehemmstoffe (Anastrozol, Letrozol, Exemestan) und GnRH-Analoga (Goserelin, Leuprorelin) zur Verfügung. Bei Patientinnen, deren Tumor HER-2/neu überexprimiert, besteht die Möglichkeit, eine Immuntherapie mit Trastuzumab (Herceptin ®) durchzuführen. Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen HER-2/neu gerichtet ist.

Die präoperative oder auch neoadjuvante systemische Therapie ist in zweierlei Hinsicht bedeutsam. Zum einen kann durch diese Therapieform das Tumolvolumen reduziert werden. Dies ermöglicht es, mehr Frauen mit einer brusterhaltenden Therapie (BET) zu behandeln. Zum anderen kann sie als eine Art Modell für die *in vivo* Sensitivitätstestung von systemischen Therapeutika betrachtet werden. Hierfür wird vor und nach der Therapie Gewebe entnommen

und auf histologische Merkmale untersucht. Dabei spielt die pathologische Komplettremission (pCR) eine entscheidende Rolle. Sie korreliert mit dem Gesamtüberleben und dem rückfallfreien Überleben und kann daher als Surrogatmarker für das Therapieansprechen gewertet werden (Bafaloukos, 2005). Dieses Modell hat den Vorteil, dass schnell Informationen über die Chemosensitivität des Tumors gewonnen werden können, die für die Auswahl der adjuvanten Therapie von Nutzen sind. Außerdem bietet die zeitnahe Ermittlung von klinischen und histopathologischen Merkmalen in neoadjuvanten Studien die Möglichkeit, neue prognostische und prädiktive Marker zu evaluieren und ihre Validität zu überprüfen.

Als Medikamente werden in den meisten Fällen Anthrazykline oder Taxane eingesetzt. Gelegentlich werden auch endokrine Therapeutika angewandt. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die Patientin postmenopausal und der Tumor Hormonrezeptor-positiv ist. Hier weisen Aromataseinhibitoren gegenüber Tamoxifen einen Vorteil auf (Schmidt-Matthiesen *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2006).

Trotz dieser Therapieoptionen verstirbt ca. ein Drittel der Patientinnen am Mammakarzinom (Guarneri *et al.*, 2004), wobei als Todesursache meist Fernmetastasen verantwortlich sind (Schmidt-Matthiesen *et al.*, 2002). Um bei Therapieentscheidungen gezielter vorgehen zu können, kommt der Entwicklung neuer Prognose- und Prädiktionsfaktoren größte Bedeutung zu.

1.5 Prädiktive Faktoren

Prädiktive Faktoren sind Größen, mit denen das Ansprechen von Tumoren auf eine Therapie eingeschätzt werden kann. Hier sind vor allem der Östrogenrezeptor-/Progesteronrezeptor-Status und die HER-2/neu-Expression bedeutsam. Letztere ist prädiktiv für das Ansprechen auf eine Immuntherapie mit Trastuzumab.

Der Hormonrezeptor-Status (ER α und/oder PgR) wird vor allem als prädiktiver Wert für eine endokrine Therapie angesehen. Patientinnen, die positiv für

Hormonrezeptoren sind, sprechen besser auf eine endokrine Therapie an, wohingegen Tumore mit negativem Rezeptorstatus empfindlicher gegenüber Chemotherapeutika zu sein scheinen (Funke *et al.*, 2005). Im Bereich prädiktiver Marker werden neuere Parameter diskutiert, wobei hiervon bisher keiner für den klinischen Einsatz validiert werden konnte (Duffy, 2005). Die Erforschung dieser Faktoren ist von großer Bedeutung, da viele Patientinnen Therapien erhalten, die wenig wirksam sind (Cleator *et al.*, 2002), jedoch erhebliche Nebenwirkungen verursachen (Shapiro *et al.*, 2001). Zudem entstehen so erhebliche Kosten, die vermeidbar wären (Williams *et al.*, 2006).

Es wird deutlich, dass Hormonrezeptoren für die Prädiktion der Mammakarzinomtherapie von Bedeutung sind. Die Tatsache, dass Östrogen- und Progesteronrezeptoren in diversen Isoformen vorkommen, wird in der klinischen Routine bis dato wenig berücksichtigt. Dabei gibt es Hinweise, dass ER β von großem Wert sein könnte. So geht die Proteinexpression von ER β mit einer günstigen Prognose und einer *Response* auf Tamoxifen einher (Saji *et al.*, 2005). Ob ER β und seine Isoformen für andere endokrine Therapieoptionen oder Chemotherapien als Vorhersageparameter von Bedeutung sind, ist bislang wenig untersucht.

Hier stellt sich die Frage, ob die genauere Charakterisierung bereits bekannter Marker, z. B. der Östrogenrezeptoren, eine Ergänzung beziehungsweise eine Alternative zur Erforschung neuer Marker darstellt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Identifizierung prädiktiver Marker und die differenziertere Betrachtung etablierter Faktoren, z.B. die Analyse der Hormonrezeptoren getrennt nach ihren Isoformen, spielen in der aktuellen Forschung eine wichtige Rolle. Dass die bisherigen Kenngrößen nicht ausreichend sind, wird daran deutlich, dass bisher *a priori* nur schwer abzuschätzen ist, welche Patientin im Einzelfall von einer bestimmten Therapie profitiert. So werden Patientinnen häufig Therapien zugeführt, von denen sie keinen Nutzen haben. Sie werden aber einem großen Spektrum an unerwünschten Nebenwirkungen ausgesetzt und es entstehen erhebliche Kosten, die vermeidbar wären.

Das Ansprechen auf eine neoadjuvante Therapie kann durch Untersuchungen wie die Ermittlung der pathologischen Remissionsrate einfach ermittelt werden. Daher ist dieses Therapiekonzept gut geeignet um neue prädiktive Marker zu evaluieren und zu validieren. Der Hormonrezeptor-Status ist als prädiktiver Wert für eine endokrine Therapie etabliert. Bislang gehen in den HR-Status lediglich ER α und PgRA/B ein. Welchen Stellenwert ER β und seine Isoformen für die Vorhersage des Therapieansprechens auf endokrine und zytostatische Medikamente haben, ist bisher nicht ausreichend untersucht.

Es ist bekannt, dass Medikamente Einfluss auf die Expression von biologischen Tumorparametern, wie z.B. Ki67, haben. In dieser Studie soll untersucht werden, ob die Expression von ER β -Isoformen von endokrinen oder zytostatischen Medikamenten ebenfalls verändert wird. Zu diesem Zweck soll in dieser Arbeit die Proteinexpression von ER α , ER β gesamt (ER β g), ER β 1 (Wildtyp), ER β 2/ER β cx und PgR bei neoadjuvanten Mammakarzinom-Patientinnen immunhistochemisch ermittelt werden. Anhand von *Tissue-Microarrays*, die Gewebe der derselben vom Zeitpunkt vor und nach der systemischen Therapie beinhalten soll analysiert werden, ob sich die HR-Expression im Therapieverlauf ändert. Des Weiteren soll untersucht werden, ob es Zusammenhänge zwischen der Expressionsstärke bzw. Expressionsänderung der Rezeptoren auf Proteinebene und dem Therapieansprechen gibt (siehe Abb. 4).

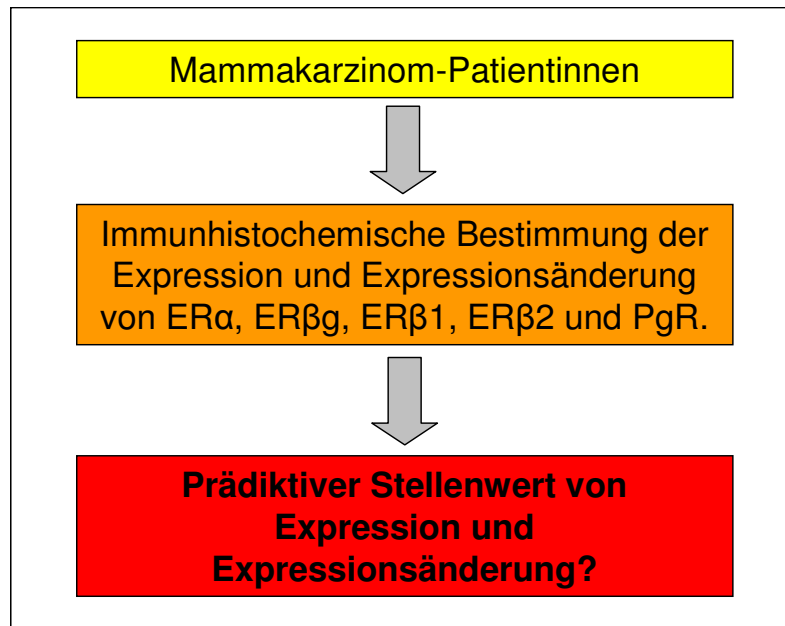


Abb. 4: Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Bei neoadjuvant behandelten Mammakarzinom-Patientinnen sollen die Expression und die Expressionsänderung von Östrogenrezeptor β gesamt, Östrogenrezeptor $\beta 1$ und Östrogenrezeptor $\beta 2$ auf Proteinebene bestimmt werden. Weiterhin soll der Frage nachgegangen werden, ob die Expression bzw. die Expressionsänderung in Zusammenhang zum Therapieansprechen stehen.

Abkürzungen: ER α = Östrogenrezeptor α , ER β g = Östrogenrezeptor β gesamt, ER $\beta 1$ = Östrogenrezeptor $\beta 1$, ER $\beta 2$ = Östrogenrezeptor $\beta 2$, PgR = Progesteronrezeptor.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1: verwendete Chemikalien

Produkt	Bezugsquelle
Ammoniaklösung 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl 1M	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y Solution Aqueous	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hämatoxylin Lösung (Mayers)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Papanicolaous Lösung 1a Harris' Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pertex	Medite, Burgdorf, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris Base (TRIZMA ® Base)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol, Isomerengemisch	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Reagenziensets (Kits)

Tab. 2: verwendete Reagenziensets

Produkt	Bezugsquelle
Antibody Diluent	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
CytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spektrum	Zytomed GmbH, Berlin, Deutschland
DAB Substrate Kit Brown	Zytomed GmbH, Berlin, Deutschland

2.1.3 Antikörper

Tab. 3: verwendete Antikörper

Produkt	Bezugsquelle
Östrogenrezeptor β gesamt Antikörper, Maus, monoklonal, Klon: 14C8, Immunogen: Aminosäure 1-153 des humanen ER β	GeneTex, Inc., San Antonio, USA
Östrogenrezeptor β 1 Antikörper, Maus, monoklonal, Klon: PPG5/10, Immunogen: synthetisches Peptid des C-Terminus der ER β 1 Isoform	Serotec, Oxford, Großbritannien
Östrogenrezeptor β 2 (cx) Antikörper, Maus, monoklonal, Klon: 57/3, Immunogen: synthetisches Peptid des C-Terminus der ER β 2 Isoform	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Östrogenrezeptor α Antikörper, Kaninchen, monoklonal, Klon: SP1, Immunogen: synthetisches Peptid des C-Terminus des humanen ER α	DCS, Hamburg, Deutschland
Progesteronrezeptor Antikörper, Kaninchen, monoklonal, Klon: SP2, Immunogen: rekombinantes Protein der Aminosäuren 412-526 des humanen PR	DCS, Hamburg, Deutschland
Ki-67 Antikörper, Maus, monoklonal, Klon: MIB-1, Immunogen: humanes rekombinantes Peptid	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Cytokeratin 18 Antikörper, Maus, monoklonal, Klon: DC 10, Immunogen: PCM 42, humane Mammakarzinom-Zelllinie	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 4: Puffer und Lösungen

Puffer	Bestandteile
Zitratpuffer (10x, pH 6)	58,8 g Trinatriumcitratdihydrat auf 2000 ml mit H ₂ O auffüllen mit 0,1M Zitronensäure auf pH 6,0 einstellen wird zur Anwendung 1:10 verdünnt
Zitronensäure 0,1M	4,2 g Zitronensäure Monohydrat auf 200 ml mit H ₂ O auffüllen
Tris/NaCl (10x, pH 7,6)	60,55 g Tris (base) 85,20 g NaCl auf 1000 ml mit H ₂ O auffüllen mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen wird zur Anwendung 1:10 verdünnt
Tris (base) 1M	60,57 g Tris (base) auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen
Tris 0,1M/Tween 0,05% (Waschpuffer)	50 ml 1M Tris (base) auf 500 ml mit H ₂ O auffüllen 250 µl Tween
H ₂ O ₂ 3%	10 ml 30% H ₂ O ₂ 90 ml Tris/NaCl (1x)

2.1.5 Geräte

Tab. 5: verwendete Geräte

Produkt	Bezugsquelle
Bohrmaschine MB140/S	Proxxon, Niersdorf, Deutschland
Koordinatentisch K70	Proxxon, Niersdorf, Deutschland
Trennschleifer Micromot 50/e	Proxxon, Niersdorf, Deutschland
Wärmeplatte (Slide Drying Bench)	Barnstead Electrothermal, Dubuque, Iowa, USA
Kochplatte	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer ARE	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Mikroskop TE 2000-U	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrotom HM 355 S	MICROM, Walldorf, Deutschland
pH-Meter MP225	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Sauger	Schubert & Weiss, München, Deutschland
Schnellkochtopf	Fissler, Idar-Oberstein, Deutschland
Vortex	VELP, Mailand, Italien
Waage CP 3235-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland

2.1.6 Sonstiges

Tab. 6: Sonstiges

Produkt	Bezugsquelle
Subkutannadel (0,6mm)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Perkutannadel (1,0mm)	Bard, New Jersey, USA
Blutentnahmenadel (1,7mm)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Superfrost-Objektträger	R. Langenbrink, Teningen, Deutschland
PAP-Pen	MBT, Gießen, Deutschland
Pasteurpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Färbeschalen	Hecht, Sondheim, Deutschland
Deckgläser	R. Langenbrink, Teningen, Deutschland
Software Mikroskop: ACT ver. 2	Nikon, Düsseldorf, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten

Insgesamt wurden Tumorproben von 127 Patientinnen in die Studie einbezogen, von denen 69 ausgewertet werden konnten. Die übrigen 58 konnten nicht in die Auswertung aufgenommen werden. Grund dafür war entweder eine Abschwimmen der Proben vom Objektträger oder die Tatsache, dass statt Tumorgewebe nur Bindegewebe und Fett ausgestanzt wurde.

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen zum Operationszeitpunkt betrug 58,9 Jahre, 18 % waren prämenopausal, 12 % perimenopausal und 70 % postmenopausal. Die Zeitpunkte für die Entnahme von Stanzbiopsien und Primärtumoren lagen zwischen 1999 und 2003.

Tab. 7: Therapieschemata

Abkürzungen: d1q3w = Medikamente werden an Tag 1 verabreicht. Wiederholung nach 3 Wochen (Tag 22), i. v. = intravenös, p. o. = per os.

Schema/Wirkstoff	Dosierung	Art der Verabreichung	Anwendungszeitraum
1) AC-Schema Adriamycin Cyclophosphamid	60 mg/m ² 600 mg/m ²	i. v. i. v.	d1q3w d1q3w 4-6 Zyklen
2) EC-Schema Epirubicin Cyclophosphamid	90 mg/m ² 600 mg/m ²	i. v. i. v.	d1q3w d1q3w 4-6 Zyklen
3) AT-Schema Adriamycin Docetaxel	50 mg/m ² 75 mg/m ²	i. v. Infusion	d1q3w d1q3w 4-6 Zyklen
4) ET-Schema Epirubicin Docetaxel	90 mg/m ² 75 mg/m ²	i. v. Infusion	d1q3w d1q3w 4-6 Zyklen
5) ECT-Schema Epirubicin Cyclophosphamid Docetaxel	90 mg/m ² 500 mg/m ² 75 mg/m ²	i. v. i. v. Infusion	d1q3w d1q3w d1q3w 4-6 Zyklen
6) Letrozol	2,5 mg	p. o.	täglich für 6 Monate
7) Exemestan	25 mg	p. o.	täglich für 6 Monate

Die Patientinnen werden basierend auf den durchgeführten Therapieschemata in drei Gruppen eingeteilt:

- Gruppe A (Tab. 7: Nr. 1 und 2) wird auf Basis von Anthrazyklinen behandelt, Anzahl der Patientinnen n = 17,
- Gruppe B (Tab. 7: Nr. 3 bis 5) erhält eine präoperative Therapie mit Taxanen als dominierender Substanzgruppe, Anzahl der Patientinnen n = 30 und
- Gruppe C (Tab. 7: Nr. 6 und 7) bekommt Aromataseinhibitoren als Vertreter der endokrinen Therapeutika, Anzahl der Patientinnen n = 22.

Diese werden zum Teil im Rahmen von Kombinationschemotherapien eingesetzt (siehe Tab. 7).

2.2.2 Gewebegewinnung

Vor Beginn der präoperativen Therapie wird den Patientinnen unter sonographischer Kontrolle mittels Stanzbiopsie Tumorgewebe entnommen. Dieses Gewebe wird in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und histopathologisch untersucht. Mit Hilfe des erhaltenen Befundes wird ein geeignetes Therapieschema für die präoperative Therapie ausgewählt. Nach abgeschlossener neoadjuvanter Therapie erfolgt die Resektion des Primärtumors bei Patientinnen, die keine komplette Tumorremission zeigen. Auch dieser wird in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, und histopathologisch untersucht.

Um eine eindeutige Zuordnung zwischen Patientin und Gewebe zu gewährleisten, werden alle aus dem Universitätsklinikum stammenden und im Pathologischen Institut untersuchten Proben systematisch erfasst und mit einer Identifikationsnummer versehen. Sie enthält folgende Bestandteile: K für „Klinikum“, das Entnahmejahr und eine fortlaufende Nummer (Bsp.: K-2010-36985). Anhand dieser Nummern werden die Patientinnen anonymisiert und in die Listen der Studie aufgenommen.

2.2.3 Herstellung der *Tissue Microarrays*

Die Herstellung der *Tissue-Microarrays* erfolgt nach einem bestimmten Ablauf: der Paraffin-Akzeptorblock wird vorbereitet, das Gewebe aus dem Donorblock ausgestanzt und in den Akzeptorblock eingefügt (siehe Abb. 5).

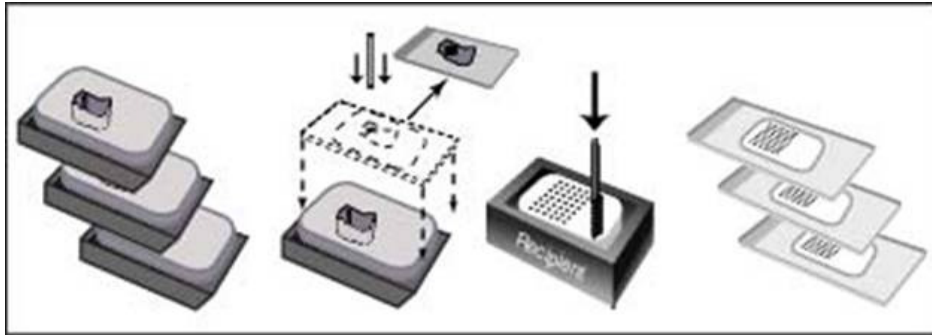


Abb. 5: Prinzip der TMA-Herstellung

Aus einem geeigneten Areal des Primärtumors wird Gewebe ausgestanzt und in den Akzeptorblock eingebracht.

Für die Herstellung des Akzeptorblocks werden in einen „leeren“ Paraffinblock, der eine Größe von ca. 1,5 x 3 cm hat, mit einer Ständerbohrmaschine Löcher gebohrt. In diese Löcher werden später die Gewebestanzen eingebracht. Sie müssen daher den gleichen Durchmesser haben wie die Stanzen. Um später den exakten Sitz der Stanze zu gewährleisten, wird der „Paraffinrohling“ in der Bohrvorrichtung nur mit Hilfe eines X/Y-Koordinatentisches bewegt. Dadurch kann genau gesteuert werden, wo das nächste Loch entsteht. Es empfiehlt sich, den Paraffinblock und den Bohrer während des Arbeitsprozesses mit Aqua dest. zu kühlen.

Um Tumorgewebe aus den Donorblöcken ausstanzen zu können, müssen zuerst geeignete Stanzen hergestellt werden. Dies geschieht durch Bearbeitung von Gewebestanzen wie sie in der Klinik eingesetzt werden, oder durch Modifikation von einfachen Injektionskanülen. Diese werden mit einem Trennschleifer auf die gewünschte Länge gebracht und geschärft. Wichtig ist, dass für die verwendeten Stanzen sogenannte *Mandrins* zur Verfügung stehen, um das ausgestanzte Gewebe in das vorgesehene Loch einzubringen. Ein Mandrin ist ein dünner Stab, dessen Durchmesser kleiner ist als der der Stanze. Mit seiner Hilfe kann das ausgestanzte Tumorgewebe aus der Stanze heraus geschoben und in den Akzeptorblock eingebracht werden.

Zur Auswahl eines geeigneten Gewebeareals wird ein HE-Schnitt mikroskopisch auf Tumorgehalt untersucht. Wenn eine entsprechende Stelle gefunden ist, wird der Schnitt über den Tumorblock gelegt, um auch hier die

entsprechende Stelle aufzufinden. An dieser wird jetzt mit Hilfe der oben genannten Stanzen manuell ein Gewebezylinder entnommen und in das vorgesehene Loch des Akzeptorblocks eingesetzt.

Aus dem so entstandenen *Tissue-Microarray* werden mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese werden in einem warmen Wasserbad geglättet und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Im Anschluss müssen die Schnitte getrocknet werden.

Um Verwechslungen zu verhindern, werden die Tumornummern systematisch in Listen erfasst, in denen ihnen die genauen Positionen auf dem TMA zugeordnet werden. Als Orientierungshilfe auf den Schnitten werden am Anfang des *Arrays* zwei und am Ende zehn Positionen mit Leberzirrhose gefüllt (Position 1-1, 1-2 und 15-1 bis 15-10).

Für dieses Projekt werden insgesamt vier *Tissue-Microarrays* hergestellt. Von diesen hat jeder 150 Positionen, in die Tumorgewebe eingebracht werden kann. Einer dieser Arrays (MB191) enthält das Gewebe aus den Stanzbiopsien, die den Patientinnen vor Beginn der präoperativen Therapie entnommen wurden. Die anderen drei TMA (MB192, MB193, MB194) enthalten das Gewebe der operativ entfernten Primärtumoren, auf welche die neoadjuvante Therapie eingewirkt hat. Jeder dieser *Arrays* beinhaltet das Gewebe sämtlicher in die Studie aufgenommenen Patientinnen, wobei in die einzelnen *Microarrays* Gewebe aus unterschiedlichen Arealen der Tumore eingefügt wird.

2.2.4 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Vor der immunhistochemischen Färbung wird eine orientierende Färbung mit Hämatoxylin (Mayer's) und Eosin durchgeführt. Hierfür müssen die Schnitte zuerst entparaffiniert und dann rehydriert werden. Dazu werden die TMA zunächst zweimal für fünf Minuten in Xylol gestellt. Darauf folgen 100 % Ethanol für 30 Sekunden, 95 % Ethanol für 15 Sekunden, 70 % Ethanol und Aqua dest. für ebenfalls 15 Sekunden.

Jetzt werden die TMA für 30 Sekunden in Hämatoxylin auf und ab bewegt. Im folgenden Schritt müssen die Schnitte für eine Minute in Leitungswasser

gebläut werden. Nach dem Bläuen werden sie nacheinander für je 15 Sekunden in Aqua dest. und 70 % Ethanol getaucht. Danach wird das Gewebe für 15 Sekunden in Eosin auf und ab bewegt.

Anschließend werden die TMA noch zweimal in 95 % Ethanol für 15 Sekunden und zweimal in 100 % Ethanol für 15 Sekunden inkubiert. Abschließend müssen sie noch für zwei Minuten in Xylol dehydriert werden. Die Schnitte werden mit Pertex wasserfrei eingedeckt.

2.2.5 Prinzip der Immunhistochemie

Bei immunhistochemischen Färbungen macht man sich die Eigenschaft von Antikörpern zu Nutze, mit ihrer Antigenbindungsstelle spezifisch sogenannte Epitope, in diesem Fall Peptide und Proteine, zu erkennen und an sie zu binden. Diese Bindung des Antikörpers bildet die Grundlage für die optische Darstellung von Eiweißstrukturen in einzelnen Zellen und Zellkompartimenten.

In dieser Arbeit kommt eine so genannte indirekte „*Sandwich*“-Methode zur Anwendung. Dabei wird ein Erstantikörper eingesetzt, der wie oben beschrieben an Proteinstrukturen spezifisch bindet. Im nächsten Schritt folgt ein Zweitantikörper, der an den Erstantikörper bindet. Dieser Zweitantikörper ist mit Biotin konjugiert. Im dritten Schritt wird eine Meerrettichperoxidase (HRP) dazugegeben, an welche ein Streptavidinmolekül gebunden ist. Dieses Streptavidin bildet mit dem Biotin einen Komplex, wodurch die Peroxidase an den Zweitantikörper gebunden wird. Im vierten Schritt wird ein Chromogen, z.B. 3,3'-Diaminobenzidin, zugegeben, das von der Peroxidase oxidiert wird. Dadurch bildet sich am Ort der Primärantikörperbindung ein lichtmikroskopisch sichtbarer Farbniederschlag (siehe Abb. 6).

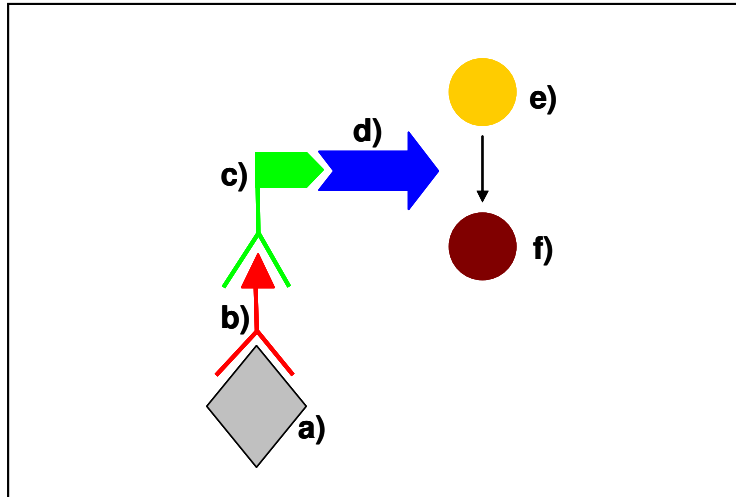


Abb. 6: Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Der Primärantikörper (b) bindet an das Antigen (a). An den Primärantikörper bindet der biotinylierte Sekundärantikörper (c). (d) stellt die Verbindung aus Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Streptavidin dar. Das Streptavidin bildet mit dem Biotin des Zweitantikörpers einen Komplex. (e) DAB (3,3'-Diaminobenzidin) wird von der HRP oxidiert, wodurch ein dunkelbrauner Farbstoff entsteht (f).

2.2.6 Vorbereitung der Schnitte

Die Fixierung mit Formalin und die Einbettung in Paraffin haben den Verlust der Immunreaktivität zahlreicher Antigene zur Folge. Daher sind diverse Schritte notwendig, um dieses Gewebe wieder für die Immunhistochemie verwenden zu können. All diese vorbereitenden Schritte verfolgen das Ziel, eine Bindung zwischen Antikörper und Epitop zu ermöglichen.

Entparaffinierung und Rehydrierung

Zu Beginn muss das Gewebe entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu wird es für genau definierte Zeiten in unterschiedliche Lösungen getaucht. Am Anfang stehen drei Xylolbäder, in denen die Schnitte einmal fünfzehn und zweimal fünf Minuten verbleiben. Darauf folgt eine absteigende Alkoholreihe, von welcher jeder Schritt drei Minuten in Anspruch nimmt. Die Reihe enthält die Konzentrationen 95, 90, 80 und 70 Prozent Ethanol. Den Abschluss der Rehydrierung bildet ein drei Minuten langes Bad in destilliertem Wasser.

Antigendemaskierung

Das Prinzip der Antigendemaskierung beruht auf der Einwirkung von Hitze auf die Schnitte in einem wässrigen Retrievalmedium. Dabei sind Temperatur und Zeit die entscheidenden Komponenten zur Wiederherstellung der Antigenität .

Hierzu wird ein Liter Zitratpuffer (1x, pH 6) im Schnellkochtopf bei unverschlossenem Deckel zum Kochen gebracht. Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte werden in den heißen Puffer gestellt und der Deckel verschlossen. Nach Aufbau des Druckes werden die Schnitte für vier Minuten gekocht.

Auf das Kochen folgt eine zwanzig Minuten lange Abkühlungsphase im Wasserbad. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schnitte langsam und ausreichend abgekühlt sind, ehe sie weiterverarbeitet werden. Wenn die Präparate zu schnell abgekühlt werden, kann das zu einem aufgequollenen und unscharfen Zellbild führen. Die Objektträger sollten ab diesem Schritt ständig feucht gehalten werden.

Um das Gewebe von den überschüssigen Substanzen der Zitratpufferlösung zu befeien, wird es zweimal für dreißig Sekunden in Tris/NaCl (1x, pH 7,6) getaucht. Die Präparate werden anschließend mit dem PAP-Pen umrandet, um zu verhindern, dass sich die später aufgetragenen Lösungen auf dem ganzen Objektträger verteilen.

2.2.7 Immunfärbung

Zum Waschen der Schnitte wird immer Tris 0,1M/Tween 0,05% als Puffer verwendet. Jeder einzelne Waschschrift dauert zwei Minuten. Am Anfang der Färbung steht eine kurze Inkubation mit Waschpuffer. Dadurch verteilen sich die im Folgenden aufgetragenen Lösungen und Substanzen gleichmäßiger auf dem Objektträger.

Inaktivierung der endogenen Peroxidase

Die gewebeeigene endogene Peroxidase ist ähnlich wie die HRP in der Lage, die in der Immunhistochemie verwendeten Farbstoffe (hier DAB) zu oxidieren

und so unspezifische Färbungen zu erzeugen. Zur Inaktivierung dieses Enzyms wird für fünf Minuten 3 % H₂O₂ aufgetragen. Dadurch kann eine braune Hintergrundfärbung minimiert werden. Im Anschluss an diesen Inaktivierungsschritt werden die TMA dreimal gewaschen.

Die in den folgenden Schritten verwendeten Substanzen stammen aus dem CytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spektrum. Dieses enthält neben einem Proteinblock den biotinylierten Sekundärantikörper und den Streptavidin-HRP-Komplex.

Proteinblock

Vor dem Auftragen der Primärantikörper steht ein sogenannter Proteinblock-Schritt mit Blocking Solution - SuperBlock. Diese wird dafür auf die Schnitte aufgetragen und nach fünf Minuten wieder abgesaugt. Im Anschluss werden die TMA einmal gewaschen. Sinn dieses Schrittes ist es, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Gewebeproteinen zu hemmen, da dies unspezifische Hintergrundfärbungen zur Folge hätte. Die Eiweiße im Proteinblock binden an die hydrophoben Bindungsstellen des Gewebes und verhindern so die unspezifische Anlagerung der Antikörper.

Primärantikörper

Für die Erstantikörper werden vorab die idealen Verdünnungsstufen und Inkubationszeiten ermittelt. Die Immunglobuline werden in Antibody Diluent auf die gewünschte Konzentration verdünnt (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Einsatzbedingungen der Primärantikörper

Abkürzungen: ER β g = Östrogenrezeptor β gesamt, ER β 1 = Östrogenrezeptor β 1, ER β 2 = Östrogenrezeptor β 2, ER α = Östrogenrezeptor α , PgR = Progesteronrezeptor, CK = Zytokeratin, h = Stunde.

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Temperatur
ERβg	1:1000	12,5 h	4 °C
ERβ1	1:1000	1 h	20 °C
ERβ2	1:500	1 h	20 °C
ERα	1:200	1 h	20 °C
PgR	1:200	1 h	20 °C
Ki-67	1:200	1 h	20 °C
CK 18	1:2000	1 h	20 °C

Der verwendete Antikörper von GeneTex detektiert alle Östrogenrezeptor β Isoformen (ER β g), er ist gegen die Aminosäuren 1 bis 153 des humanen ER β gerichtet. Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper aus der Maus, der in einer Verdünnung von 1:1000 für 12,5 Stunden bei 4 °C inkubiert wird. Für diese Inkubationsdauer ist eine feuchte Kammer notwendig, um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden.

Das Immunglobulin, das sich spezifisch gegen die Östrogenrezeptor β 1 Isoform richtet, ist ebenfalls monoklonal und stammt aus der Maus. Es wird von der Firma Serotec hergestellt und hat als Immunogen ein synthetisches Peptid, das dem C-Terminus des ER β 1 nachempfunden ist. Hier hat sich eine Verdünnung von 1:1000 für eine Stunde bei Raumtemperatur als ideal erwiesen.

Zur Darstellung der Isoform Östrogenrezeptor β 2 kommt ein monoklonaler Mausantikörper der Firma Acris zum Einsatz. Er ist, ähnlich wie der ER β 1 Antikörper, gegen ein synthetisches Peptid gerichtet. Dieses entspricht in diesem Fall dem C-terminalen Ende von ER β 2. Dieses Immunglobulin wird im Verhältnis 1:500 für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben.

Der Antikörper gegen Östrogenrezeptor α stammt von der Firma DCS. Er ist monoklonal aus dem Kaninchen und wird im Pathologischen Institut zur Routinediagnostik eingesetzt. Er bindet an den C-Terminus des menschlichen

ER α . Verdünnung und Inkubationszeit betragen hier 1:200 und eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die Expression des Progesteronrezeptors wird in dieser Studie durch einen monoklonalen Kaninchenantikörper ermittelt. Dieser stammt wie ER α von der Firma DCS und wird mit Hilfe eines rekombinanten Proteins hergestellt, das den Aminosäuren 412 bis 526 des humanen Progesteronrezeptors entspricht. Er wird 1:200 verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die TMA gegeben.

Als Proliferationsmarker wird das nukleäre Protein Ki-67 untersucht. Der Primärantikörper für dieses Protein stammt aus dem Mausklon MIB-1 und wird von der Firma DakoCytomation geliefert. Als Immunogen fungiert ein rekombinantes Peptid, entsprechend einem Ki-67-cDNA Fragment mit 1002 Basenpaaren. Er wird 1:200 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Entscheidungshilfe bezüglich der epithelialen Herkunft von Zellen wird ein Antikörper gegen das Intermediärfilament Zytokeratin 18 von der Firma DakoCytomation verwendet. Dieser stammt aus der Maus und ist ebenfalls monoklonal. Der Antikörper wird in der Verdünnung 1:2000 für eine Stunde bei Raumtemperatur eingesetzt.

Biotinylierter Sekundärantikörper

Das ZytoChem-Plus HRP Kit enthält eine Mischung aus Antikörpern, die gegen Maus, Kaninchen, Ratte und Meerschweinchen gerichtet sind und die Fähigkeit besitzen, an die oben verwendeten Primärantikörper zu binden. Die Zweitantikörper sind mit Biotin konjugiert, das als Bindungsstelle für den unten verwendeten Streptavidin-HRP-Komplex fungiert. Die Inkubationszeit beträgt fünfzehn Minuten, im Anschluss werden die Schnitte dreimal mit Tris/Tween gewaschen.

Streptavidin-HRP-Komplex

Streptavidin besitzt eine sehr hohe Affinität zu Biotin. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze, um die HRP (Meerrettichperoxidase) mit dem sekundären Antikörper zu verbinden. HRP wird aus der Wurzel der Meerrettichpflanze gewonnen. Es besitzt als aktives Zentrum eine eisenhaltige Hämgruppe, die es ihm ermöglicht, unterschiedliche Substanzen, z.B. Polyphenole und Nitrate, zu oxidieren.

Der Streptavidin-HRP-Komplex wird für 15 Minuten auf den Tissue-Array gegeben. In dieser Zeit verbindet sich der Komplex mit dem Biotin des Zweit-Immunglobulins. Danach müssen die Schnitte viermal gewaschen werden.

DAB (3,3'-Diaminobenzidin)

Der letzte Schritt der Immunfärbung bildet den eigentlichen Färbvorgang. 3,3'-Diaminobenzidin stellt für die HRP einen Elektronendonator dar und kann daher von ihr oxidiert werden. Das Reaktionsprodukt ist ein dunkelbrauner, in organischen Lösungsmitteln unlöslicher Farbstoff. Für die Reaktion werden 80 µg DAB-Chromogen pro Milliliter DAB-Substratpuffer eingesetzt. Diese relativ hohe Konzentration an Chromogen hat eine verbesserte Sensitivität der Färbemethode zur Folge. Die Präparate werden zweimal für fünf Minuten mit DAB inkubiert, wobei die Objektträger nach dem ersten Schritt lediglich abgesaugt, aber nicht gewaschen werden. Die Färbereaktion wird mit Waschpuffer gestoppt.

Kontrollen

Bei jeder Färbung werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient das Mammakarzinom einer Patientin, das sicher positiv für die untersuchten Marker ist. Als Negativkontrolle wird ebenfalls ein Schnitt des als Positivkontrolle verwendeten Tumors verwendet. Dieser wird jedoch nicht mit einem Primärantikörper inkubiert, sondern nur mit Antibody Diluent. Die anderen Schritte sind gleich wie bei der richtigen Färbung.

Gegenfärbung

Immunfärbungen werden in der Regel noch mit einer so genannten Gegenfärbung versehen, um den Kontrast zwischen positiven und negativen Arealen zu verdeutlichen. In dieser Arbeit findet eine Färbung mit Papanicolaous Lösung 1a (Harris' Hämatoxylin) Verwendung. Diese verleiht Zellkernen und Bindegewebe eine kräftig blaue Farbe, die in gutem Kontrast zum Dunkelbraun des DAB steht.

Die Schnitte werden zuerst für 30 Sekunden in Aqua dest., dann für eine halbe Minute in Papanicolaous Lösung 1a (Harris' Hämatoxylin) gestellt. Anschließend muss das Gewebe gebläut werden. Dies geschieht durch drei 20 Sekunden lange Bäder in Aqua dest., auf die ein 15 Sekunden dauerndes Bad in einer Mischung aus 70 % Ethanol und 3 % Ammoniak folgt. Abschließend müssen die Tissue-Arrays noch von Wasser befreit werden, um eine gewisse Haltbarkeit zu gewährleisten. Dafür werden sie für je 30 Sekunden in eine aufsteigende Ethanolreihe getaucht (70 %, 80 %, 95 %, 100 %). Beendet wird diese Dehydrierung durch ein 60 Sekunden langes Xylolbad. Die Objektträger werden wasserfrei mit Pertex eingedeckt.

2.2.8 Auswertung

Dokumentation

Wie bereits erwähnt, existiert für jeden TMA eine separate Liste, die an Stelle der Namen nur die Patientenummer enthält und in die die Ergebnisse eingetragen werden. Die Patientinnen sind in diesen Listen und auf dem Objektträger nach ihren Eingangsnummern sortiert, nicht nach den Therapieschemata. Dadurch weiß der Auswertende nicht, in welcher Therapiegruppe sich die Patientinnen befinden. Außerdem hat er bei der Auswertung eines Arrays keine Einsicht in die Daten der anderen drei TMA. Alle Tumorpräparate werden mit dem Mikroskop digital erfasst und gespeichert.

Bewertung der Tumore

Die Färbeergebnisse werden mit Hilfe von Score-Systemen semiquantitativ ausgewertet. Dabei muss zwischen den Hormonrezeptorfärbungen und der Färbung von Ki-67 unterschieden werden, da unterschiedliche Systeme zur Anwendung kommen.

Bei Ki-67 wird lediglich der prozentuale Anteil positiver Tumorzellen erfasst. Die Färbung gilt als positiv, wenn mehr als zehn Prozent der Zellen angefärbt werden.

Die Hormonrezeptoren werden nach dem Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner ausgewertet. Dieser erfasst sowohl den prozentualen Anteil positiver Zellkerne, als auch die Farbintensität. Der Anteil positiver Zellen kann Werte von null bis vier annehmen. Null steht für keine, eins für weniger als zehn Prozent, zwei für zehn bis fünfzig Prozent, drei für fünfzig bis achtzig Prozent, und vier für mehr als achtzig Prozent positiver Zellkerne. Die Werte für die Farbintensität haben eine Spanne von eins bis drei, wobei eins eine schwache, zwei eine mäßige und drei eine starke Intensität der Kernfärbung bedeutet. Aus der Multiplikation dieser beiden Werte ergibt sich letztendlich der IRS, der zwischen null und zwölf liegen kann.

Statistik

Chi²-Test und Signifikanzen

Um Zusammenhänge zwischen zwei Größen zu ermitteln, wird häufig eine Kontingenzanalyse mittels Chi²-Test durchgeführt. Dieser gilt dann als nicht-vertrauenswürdig, wenn mehr als 20 % der Zellen weniger als 5 Patientinnen beinhalten. In diesem Fall werden die P-Werte nicht verwendet und die Ergebnisse deskriptiv dargestellt. P-Werte werden dann als signifikant betrachtet, wenn sie kleiner 0,05 waren.

Immunhistochemie und IRS

Tumore werden dann in die Studie mit aufgenommen, wenn vor und nach der Therapie jeweils mindestens ein IRS ermittelt werden kann. Die Tumore werden

wie oben beschrieben mit dem IRS nach Remmele und Stegner ausgewertet. Nach diesem werden die Tumore von 1 bis 12 bewertet. Für diese Werte werden der Median, der Maximal- und der Minimalwert ermittelt.

Die Tumore werden nach der Rezeptorexpression auf zwei Arten in unterschiedliche Klassen eingeteilt (siehe Tab. 9). Klassifizierung 1 wird für die Untersuchung der Koexpression, der Proliferation und die Änderung der Rezeptorexpression angewendet. Hier sollten möglichst kleine Unterschiede detektiert werden. Klassifizierung 2 wird für die Analyse von Rezeptorexpression und Therapieansprechen benutzt, da in der Klinik für eine Therapieauswahl in der Regel der Hormonrezeptorstatus maßgeblich ist. Daher werden hier eher größere Gruppen untersucht.

Tab. 9: Klassifizierung der Hormonrezeptor-Expression

IRS-Werte	Klassifizierung 1	Klassifizierung 2
0	0 = negativ	0 = negativ
1 bis 3	1 = schwach positiv	1 = schwach positiv
4 bis 7	2 = mäßig positiv	1 = schwach positiv
8 bis 12	3 = stark positiv	2 = stark positiv

Koexpression der Rezeptoren

Dafür wurde eine multivariate Korrelation zwischen den einzelnen Rezeptoren durchgeführt. Da unsere HR-Klassen nicht normal-verteilt sind, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Rezeptorexpression und Proliferation

Zusammenhänge zwischen Proliferation und Rezeptorexpression wurden mittels Kontingenzanalyse untersucht (s. o.).

Änderung der HR-Expression

Eine Veränderung der HR-Expression wurde als Wechsel der Expressionsklasse definiert (nach Klassifizierung 1). Diese Veränderungen wurden getrennt nach den neoadjuvanten Therapieschemata mittels Kontingenzanalyse und Chi²-Test analysiert.

Expression und Therapieansprechen

Die Patientinnen wurden in die Gruppen „*Responder*“ und „*Nonresponder*“ unterteilt. Diese Untergruppen wurden bezüglich ihrer Rezeptorexpressionsklassen (nach Klassifizierung 2) mit dem Chi²-Test untersucht.

Expressionsänderung und Therapieansprechen

Ähnlich wie oben wurden die Tumore in *Responder* und *Nonresponder* unterteilt. Jetzt wurden diese Größen aber in Verbindung mit der Veränderlichkeit der Rezeptor-Expressionsstärke (Abnahme, Stabilität, Zunahme der Expression) betrachtet. Dies wurde ebenfalls mit einer Kontingenzanalyse umgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Studiendesign

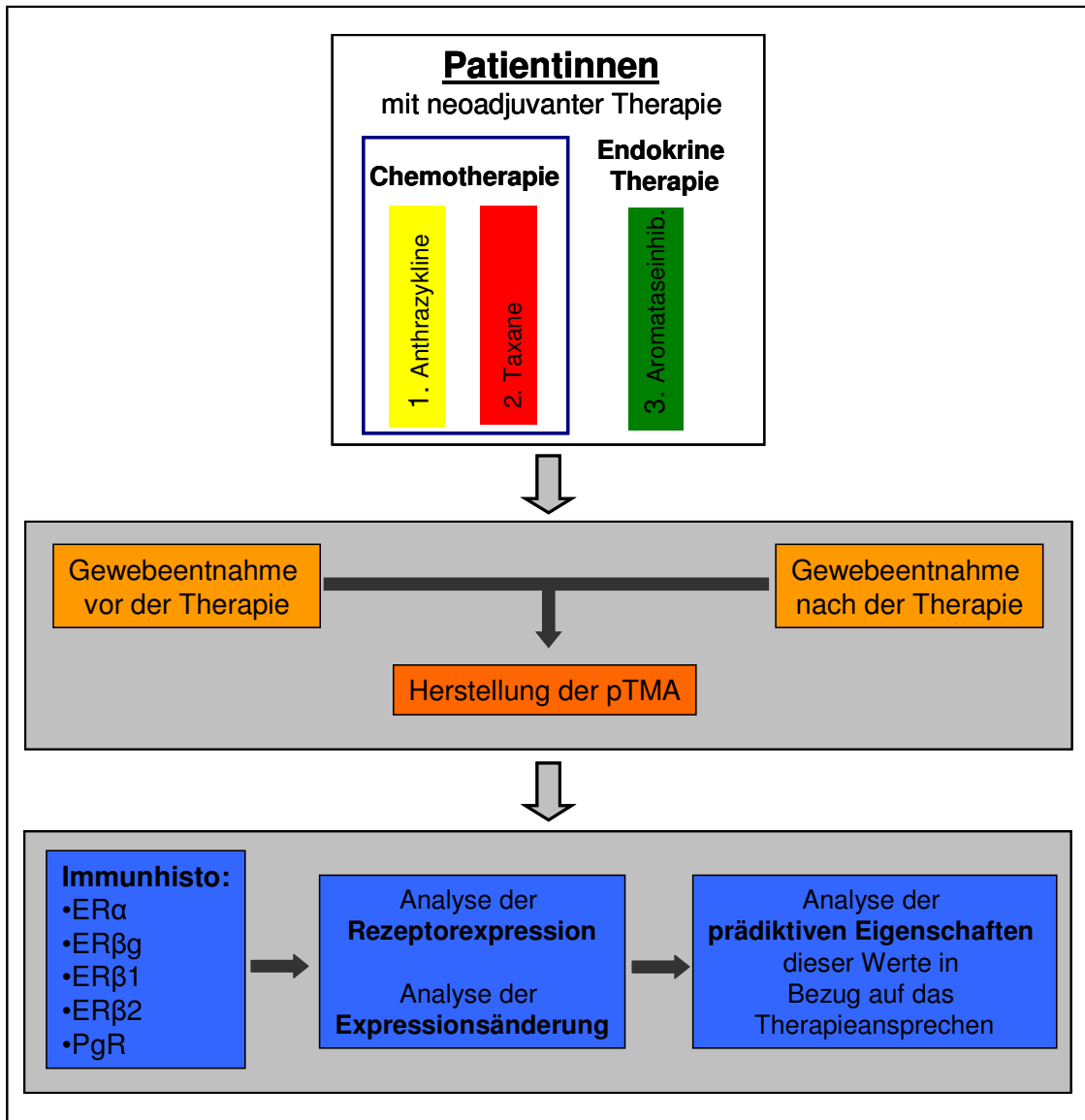


Abb. 7: Studiendesign

Die Proben wurden nach dem Medikament der neoadjuvanten Therapie in drei Gruppen unterteilt. Jeder Patientin wurde vor und nach der Therapie Gewebe entnommen. Aus diesem wurden Paraffin-Tissue-Microarrays hergestellt, an denen die Proteinexpression von ERα, ERβg, ERβ1, ERβ2 und PgR immunhistochemisch ermittelt wurde. Außerdem wurde untersucht, ob sich im Therapieverlauf die Proteinexpression dieser Rezeptoren ändert. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob die Rezeptorexpression oder die Rezeptorexpressions-Änderung als prädiktive Werte für ein Therapieansprechen geeignet sind. Abkürzungen: pTMA = Paraffin-Tissue-Microarray, ERα = Östrogenrezeptor α, ERβg = Östrogenrezeptor β gesamt, ERβ1 = Östrogenrezeptor β1, ERβ2 = Östrogenrezeptor β2, PgR = Progesteronrezeptor.

In der Studie wurden Mammakarzinom-Patientinnen untersucht, die eine neoadjuvante, systemische Therapie erhielten. Anhand der verabreichten Medikamente konnten die Patientinnen zunächst in eine Chemotherapie-Gruppe (Medikamente: Anthrazykline oder Taxane) und eine endokrine Therapiegruppe (Medikament: Aromataseinhibitor) unterteilt werden. Die Chemotherapie-Gruppe wiederum bestand aus zwei Untergruppen (1. Anthrazykline, 2. Taxane).

Sowohl vor als auch nach der systemischen Therapie wurde den Patientinnen Tumorgewebe entnommen, aus welchem Paraffin-*Tissue-Microarrays* (pTMA) für die immunhistochemische Untersuchung hergestellt wurden.

Diese pTMA dienten zur immunhistochemischen Analyse der Expression und der Expressionsänderung von Östrogenrezeptor α , Östrogenrezeptor β gesamt, Östrogenrezeptor $\beta 1$, Östrogenrezeptor $\beta 2$ und Progesteronrezeptor. Diese Größen wurden bezüglich ihrer Eignung als prädiktive Marker für das Therapieansprechen geprüft (siehe Abb. 7).

3.2 Übersicht über die Gliederung der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden getrennt nach Rezeptoren in der hier angegebenen Reihenfolge dargestellt: ER α , ER β g, ER $\beta 1$, ER $\beta 2$ und PgR.

Für jeden einzelnen Rezeptor wurden folgende Themen bearbeitet:

1) Charakteristik der Immunhistochemie und IR-Score, 2) Einteilung in Klassen der Expressionsstärke (0 bis 3) gemäß dem IRS, 3) Koexpression der Hormonrezeptoren, 4) Zusammenhänge zwischen Rezeptorexpression und Proliferation (Expression von Ki-67), 5) Änderung der Rezeptorexpression im Therapieverlauf, 6) Hormonrezeptorexpression und Änderung der Hormonrezeptorexpression als Vorhersagewerte für das Therapieansprechen (siehe Abb. 8), 7) Rezeptorprofile für *Responder* und *Nonresponder*.

<u>Gliederung der Ergebnisse</u>	
Untersuchte Rezeptoren	Ermittelte Größen
<ul style="list-style-type: none"> •ERα •ERβ_g •ERβ₁ •ERβ₂ •PgR 	<p>Für alle Rezeptoren wurden folgende Größen in der angegebenen Reihenfolge ermittelt:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Immunhistochemie und IRS •Koexpression der Rezeptoren •Rezeptorexpression und Proliferation •Änderung der Rezeptorexpression •Expression und Therapieansprechen •Expressionsänderung und Therapieansprechen <hr style="border: 1px solid red;"/> <p style="text-align: center;">Erstellung von Expressionsprofilen für <i>Responder und Nonresponder</i></p>

Abb. 8: Gliederung der Ergebnisse

Die Abbildung zeigt die Bearbeitungsreihenfolge der Hormonrezeptoren. Jeder Rezeptor wurde in Bezug auf Charakteristik der Immunhistochemie und IR-Score, Koexpressionen der Hormonrezeptoren, Zusammenhänge zwischen Rezeptorexpression und Proliferation, Änderung der Rezeptorexpression im Therapieverlauf, Hormonrezeptorexpression und Veränderung der Hormonrezeptorexpression als Vorhersagewert für das Therapieansprechen untersucht.

Abkürzungen: ER α = Östrogenrezeptor α , ER β _g = Östrogenrezeptor β gesamt, ER β ₁ = Östrogenrezeptor β ₁, ER β ₂ = Östrogenrezeptor β ₂, PgR = Progesteronrezeptor, IRS = Immunreaktiver Score.

3.3 Östrogenrezeptor α **3.3.1 Immunhistochemie und IRS**

Die Expression von ER α stellte sich immunhistochemisch nur in den Kernen von Epithelzellen dar (siehe Abb. 22). 55 Tumore (79,7 %) waren ER α -positiv, 14 (20,3 %) ER α -negativ. Die Hormonrezeptor-Expression wurde mit dem IRS quantifiziert. Der Median für ER α lag bei 8 mit einem Maximalwert von 12 und einem Minimalwert von 0. Nach Einteilung in Expressionsklassen waren 14 Proben (20,3 %) negativ, 4 (5,8 %) schwach, 4 (5,8 %) mäßig und 47 (68,1 %) stark positiv für ER α (siehe Abb. 21).

3.3.2 Hormonrezeptor-Koexpression

Die Expressionen von ER α und PgR zeigten eine signifikante Korrelation ($r = 0,58$, $p < 0,0001$). Dies galt jedoch nicht für ER α und die anderen Hormonrezeptoren.

3.3.3 Östrogenrezeptor α und Proliferation

Unabhängig von der HR-Expression war zu erkennen, dass nach der Therapie weniger Tumore proliferierten als vor der Therapie. Von 69 Tumoren proliferieren vor der Therapie 45, nach der Therapie nur noch 23 Tumore.

Der Anteil an proliferierenden Tumoren vor der Therapie war bei ER α -negativen größer als bei ER α -positiven. 32 von 55 (58,2 %) der ER α -positiven und 13 von 14 (92,9 %) der ER α -negativen Tumore waren positiv für Ki-67 ($Chi^2 = 7,1$, $p = 0,007$). Dieser Unterschied war nach der Therapie noch deutlicher zu erkennen. 10 von 50 (20,0 %) der ER α -positiven und 14 von 18 (77,7 %) der ER α -negativen Karzinome proliferierten ($Chi^2 = 17,2$; $p < 0,0001$) (siehe Abb. 9).

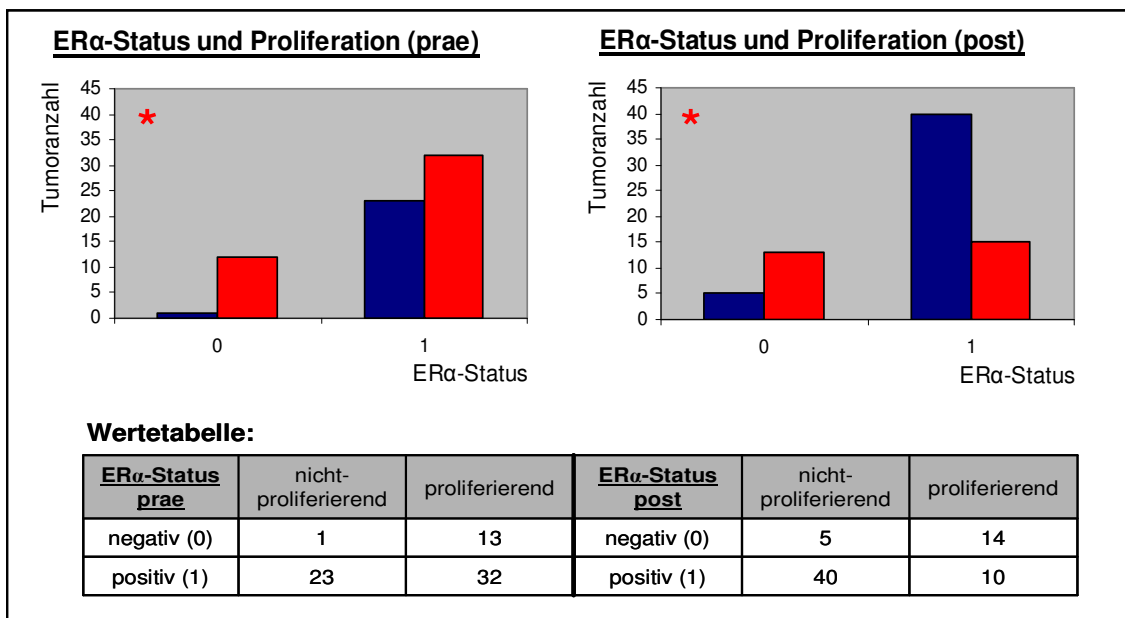


Abb. 9: ER α -Status und Proliferation

ER α -positive Mammakarzinome proliferieren relativ gesehen seltener als ER α -negative. Dies zeigt sich besonders deutlich nach der Therapie.

Erläuterung: blau = nicht proliferierend, rot = proliferierend, * = signifikant. Abkürzungen: ER α = Östrogenrezeptor α , 0 = ER α -negativ, 1 = ER α -positiv, prae = vor der Therapie, post = nach der Therapie.

3.3.4 Änderung der ER α -Expression

Die Analyse der Expressionsentwicklung von ER α im Verlauf der Therapie machte deutlich, dass die ER α -Expression überwiegend stabil ist. Dies trifft für die Gesamtheit der Tumore und für alle Therapie-Untergruppen zu (siehe Abb. 10)

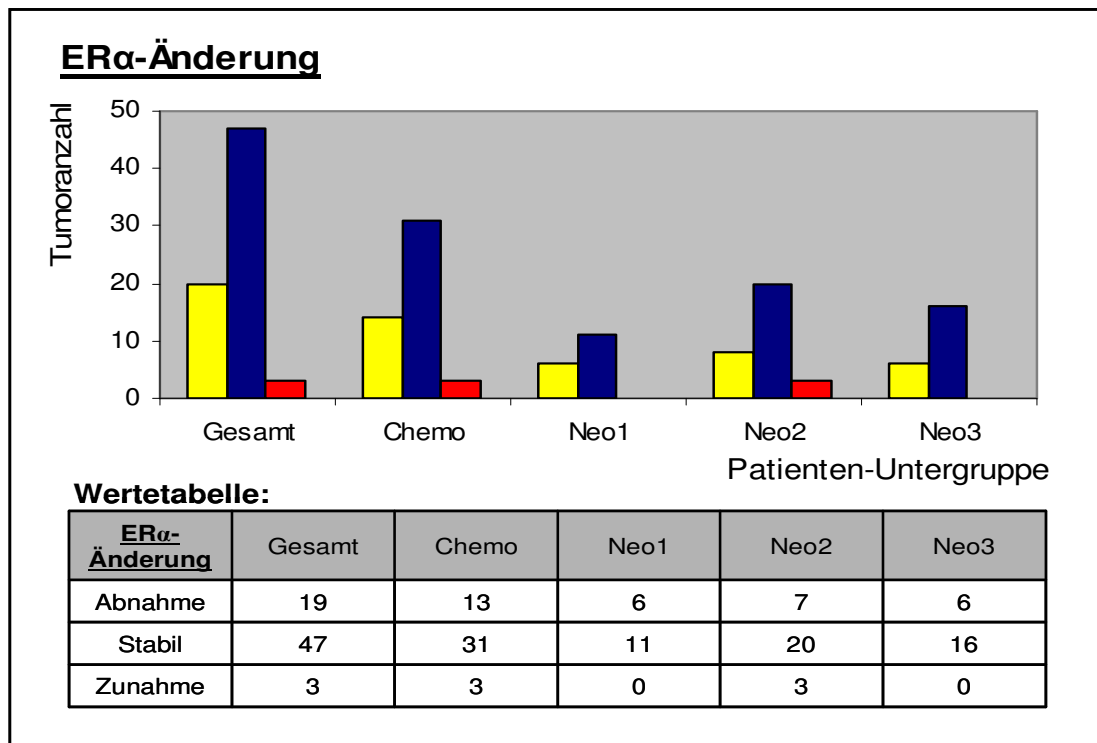


Abb. 10: Entwicklung von ER α im Therapieverlauf

ER α zeigt sich im Verlauf der neoadjuvanten Therapie stabil. Dies trifft sowohl für die Gesamtheit, als auch für alle Therapieuntergruppen zu.

Erläuterung: gelb = Abnahme, blau = stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: ER α = Östrogenrezeptor α , Gesamt: alle Tumore, Chemo = Chemotherapie-Untergruppe, Neo1 = Anthrazyklin-Gruppe, Neo2 = Taxan-Gruppe, Neo3 = endokrine Gruppe.

3.3.5 ER α -Expression und Therapieansprechen

In der Analyse von Rezeptorexpression und Therapieansprechen waren keine eindeutigen Ergebnisse oder Tendenzen zu erkennen.

3.3.6 Änderung der ER α -Expression und Therapieansprechen

Für ER α wurde in der Chemotherapie-Gruppe tendenziell eine stärkere Abnahme bei *Respondern* ermittelt. So wiesen 11 von 27 (40,7 %) *Respondern* eine Abnahme auf, wohingegen das nur bei 2 von 20 (10 %) *Nonrespondern* der Fall war. Deutlich zu erkennen war dies auch in dem Kollektiv, das Anthrazykline als Therapie erhielt. Hier zeigten 6 von 12 (50 %) der *Responder* eine Abnahme von ER α jedoch keiner der *Nonresponder* (Siehe Abb. 11). Für die endokrine Therapiegruppe waren keine Ergebnisse oder Tendenzen auszumachen.

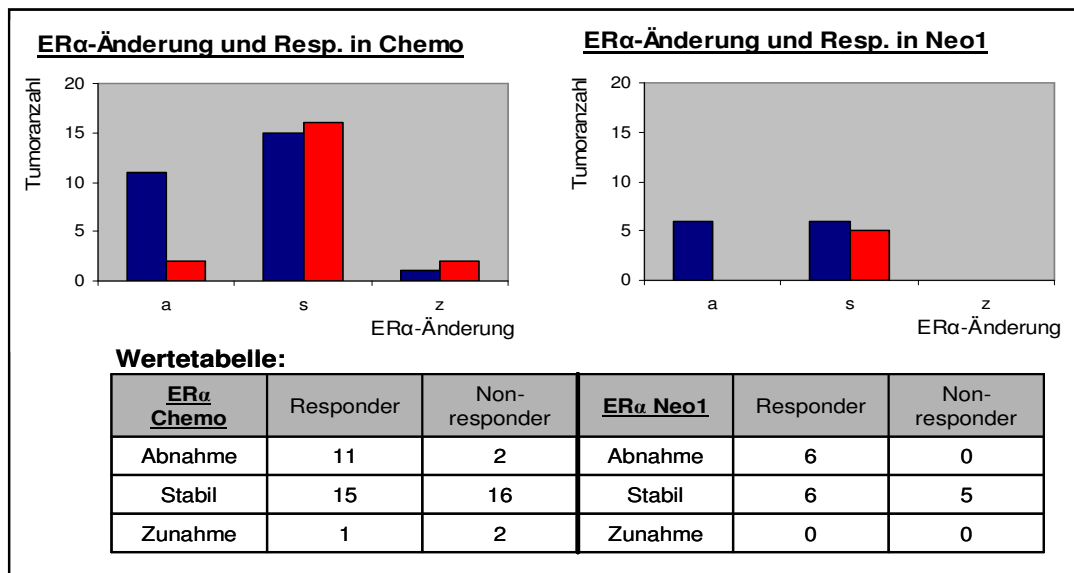


Abb. 11: ER α -Entwicklung und Therapieansprechen

Es zeigte sich in der Chemotherapie-Gruppe und in der Anthrazyklin-Gruppe tendenziell eine stärkere Abnahme der ER α -Expression bei *Respondern*.

Erläuterung: blau = *Responder*, rot = *Nonresponder*. Abkürzungen: ER α = Östrogenrezeptor α , Resp. = *Response*, Chemo = Chemotherapie-Gruppe, Neo1 = Anthrazyklin-Gruppe.

3.4 Östrogenrezeptor β gesamt

3.4.1 Immunhistochemie und IR-Score

Bei der Immunhistochemie von ER β g wurde, anders als bei ER α , in manchen Tumoren zusätzlich zu den Kernen auch das Zytoplasma angefärbt. Außerdem konnte ER β g in Fibroblasten und inflammatorischen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 22).

Die Quantifizierung von ERβg mittels IRS resultiert in einem Median von 12 bei einem Maximalwert von 12 und einem Minimalwert von 0. Bei der Gruppierung nach der Expressionsstärke wurde ein Tumor (1,5 %) als negativ, 6 (8,7 %) als schwach, 11 (15,9 %) als mäßig und 51 (73,9 %) als stark positiv gewertet (siehe Abb. 21).

3.4.2 Hormonrezeptor-Koexpression

Für die Koexpression von ERβg mit anderen Hormonrezeptoren ergaben sich signifikante Korrelationen mit ERβ1 ($r = 0,4$, $p = 0,0008$) und mit ERβ2 ($r = 0,38$, $p = 0,0013$), nicht jedoch mit ERα und PgR.

3.4.3 ERβgesamt-Expression und Proliferation

Bei der Analyse von ERβg und Ki-67 wurden Tumore mit hohen ERβg-Werten nach der Therapie häufiger als nicht-proliferierend eingestuft. Tumore mit geringer ERβg-Expression zeigten dagegen häufig eine Proliferationsaktivität ($Chi^2 = 10,0$, $p = 0,0016$) (siehe Abb. 12). Dies war vor der Therapie nicht zu beobachten. Hier zeigten sich die Tumore unabhängig von der Expressionsstärke häufiger positiv für den Proliferationsmarker Ki-67.

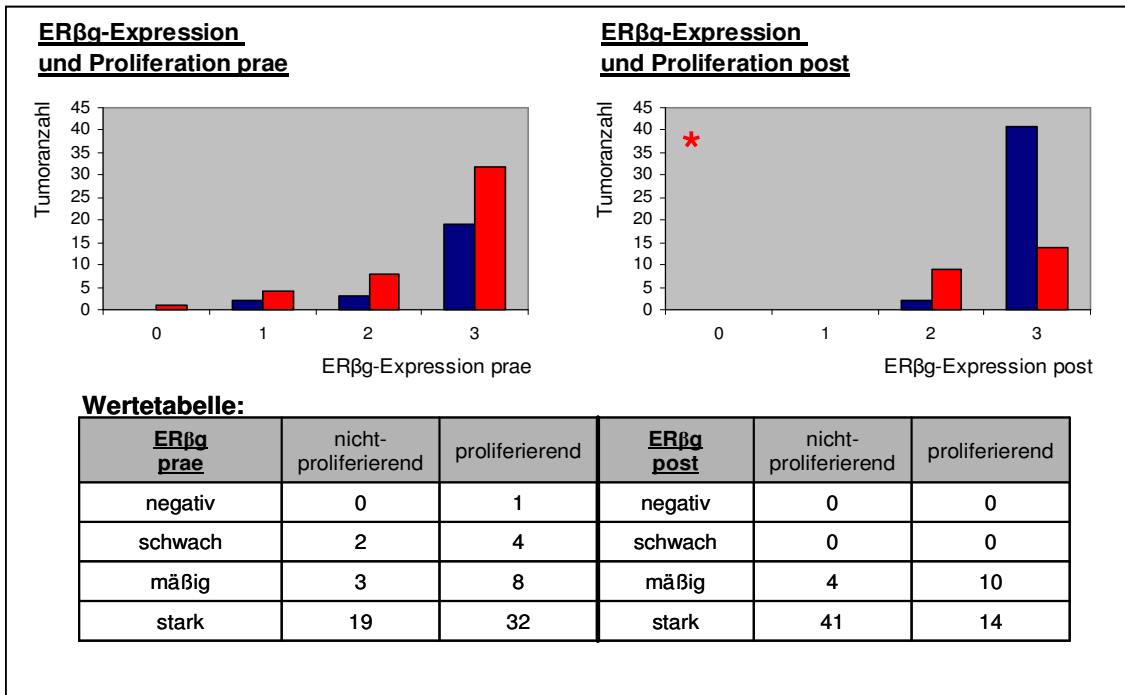


Abb. 12: ERβg-Expression und Proliferation

Nach der Therapie wurden Tumore, die ERβg stark exprimieren, häufiger als nicht-proliferierend klassifiziert, als das bei mäßiger Expression der Fall ist. Dies war allerdings vor der Therapie nicht zu beobachten.

Erläuterung: blau = nicht proliferierend, rot = proliferierend, * = signifikant. Abkürzungen: ERβg = Östrogenrezeptor β gesamt, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = mäßig positiv, 3 = stark positiv, prae = vor der Therapie, post = nach der Therapie.

3.4.4 Änderung der ERβgesamt-Expression

Im Vergleich zu den anderen Gruppen wurde die Expression von ERβg während der endokrinen Therapie (Neo3) häufiger als stabil gewertet (20 der 22 Tumore). Bei den mit Anthrazyklinen (Neo1) behandelten Patientinnen waren Stabilität und Abnahme ähnlich häufig. In der Taxan-Gruppe (Neo2) verhielt sich die Mehrzahl der Tumore ebenfalls stabil, allerdings wurden Ab- und Zunahme häufiger ermittelt als in der endokrinen Gruppe (siehe Abb. 13).

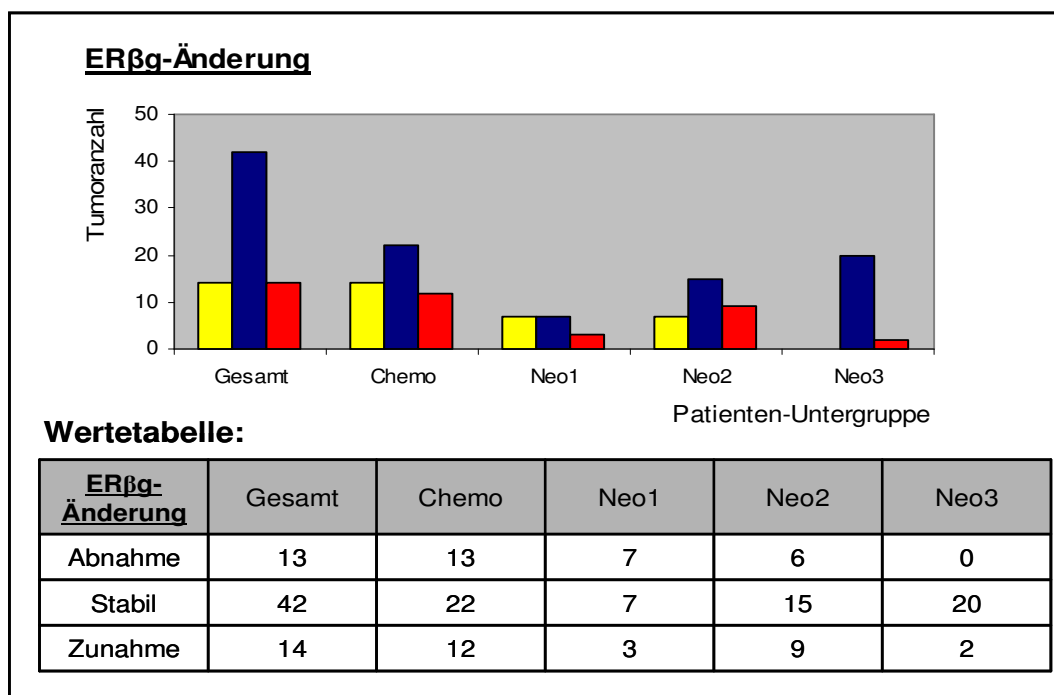


Abb. 13: ERβg-Entwicklung im Therapieverlauf

Im Vergleich zu den anderen Therapieschemata wurde ERβg im Verlauf der endokrinen Therapie häufiger als stabil gewertet.

Erläuterung: gelb = Abnahme, blau = stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: ERβg = Östrogenrezeptor β gesamt, Gesamt: alle Tumore, Chemo = Chemotherapie-Untergruppe, Neo1 = Anthrazyklin-Gruppe, Neo2 = Taxan-Gruppe, Neo3 = endokrine Gruppe, a = Abnahme, s = Stabil, z = Zunahme.

3.4.5 ERβgesamt-Expression und Therapieansprechen

Zunächst wurde die Chemotherapie-Gruppe untersucht. Hier war ERβg bei *Respondern* tendenziell stärker exprimiert als bei *Nonrespondern*.

Von den *Respondern* hatten 22 von 27 (81,4 %) eine starke ERβg-Expression (Klasse 2), wohingegen von den *Nonrespondern* nur 10 von 20 (50 %) eine starke Expression aufwiesen. Bei weitergehender Untersuchung der Chemotherapie-Untergruppen wurde ersichtlich, dass in dem Patientenkollektiv, das mit Anthrazyklinen behandelt wurde (Neo1), ähnliche Tendenzen auszumachen sind. So zeigten 11 von 12 (91,6 %) der *Responder* und 3 von 5 (60,0 %) der *Nonresponder* hohe ERβg-Werte (siehe Abb. 14). In der AI-Gruppe (Neo3) war kein solcher Sachverhalt zu erkennen.

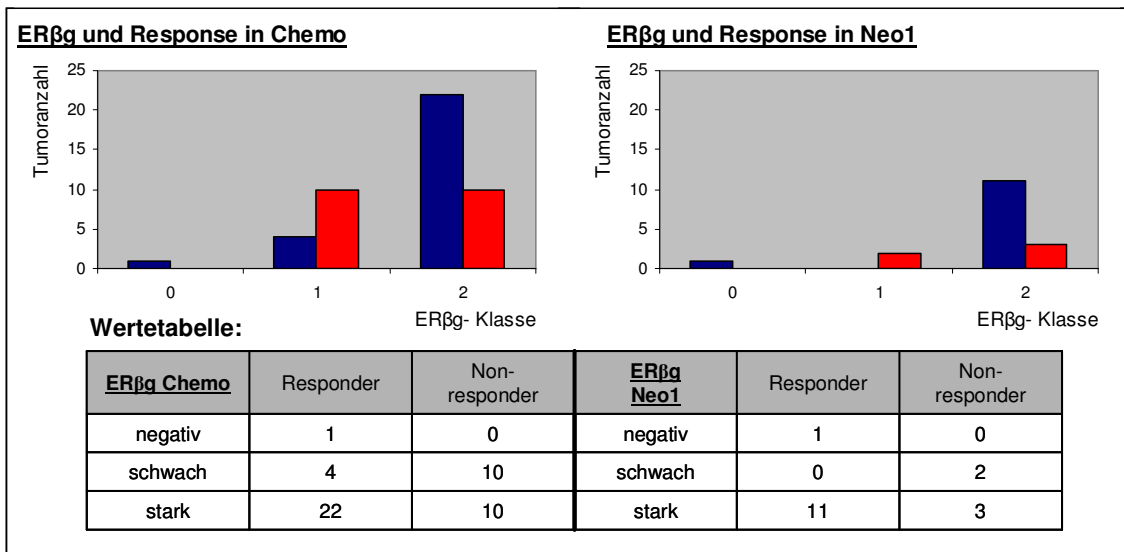


Abb. 14: ERβg-Expression und Therapieansprechen

Responder der Chemotherapie zeigten häufiger eine starke ERβg-Expression. Ähnliches war auch in der Anthrazyklin-Gruppe zu erkennen.

Erläuterung: blau = Responder, rot = Nonresponder. Abkürzungen: ERβg = Östrogenrezeptor β gesamt, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = stark positiv, Chemo = Chemotherapiegruppe, Neo1 = Anthrazyklin-Gruppe.

3.4.6 Änderung der ERβg-Expression und Therapieansprechen

Es konnten keine Ergebnisse oder Tendenzen diesbezüglich beobachtet werden.

3.5 Östrogenrezeptor β1

3.5.1 Immunhistochemie und IR-Score

Die Immunhistochemie von ERβ1 zeigte wie die von ERβg bei manchen Tumoren zusätzlich zur Kernexpression auch eine zytoplasmatische Färbung. ERβ1 war ebenfalls in Fibroblasten und Entzündungszellen nachzuweisen (siehe Abb. 22).

Der Median für die IRS-Werte von ERβ1 lag bei 8 mit einem Maximum von 12 und einem Minimum von 0. Bei der Gruppeneinteilung wurden 2 Tumore (2,9 %) als negativ, 8 (11,6 %) als schwach, 16 (23,2 %) als mäßig und 43 (62,3 %) als stark positiv gewertet (siehe Abb. 21).

3.5.2 Hormonrezeptor-Koexpression

ERβ1 zeigte signifikante Korrelationen mit ERβg ($r = 0,4$, $p = 0,0008$) und ERβ2 ($r = 0,35$, $p = 0,0031$). Das galt jedoch nicht für ERβ1 und ERα und für ERβ1 und PgR.

3.5.3 ERβ1-Expression und Proliferation

Es waren keine klaren Zusammenhänge zwischen der Expression von ERβ1 und dem Proliferationsverhalten der Tumore erkennbar.

3.5.4 Änderung der ERβ1-Expression

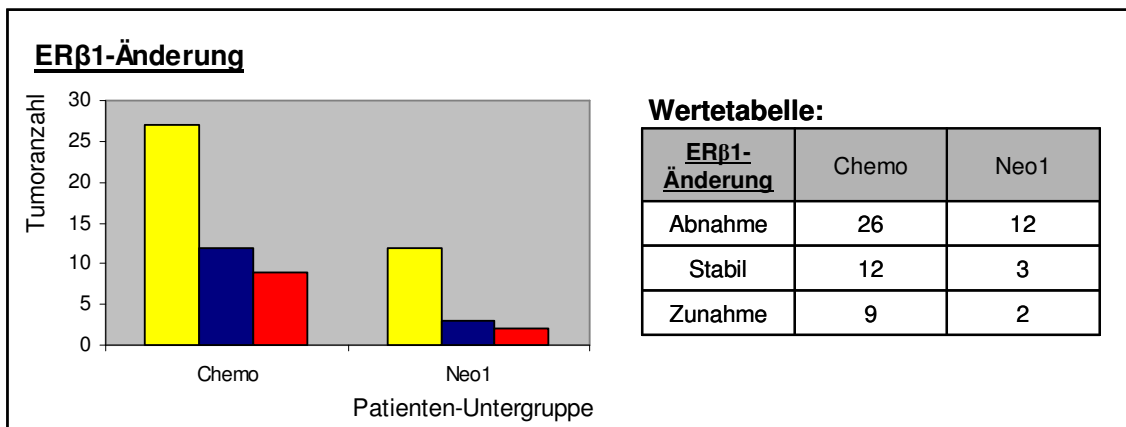


Abb. 15: Änderung der ERβ1-Expression im Therapieverlauf

Im Therapieverlauf wurde für ERβ1, verglichen mit den anderen Rezeptoren, häufiger eine Abnahme der Expression ermittelt. Das galt vor allem für die Chemotherapie- und die Anthrazyklin-Gruppe.

Erläuterung: gelb = Abnahme, blau = stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: ERβ1 = Östrogenrezeptor 1, Chemo = Chemotherapie-Untergruppe, Neo1 = Anthrazyklin-Gruppe.

Bei der Analyse der ERβ1-Entwicklung zeigte sich eine stärkere Abnahme der Rezeptorexpression als bei den anderen Rezeptoren. Besonders auffallend war das in der Chemotherapie-Gruppe. Von 47 Patientinnen wurde bei 26 (55,3 %) eine Abnahme, bei 12 (25,5 %) eine Stabilität und bei 9 (19,1 %) eine Zunahme von ERβ1 festgestellt. Das war in der Untergruppe, die eine Therapie mit Anthrazyklinen erhielt (Neo1), noch deutlicher zu erkennen. Hier zeigten 12 von 17 Patientinnen (70,6 %) eine Abnahme der ERβ1 Expression (siehe Abb. 15).

In der Patientengruppe, die eine endokrine Therapie erhielt (Neo3), waren keine auffallenden Tendenzen zu beobachten.

3.5.5 ER β 1-Expression / ER β 1-Änderung und *Response*

In Bezug auf die ER β 1-Expressionsstärke bzw. die ER β 1-Expressionsänderung waren in keiner der Therapiegruppen Unterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* zu erkennen.

3.6 Östrogenrezeptor β 2

3.6.1 Immunhistochemie und IRS

Bei der Immunhistochemie war wie bei ER β g und ER β 1 in manchen Tumoren zusätzlich zur Kernexpression auch eine zytoplasmatische Färbung zu sehen. ER β 2 konnte ebenfalls in Fibroblasten und inflammatorischen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 22).

Bei der Ermittlung des IRS für Östrogenrezeptor β 2 wurde ein Median von 4 errechnet bei einem Maximalwert von 12 und einem Minimalwert von 1. Die Gliederung in Gruppen ergab folgendes Ergebnis: kein Tumor war negativ, 6 (8,7 %) waren schwach, 30 (43,5 %) mäßig und 33 (47,8 %) waren stark positiv (siehe Abb. 21).

3.6.2 Hormonrezeptor-Koexpression

Für die Koexpression von ER β 2 mit anderen Hormonrezeptoren ergaben sich signifikante Korrelationen mit ER β g ($r = 0,38$, $p = 0,0013$) und ER β 1 ($r = 0,35$, $p = 0,0031$), nicht jedoch mit ER α und PgR.

3.6.3 ER β 2-Expression und Proliferation

Die Proliferationsanalyse ergab unter Berücksichtigung der ER β 2-Expression, dass bei schwacher ER β 2-Expression alle Tumore positiv für den

Proliferationsmarker Ki-67 waren (siehe Abb. 16). Im Gegensatz dazu proliferierten bei mäßiger Expression 21 von 30 (70,0 %) und bei starker Expression nur 18 von 33 (54,6 %) Tumore.

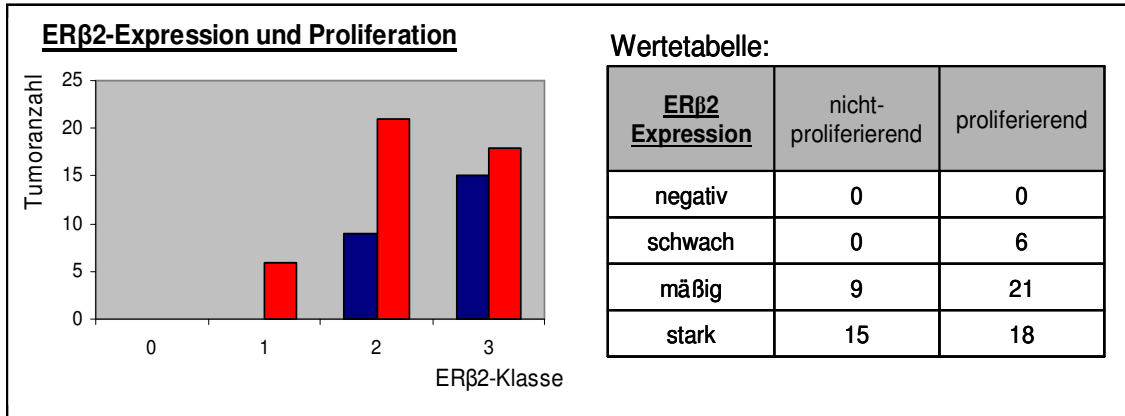


Abb. 16: ERβ2-Expression und Proliferation

Es wurde deutlich, dass der Anteil proliferierender Tumore mit steigender Rezeptorexpression abnimmt.

Erläuterung: blau = nicht proliferierend, rot = proliferierend. Abkürzungen: ERβ2 = Östrogenrezeptor β2, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = mäßig positiv, 3 = stark positiv.

3.6.4 Änderung der ERβ2-Expression

Bei der Analyse der ERβ2-Expressionsänderung konnte in allen Therapie-Untergruppen beobachtet werden, dass dieser häufig stabil ist, wobei eine Abnahme in ähnlicher Häufigkeit zu verzeichnen ist (siehe Abb. 17).

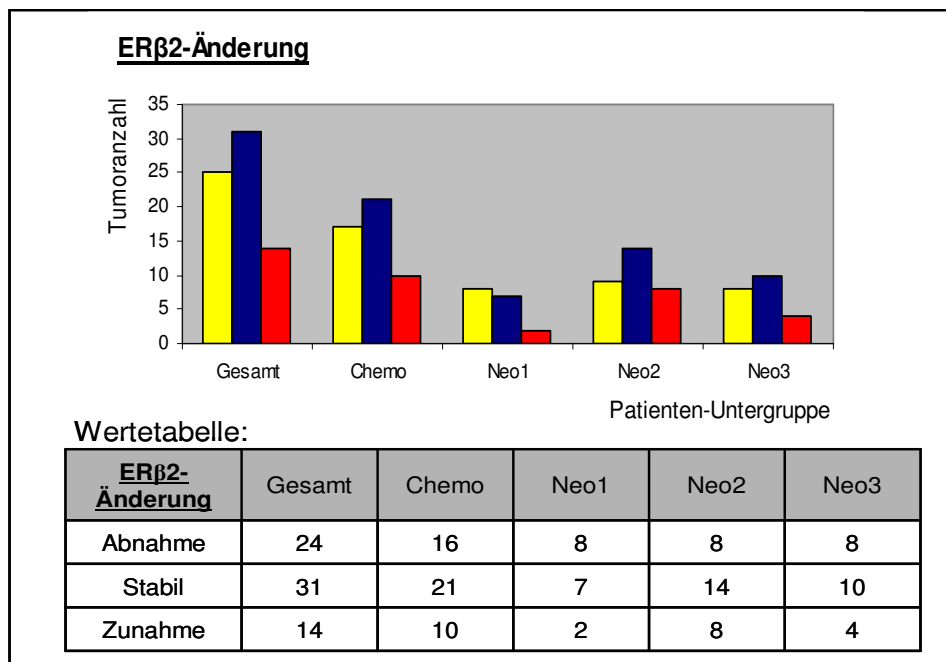


Abb. 17: ERβ2-Entwicklung im Therapieverlauf

Die Rezeptorexpression wird meistens als stabil klassifiziert. Allerdings ist eine ERβ2-Abnahme auch häufig zu beobachten.

Erläuterung: gelb = Abnahme, blau = stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: ERβ2 = Östrogenrezeptor 2, Chemo = Chemotherapie-Untergruppe, Neo1 = Anthrazyklin-Gruppe, Neo2 = Taxan-Gruppe, Neo3 = endokrine Gruppe.

3.6.5 ERβ2-Expression und Therapieansprechen

Responder in der Chemotherapie-Gruppe exprimierten ERβ2 häufig stärker als *Nonresponder*. Bei den *Nonrespondern* wurden von 20 Proben nur 6 (30 %) als stark positiv klassifiziert. Dagegen waren von 27 *Respondern* 14 (51,9 %) stark positiv für ERβ2. Die gleichen Tendenzen waren in der Chemotherapie-Untergruppe zu beobachten, die mit Taxanen behandelt wurde (Neo2). Diese Gruppe bestand aus 30 Patientinnen, wobei jeweils 15 ansprachen und 15 resistent waren. Von den *Nonrespondern* waren 3 (20,0 %) als stark klassifiziert

worden, wohingegen bei den *Respondern* 6 Tumore (40,0 %) eine starke ERβ2-Expression aufwiesen (siehe Abb. 18). Für die endokrine Gruppe (Neo3) waren keine auffälligen Tendenzen zu beobachten.

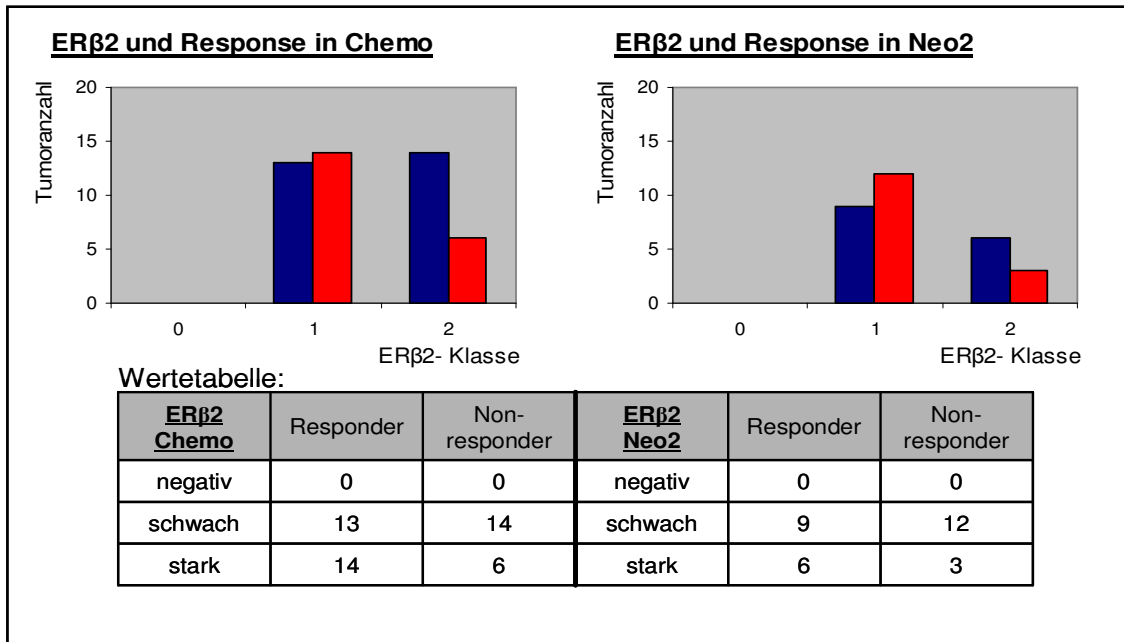


Abb. 18: ERβ2-Expression und Therapieansprechen

Für die *Responder* wurden häufiger starke, für die *Nonresponder* häufiger schwache ERβ2-Expressionen ermittelt. Das gilt sowohl für die Chemotherapie-Gruppe als auch für die Taxan-Gruppe.

Erläuterung: blau = *Responder*, rot = *Nonresponder*. Abkürzungen: ERβ2 = Östrogenrezeptor β2, Chemo = Chemotherapie-Gruppe, Neo2 = Taxan-Gruppe, 0 = negativ, 1 = schwach positiv, 2 = stark positiv.

3.6.6 Änderung der ERβ2-Expression und Therapieansprechen

Bei der Entwicklung von Östrogenrezeptor β2 im Verlauf der Chemotherapie zeigte sich, dass dieser bei *Respondern* signifikant häufiger abnimmt, wohingegen *Nonresponder* meist eine stabile ERβ2-Expression aufweisen. Von 27 *Respondern* der Chemotherapiegruppe nahm ERβ2 bei 13 (48,2 %) ab. Von den 20 *Nonrespondern* war nur in 3 Fällen (15 %) eine Abnahme zu verzeichnen ($Chi^2 = 6,1$, $p = 0,047$) (siehe Abb. 19). In der Analyse der Chemotherapie-Untergruppen war ein analoger Sachverhalt bei den Patientinnen zu beobachten, die mit Taxanen therapiert wurden. Diese Gruppe bestand aus 30 Patientinnen, die sich je zur Hälfte in resistent und sensibel unterteilen ließ. 7 (46,7 %) der *Responder* und 1 (6,7 %) der *Nonresponder*

nahmen in ihrer ERβ2-Expression ab. Eine Zunahme war in 3 (20,0 %) der sensiblen und 5 (33,3 %) der resistenten Tumoren festzustellen (siehe Abb. 19).

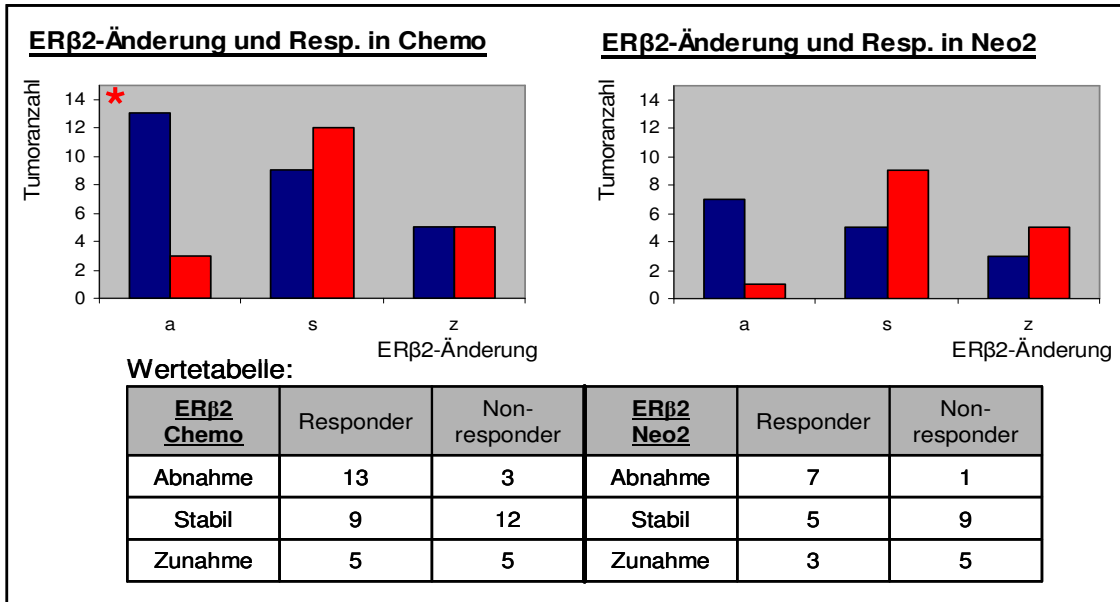


Abb. 19: ERβ2-Veränderung und Therapieansprechen

Responder der Chemotherapie zeigten häufiger eine Abnahme der ERβ2-Expression. Ähnliches war auch in der Taxan-Gruppe zu erkennen.

Erläuterung: blau = Responder, rot = Nonresponder, * = signifikant. Abkürzungen: ERβ2 = Östrogenrezeptor β 2, a = Abnahme, s = Stabil, z = Zunahme, Chemo = Chemotherapiegruppe, Neo2 = Taxan-Gruppe.

3.7 Progesteronrezeptor

3.7.1 Immunhistochemie und IRS

Der PgR ist wie ER α ausschließlich in Kernen von Epithelzellen zu detektieren. Der Median der IRS-Werte lag bei 4 mit einem Maximum von 12 und einem Minimum von 0. Bei der Gruppeneinteilung wurden 3 (4,3 %) als negativ, 22 (31,9 %) als schwach, 22 (31,9 %) als mäßig und 22 (31,9 %) als stark positiv gewertet (siehe Abb. 21 und 22).

3.7.2 Hormonrezeptor-Koexpression

Bei Betrachtung der Koexpression von PgR mit anderen Rezeptoren war eine statistisch auffällige Korrelation zwischen PgR und ER α ersichtlich ($r = 0,58$, $p < 0,0001$), nicht jedoch zwischen PgR und den ER β -Isoformen.

3.7.3 PgR-Expression und Proliferation

Es wurden keine Tendenzen bezüglich Progesteronrezeptor-Expression und Proliferation beobachtet.

3.7.4 Änderung der PgR-Expression

Die Proteinexpression von PgR nahm in allen Therapie-Untergruppen ab, am deutlichsten bei den Patientinnen, die mit Aromataseinhibitoren (Neo3) behandelt wurden. Bei 11 von 17 (64,7 %) Patientinnen in Gruppe 1, 19 von 31 (61,3 %) in Gruppe 2 und 17 von 22 (77,3 %) in Gruppe 3 reduzierte sich die Progesteronrezeptor-Expression (siehe Abb.20). Eine Abnahme von PgR war bei prämenopausalen Frauen tendenziell häufiger zu beobachten als bei postmenopausalen Patientinnen.

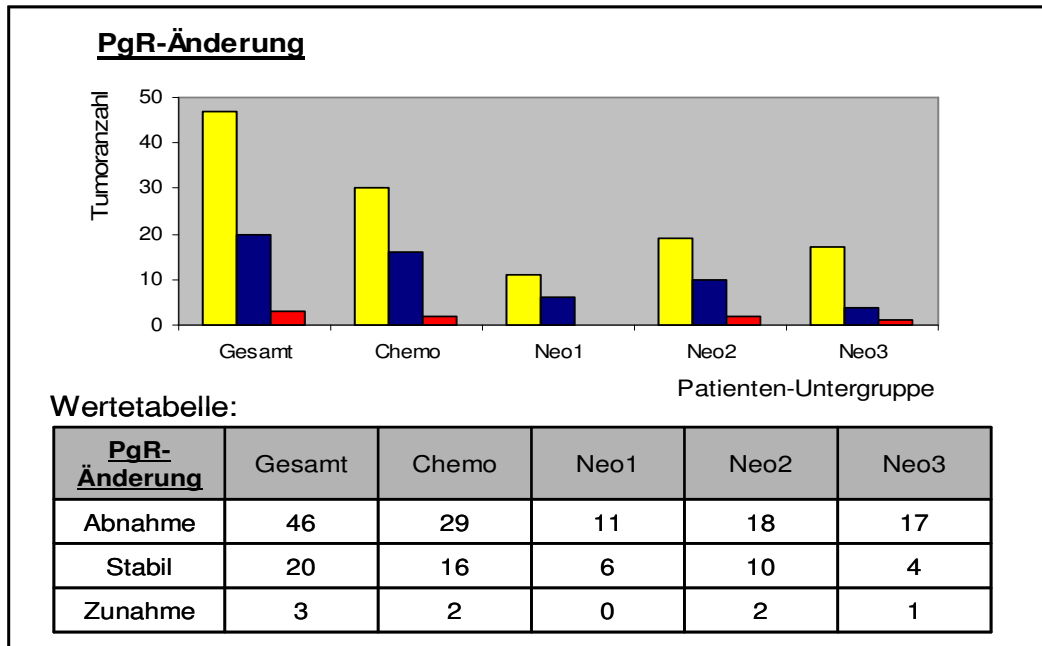


Abb. 20: PgR-Entwicklung im Therapieverlauf

Die Rezeptorexpression nahm in allen Therapie-Untergruppen ab.

Erläuterung: gelb = Abnahme, blau = stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: PgR = Progesteronrezeptor, Chemo = Chemotherapie-Untergruppe, Neo1 = Anthrazyklin-Gruppe, Neo2 = Taxan-Gruppe, Neo3 = endokrine Gruppe

3.7.5 PgR-Expression / PgR-Expressionsänderung und *Response*

Bezüglich der PgR-Expression bzw. der PgR-Expressionsänderung konnten keine Unterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* festgestellt werden.

3.8 Übersichtsabbildungen

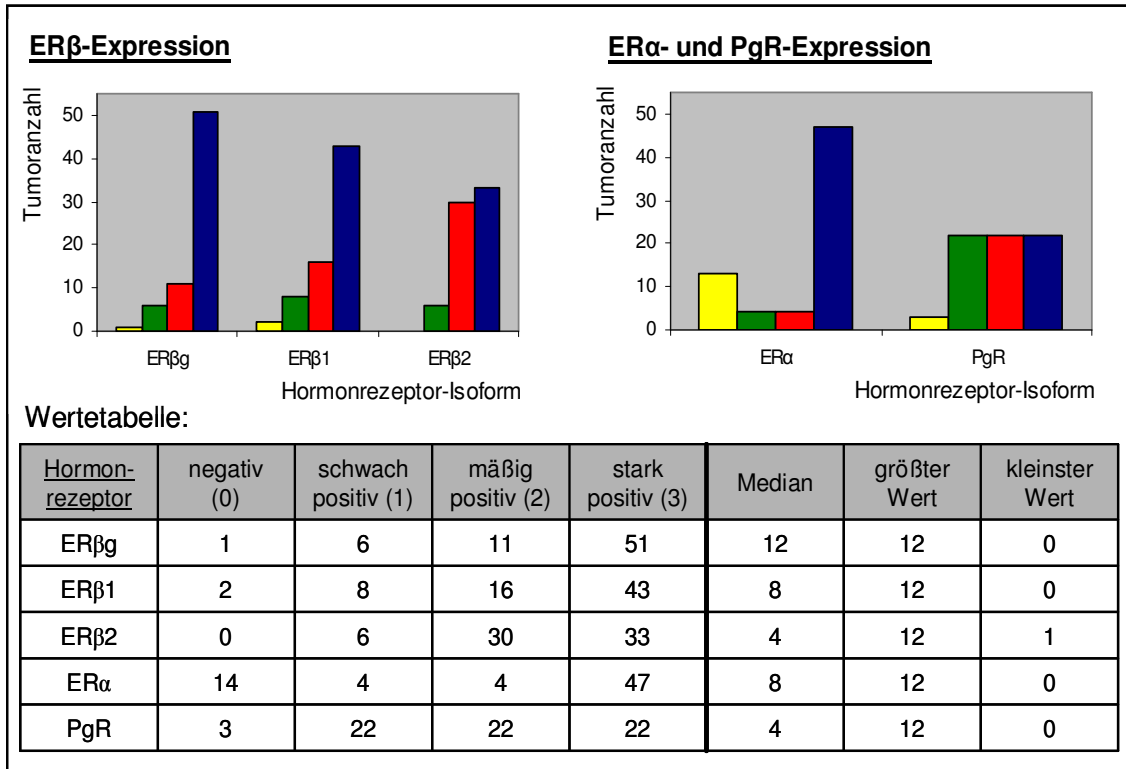


Abb. 21: Übersicht über die Hormonrezeptorexpression

Die ER β -Isoformen zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster von negativ, schwach, mäßig und stark positiv. Bei ihnen dominierte eine starke Expression. ER α war ebenfalls überwiegend stark exprimiert. Auffallend war allerdings, dass schwache und mäßige Expressionsstärken selten vorkamen. PgR zeigte eine gleichmäßige Verteilung von schwacher, mäßiger und starker Expression.

Erläuterung: gelb = negativ, grün = schwach, rot = mäßig, blau = stark. Abkürzungen: HR = Hormonrezeptor.

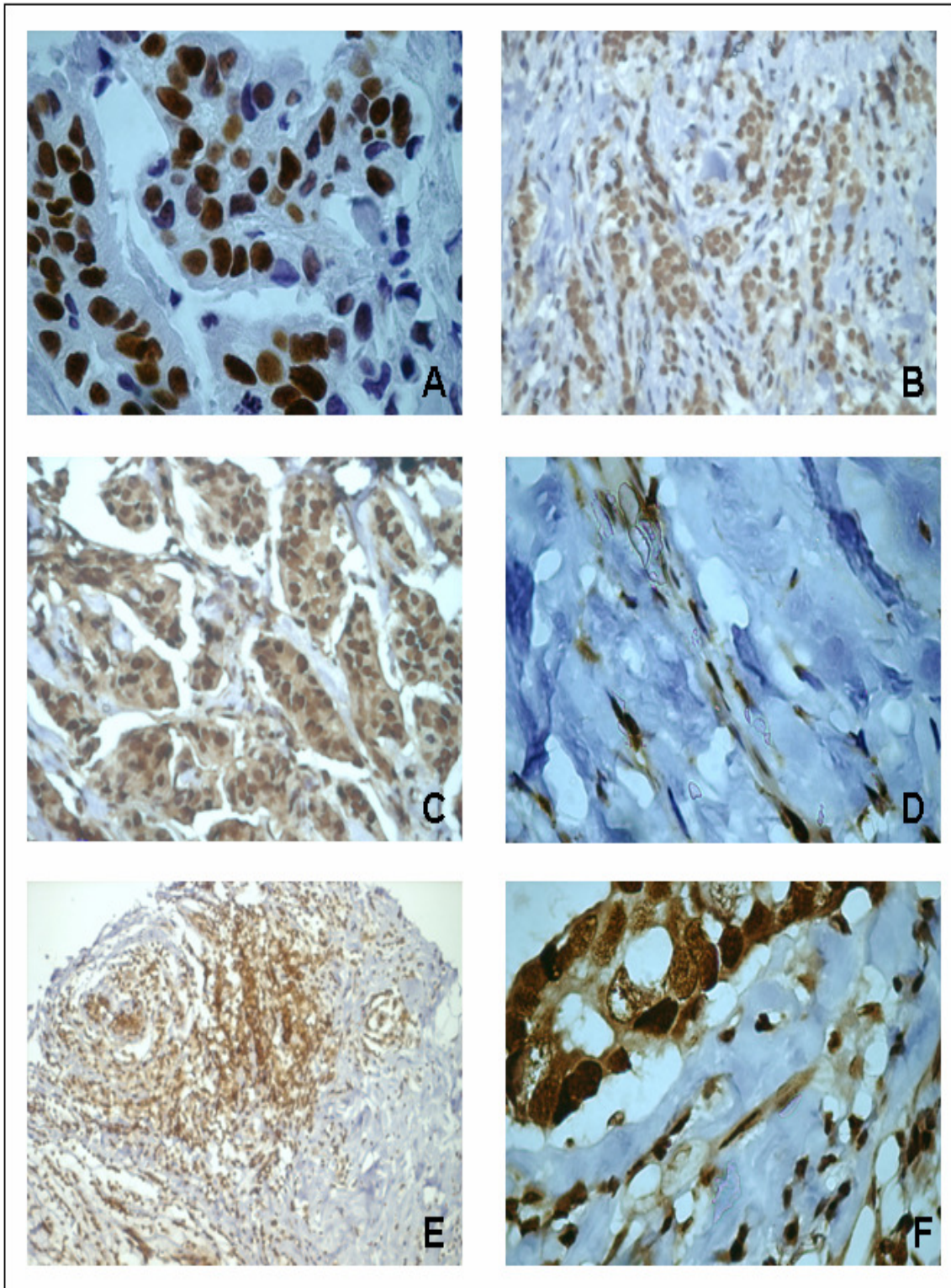


Abb. 22: Übersicht Immunhistochemie der Hormonrezeptoren

A: Typisches Bild für ER α und PgR. Expression ausschließlich im Kern von Epithelzellen. **B:** Nukleäre Expression der ER β -Isoformen. **C:** Nukleäre und leichte zytoplasmatische Färbung von ER β . **D:** ER β -Isoformen in Fibroblasten. **E:** ER β in inflammatorischen Zellen. **F:** ER β -Isoformen in Tumor und Fibroblasten.

3.9 Expressionsprofile von *Respondern* und *Nonrespondern*

3.9.1 Chemotherapie-Gruppe

Für die Tumore wurde, getrennt nach Therapieansprechen, ein Rezeptor-Expressionsprofil erstellt.

So zeigten *Responder* in 11 von 27 Fällen (40,7 %) eine ER α -Abnahme wohingegen das nur bei 2 von 20 (10 %) *Nonrespondern* der Fall war. Bei diesen waren 16 (80 %) in ihrer ER α -Expression stabil (siehe Abb. 23).

Responder hatten überwiegend eine starke ER β g-Expression (22 von 27 (81,4 %) Tumore). Bei den *Nonrespondern* wurden jeweils 10 von 20 (50 %) als schwach und stark klassifiziert (siehe Abb. 23).

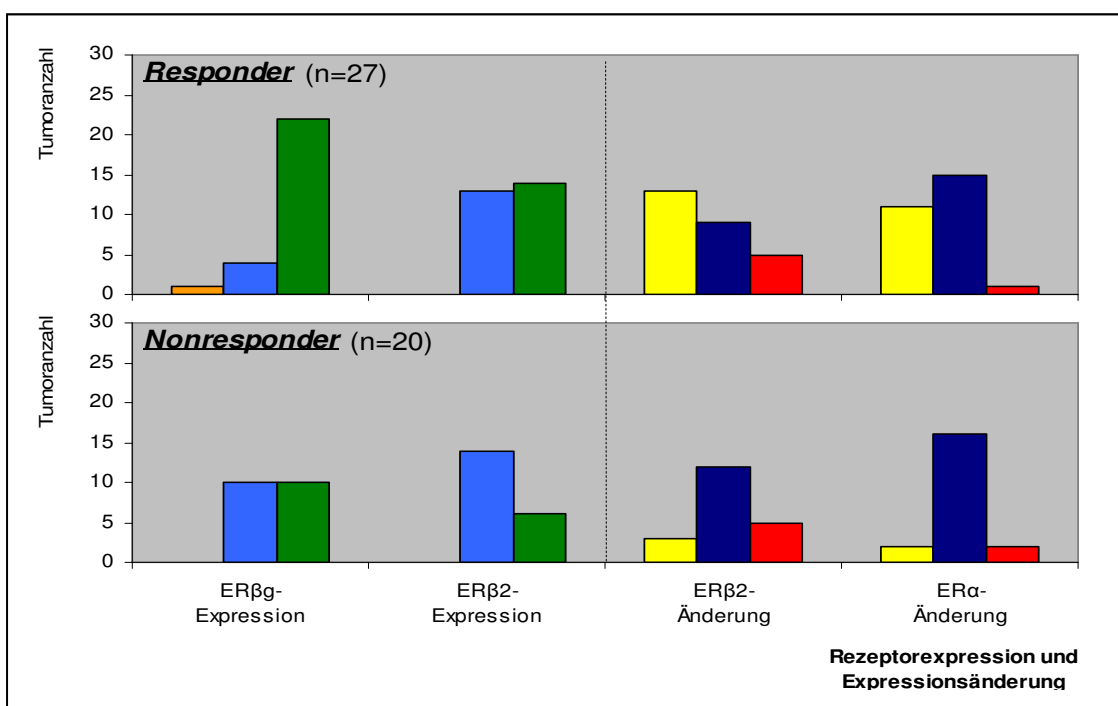


Abb. 23: Expressionsprofil der Chemotherapie-Gruppe

Rezeptorexpression und Expressionsänderung getrennt nach *Respondern* und *Nonrespondern*. *Responder* wiesen häufiger hohe ER β g-Werte auf, ER β 2 war mäßig und stark exprimiert, ER β 2 und ER α nahmen häufiger ab als bei *Nonrespondern*.

Erläuterung: Orange = negativ, hellblau = schwach positiv, grün = stark positiv, gelb = Abnahme, dunkelblau = Stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: ER β g = Östrogenrezeptor β gesamt, ER β 2 = Östrogenrezeptor β 2, ER α = Östrogenrezeptor α .

Bei Analyse von ER β 2 ergab sich für *Nonresponder* seltener eine starke Expression. Von 20 Tumoren zeigten 14 (70 %) eine schwache und nur 6

(30 %) eine starke ER β 2-Expression. Bei den *Respondern* waren starke und schwache Expression ähnlich verteilt. Hier wiesen von 27 Tumoren 13 (48,1 %) eine schwache und 14 (51,9 %) eine starke Expression auf (siehe Abb. 23).

Bezüglich der Expressionsänderung von ER β 2 im Therapieverlauf waren bei den *Respondern* 13 von 27 (48,2 %) abnehmend. In der Gruppe der *Nonresponder* war dies nur in 3 von 20 (15 %) Gewebeproben der Fall. Von diesen erwiesen sich 12 (60 %) in ihrer ER β 2-Expression als stabil ($Chi^2 = 6,1$; $p = 0,047$) (siehe Abb. 23).

3.9.2 Expressionsanalyse getrennt nach der Therapie

Therapie-Untergruppe 1: Anthrazykline

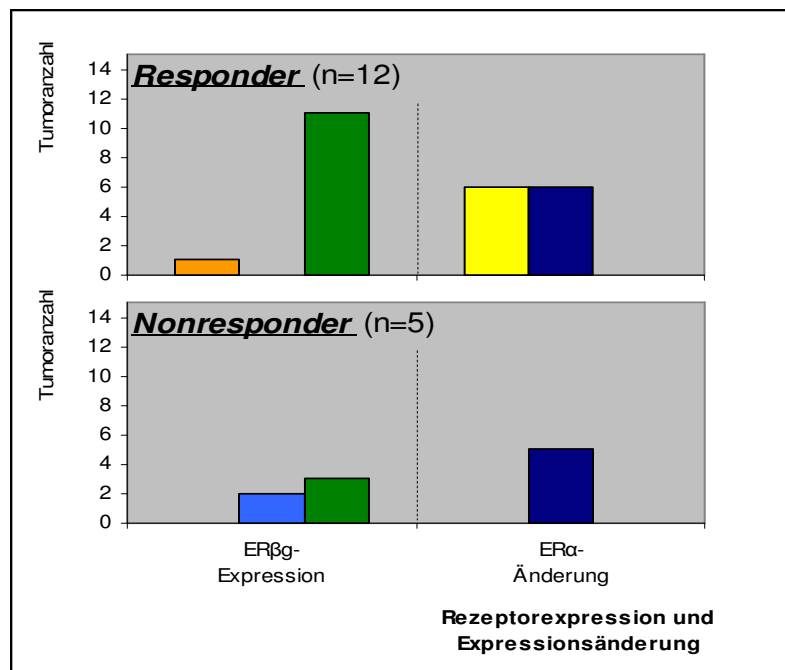


Abb. 24: Expressionsprofil der Therapie-Untergruppe 1 (Anthracykline)

Responder zeigten häufiger hohe ER β g-Werte und häufiger eine Abnahme der ER α -Expression als *Nonresponder*.

Erläuterung: Orange = negativ, hellblau = schwach positiv, grün = stark positiv, gelb = Abnahme, dunkelblau = Stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: ER β g = Östrogenrezeptor β gesamt, ER α = Östrogenrezeptor α .

Die Analyse der ER α -Expressionsänderung zeigte, dass 6 von 12 (50 %) *Responder* eine Abnahme aufwiesen, wobei das bei keinem der 5 *Nonresponder* zutraf. Diese waren alle stabil (100 %) (siehe Abb. 24).

Responder wiesen häufiger eine starke ER β g-Expression auf als *Nonresponder*. So wurden 11 von 12 (91,6 %) der *Responder* und 3 von 5 (60 %) der *Nonresponder* als stark klassifiziert (siehe Abb. 24).

Therapie-Untergruppe 2: Taxane

Die Therapiegruppe bestand aus 30 Patientinnen, von denen 15 auf die Therapie ansprachen und 15 nicht ansprachen. 6 (40 %) der *Responder* exprimierten ER β 2 stark. Bei den *Nonrespondern* traf das nur für 3 (20 %) Tumore zu. Von ihnen wurden 12 (80 %) als schwach klassifiziert (siehe Abb. 25)

Im Therapieverlauf nahm die ER β 2-Expression bei 7 von 15 (46,7 %) der *Responder* ab. Das war nur bei 1 von 15 (6,7 %) der *Nonresponder* zu beobachten. Sie waren überwiegend stabil (12 von 15; 80 %) bezüglich ihrer ER β 2-Expression (siehe Abb. 25).

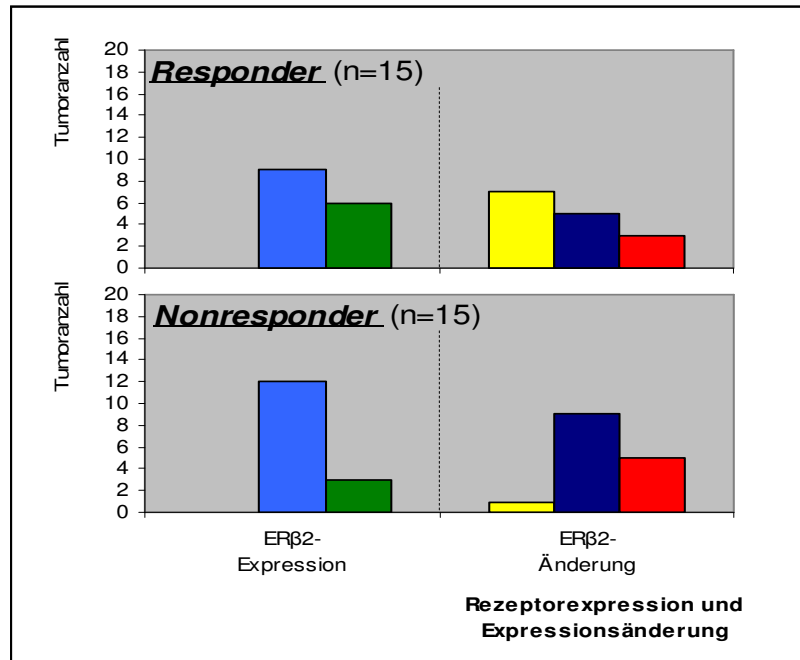


Abb. 25: Expressionsprofil der Therapie-Untergruppe 2 (Taxane).

Nonresponder weisen häufiger eine schwache ERβ2-Expression und seltener eine ERβ2-Abnahme auf als *Responder*.

Erläuterung: Orange = negativ, hellblau = schwach positiv, grün = stark positiv, gelb = Abnahme, dunkelblau = Stabil, rot = Zunahme. Abkürzungen: ERβ2 = Östrogenrezeptor β2.

4. Diskussion

4.1 Einordnung des Projekts

In der Literatur ist beschrieben, dass sich Tumoreigenschaften unter dem Einwirken von Medikamenten ändern. Ein Beispiel dafür ist die veränderte PgR-Expression, die vor allem für die endokrine Therapie beschrieben ist, jedoch auch unter Chemotherapie vorkommt (Taucher *et al.*, 2003, Dowsett *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit verschiedene Therapieformen einen Einfluss auf die HR-Expression haben. Außerdem wurde analysiert, ob die Expression bzw. eine Expressionsänderung von ER β und seinen Isoformen als prädiktive Werte für die Therapie des Mammakarzinoms von Bedeutung sind.

4.2 Östrogenrezeptor α

4.2.1 Immunhistochemie und Hormonrezeptor-Koexpression

Wir beobachteten in unserer Studie, dass ER α mittels Immunhistochemie in Kernen von Epithelzellen zu detektieren ist (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2), was in der Literatur häufig beschrieben ist (Speirs *et al.*, 2004). Dies ist darauf zurückzuführen, dass E2 an den ER gebunden hat und dessen Translokation in den Kern ermöglicht. Des Weiteren ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen ER α - und PgR-Expression ($p < 0,0001$). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Expression von PgR durch Östrogene über ER α reguliert wird (Saji *et al.*, 2002; Cordera *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse bestätigen die Validität der verwendeten Methodik und des angewandten IRS-Scores.

4.2.2 ER α -Expression und Proliferation

Das Wachstum und die Entwicklung der gesunden Brustdrüse sind von Östrogenen als Stimulus abhängig. Das trifft auch für einen Großteil der Mammakarzinome zu. Es gibt jedoch auch Tumore, die unabhängig von Östrogenen wachsen und keine Östrogenrezeptoren exprimieren. Wir

beobachteten, dass ER α -negative Tumore vor ($p = 0,007$) und nach der Therapie ($p < 0,0001$) signifikant häufiger proliferieren (siehe Kapitel 3.3.3). Diese Ergebnisse decken sich mit den Angaben in der Literatur, wo beschrieben wird, dass ER α -negative Tumore eine höhere Proliferationsrate aufweisen als ER α -positive (Järvinen *et al.*, 2000; Dougherty *et al.*, 2004). Wir beobachteten zusätzlich, dass ER α -negative Mammakarzinome auch nach der Therapie noch häufiger proliferieren als ER α -positive. Dies scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen vieler Arbeitsgruppen zu stehen, die zeigen, dass diese Tumorsubgruppe besser auf eine Chemotherapie anspricht (Prisack *et al.*, 2005; Ring *et al.*, 2004; Colleoni *et al.*, 2004). Sie beschreiben außerdem, dass diese Tumore häufiger eine Komplettremission zeigen. In unserem Kollektiv war dies jedoch bei keinem der Tumore der Fall. Daher wäre es möglich, dass unser ER α -negatives Patientenkollektiv weniger chemosensibel als üblich ist. So ließe sich die hohe Proliferationsrate nach der systemischen Therapie deuten.

4.2.3 ER α -Entwicklung im Therapieverlauf

Die Ergebnisse zeigen, dass sich ER α im Therapieverlauf in allen Untergruppen meist stabil verhält (siehe Kapitel 3.3.4), was vor allem für die Anthrazykline und die endokrine Therapie auch in der Literatur beschrieben wurde (siehe Tab. 10). Taucher *et al.* zeigen eine signifikante Abnahme von ER α im Verlauf der Chemotherapie (Anthrazykline +/- Taxane). Das würde zu den Ergebnissen von Martin *et al.* passen, die in der Zellkultur eine Abnahme der ER α -Expression detektieren (Taucher *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004). Bei der Therapie mit Tamoxifen ist ebenfalls eine Abnahme der ER α -Expression publiziert (Miller *et al.*, 2006 a; Dowsett *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2003). In unserer Studie wurden jedoch als endokrine Medikamente ausschließlich Aromataseinhibitoren eingesetzt, die keinen Einfluss auf die ER α -Expression zu haben scheinen (Miller *et al.*, 2006 b; Salmon *et al.*, 2006).

Tab. 10: Änderung der ER α -Expression

Erläuterung: n = Patientenzahl, IHC = Immunhistochemie, AI = Aromataseinhibitoren, ^s = signifikant, ^{ns} = nicht signifikant.

Autor (Referenz)	n	Methode	Behandlung	Änderung der Expression
Bottini <i>et al.</i> , 1996	99	IHC	Anthrazykline	keine Änderung
Burcombe <i>et al.</i> , 2005	118	IHC	Anthrazykline	keine Änderung
Penault-Llorca <i>et al.</i> , 2003	115	IHC	Anthrazykline	keine Änderung
Taucher <i>et al.</i> , 2003	214	IHC	Anthrazykline +/- Taxane	Abnahme ^s
Schneider <i>et al.</i> , 2000	48	IHC	Anthrazykline +/- Taxane	keine Änderung
Arens <i>et al.</i> , 2005	25	IHC	Anthrazykline + Taxane	keine Änderung
Miller <i>et al.</i> , 2006 a	36	IHC	Tamoxifen	Abnahme ^s
Dowsett <i>et al.</i> , 2005	330	IHC	Tamoxifen	Abnahme ^s
Miller <i>et al.</i> , 2003	48	IHC	AI	keine Änderung
			Tamoxifen	Abnahme ^s
Miller <i>et al.</i> , 2006 b	63	IHC	AI	keine Änderung
Anderson <i>et al.</i> , 2002	23	IHC	AI	keine Änderung
Salmon <i>et al.</i> , 2006	75	IHC	AI	keine Änderung

4.2.4 ER α als prädiktiver Wert

Die ER α -Expression gilt als wichtiger prädiktiver Wert für die endokrine Therapie (sowohl für Antiöstrogene als auch für Aromatasehemmer) (Duffy *et al.*, 2005). In unserem Kollektiv zeigten alle Teilnehmer der AI-Therapiegruppe eine maximale ER α -Expression (IRS = 12). Daher konnte nicht ermittelt werden, ob die Rezeptorexpression einen Einfluss auf die *Response* hat.

Für die Chemotherapiegruppe sahen wir keine Expressionsunterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* (siehe Kapitel 3.3.5 und 3.3.6). Dieser Sachverhalt findet sich in zahlreichen Veröffentlichungen wieder, die in Tabelle 11 dargestellt werden (Kariya *et al.*, 2005; Burcombe *et al.*, 2005; Vyzula *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2000) (siehe Tab. 11).

Die ER α -Expression änderte sich im Chemotherapieverlauf nur selten. Es wurde jedoch vor allem in der Anthrazyklingruppe ersichtlich, dass eine Abnahme bei *Respondern* häufiger vorkommt, als bei *Nonrespondern*. Frassoldati und Kollegen veröffentlichten 1997 eine Studie, die zum selben Ergebnis kommt. 29 Patientinnen wurden mit Anthrazyklinen oder mit einer

Kombination aus Anthrazyklinen und Taxanen behandelt. Eine Abnahme der ER α -Expression war signifikant häufiger in *Respondern* zu finden (Frassoldati *et al.*, 1997).

Es stellt sich die Frage, warum chemosensible Tumore häufiger eine ER α -Abnahme zeigen. Möglicherweise ändern Anthrazykline den Phänotyp der Zellen dahingehend, dass sie ER α schwächer exprimieren. Da weniger ER α in den Zellen vorhanden ist, könnte demnach die proliferationsstimulierende Wirkung von Östrogen reduziert sein und zum Therapieansprechen beitragen. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre, dass durch die Medikamente Klone entstehen, die ER α seltener exprimieren.

Tab. 11: ER α als prädiktiver Wert

Erläuterung: n = Patientenzahl, Meth. = Methode, IHC = Immunhistochemie, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, LBA = Ligandenbindungs-Assay, Rand. Stud. = randomisierte Studie, Ther. = Therapie, Anthra. = Anthrazykline, Tax. = Taxane, Tam. = Tamoxifen, Tor. = Toremifen, AI = Aromataseinhibitoren, Target = untersuchte Größe, ER α -Exp. = ER α -Expression, ER α -Änd. = ER α -Änderung, ^s = signifikant, ^{ns} = nicht signifikant.

Autor (Referenz)	n	Meth.	Ther.	Target	Prädiktion
Kariya <i>et al.</i> , 2005	30	IHC	Anthra.	ER α -Exp.	keine
Burcombe <i>et al.</i> , 2005	118	IHC	Anthra.	ER α -Exp.	keine
Schneider <i>et al.</i> , 2000	48	IHC	Anthra. +/- Tax.	ER α -Exp.	keine
Prisack <i>et al.</i> , 2005	517	IHC	Anthra.	ER α -Exp.	negativ ^s
Ring <i>et al.</i> , 2004	435	IHC	Anthra.	ER α -Exp.	negativ ^s
Guarneri <i>et al.</i> , 2006	1731	IHC	Anthra. +/- Tax.	ER α -Exp.	negativ ^s
Frassoldati <i>et al.</i> , 1997	29	IHC	Anthra. +/- Tax.	ER α -Änd.	Abnahme positiv ^s
Mazouni <i>et al.</i> , 2007	1079	IHC	Tax.	ER α -Exp.	negativ ^s
Chang <i>et al.</i> , 1999	158	IHC	Tam.	ER α -Exp.	positiv ^s
Elledge <i>et al.</i> , 2000	205	IHC LBA	Tam.	ER α -Exp.	positiv ^s
Cappelletti <i>et al.</i> , 2004	47	PCR	Tor.	ER α -Exp.	positiv ^{ns}
Early BC Trialists' Collab. Group, 1998	37000	Rand. Stud.	Tam.	ER α -Exp.	positiv ^s
Iwase <i>et al.</i> , 2003	77	IHC	Tam. oder AI	ER α -Exp.	positiv ^s
Salmon <i>et al.</i> , 2006	75	IHC	AI	ER α -Exp. ER α -Änd.	positiv ^{ns} keine

4.3 Östrogenrezeptor β gesamt

4.3.1 Immunhistochemie und Hormonrezeptor-Koexpression

ER β ist im menschlichen Körper weiter verbreitet als ER α . Er kommt neben dem Brustgewebe auch in Epithelzellen des ZNS, des Gastrointestinaltraktes, des Respirationstraktes und des kardiovaskulären Systems vor (Speirs *et al.*, 2004). ER β -Isoformen werden in dieser Studie zusätzlich in Fibroblasten und in Entzündungszellen detektiert (siehe Kapitel 3.4.1, 3.5.1 und 3.6.1), was dem aktuellen Wissenstand entspricht. Zudem war ER β sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu finden (Taylor *et al.*, 2000; Skliris *et al.*, 2001; Speirs *et al.*, 2004).

Viele Arbeitsgruppen beschränken sich in ihren Studien darauf, die ER β g-Proteinexpression zu untersuchen. Da sich die Isoformen aber in ihrer Funktion unterscheiden (Lewandowski *et al.*, 2002), sollte dies auch in Studien berücksichtigt werden. Wir untersuchten daher neben der ER β g-Expression auch die von ER β 1 und ER β 2. Es zeigten sich signifikante Korrelationen von ER β g mit ER β 1 ($p = 0,0008$) und ER β 2 ($p = 0,0013$) (siehe Kapitel 3.4.2, 3.5.2 und 3.6.2). Das erklärt sich dadurch, dass der ER β g-Antikörper alle Isoformen detektiert und damit auch ER β 1 und ER β 2. Außerdem ergab sich eine Korrelation zwischen ER β 1 und ER β 2 ($p = 0,0031$). Ursache dafür könnte sein, dass ER β 1 und ER β 2 auf demselben Gen kodiert sind (Miller *et al.*, 2006 a) und demnach denselben Regulationsmechanismen bei ihrer Synthese unterliegen.

4.3.2 ER β gesamt-Expression und Proliferation

In dieser Studie zeigten Tumore mit starker ER β g-Expression nach der Therapie signifikant seltener eine Proliferationsaktivität als Tumore mit schwacher Expression ($p = 0,0016$) (siehe Kapitel 3.4.3). Es ist beschrieben, dass ER β eine antiproliferative Wirkung hat (Lazennec *et al.*, 2001; Cordera *et al.*, 2006). Wir sehen diesen Effekt nach Einwirken der Chemotherapie, jedoch nicht davor. Vor der Therapie ist die Mehrzahl der Tumore unabhängig von der ER β g-Expression als proliferierend klassifiziert. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Zellen, die ER β g stark exprimieren, sensibler gegen die

Chemotherapeutika sind und sich daher in ihrer Teilungsaktivität stärker beeinträchtigen lassen als Tumorzellen mit schwächerer ER β g-Expression.

4.3.3 ER β gesamt-Entwicklung im Therapieverlauf

Bei der Fragestellung, ob Expressionsänderungen von ER β g zu beobachten sind, wird deutlich, dass in der endokrinen Therapiegruppe nur selten eine Ab- oder Zunahme zu beobachten ist. Über 90 % der Fälle wurden als stabil klassifiziert (siehe Kapitel 3.4.4). Bershtein und Kollegen ermitteln in einem Kollektiv von 24 Patientinnen bei der Therapie mit Tamoxifen eine signifikante Zunahme, bei AI-Therapie eine leichte, jedoch nicht signifikante Abnahme der ER β g-Expression (Bershtein *et al.*, 2004). Die tendenziellen Unterschiede zu unseren Ergebnissen könnten durch die relativ geringen Patientenzahlen erklärt werden.

Ursache für die ER β g-Stabilität in der endokrinen Therapie ist möglicherweise die Hemmung der Östrogensynthese durch Aromataseinhibitoren (Colozza *et al.*, 2007). Da der Proteinabbau von ER β -Protein im Proteasom unter anderem östrogenabhängig ist (Picard *et al.*, 2007; Horner-Glister *et al.*, 2005), könnten reduzierte Östrogenspiegel zu einer Stabilisierung der ER β g-Expression beitragen.

4.3.4 ER β gesamt als prädiktiver Wert

Wie auch für die einzelnen ER β -Isoformen wurden die prädiktiven Eigenschaften von ER β g bisher hauptsächlich für Tamoxifen untersucht. Dabei scheinen die mRNA- und die Proteinexpression eine unterschiedliche Rolle zu spielen. ER β g-Protein geht eher mit einem guten Ansprechen einher (Esslimani-Sahla *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2002), wohingegen ER β g-mRNA in Zusammenhang mit einer Tamoxifenresistenz zu stehen scheint (Speirs *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2005) (siehe Tab. 12). Bezüglich der Frage, ob ER β einen prädiktiven Wert für Chemotherapien darstellt, sind keine Beschreibungen in der Literatur zu finden. Wir konnten zeigen, dass ER β g in der Chemotherapie-Gruppe, und hier vor allem in der Anthrazyklin-Gruppe (Neo1),

bei *Respondern* häufiger stark exprimiert ist als bei *Nonrespondern* (siehe Kapitel 3.4.5). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der Proliferationsanalyse. Hier wurde gezeigt, dass Tumore mit hoher ERβg-Expression nach der Therapie seltener proliferieren (s. o.). Das könnte so zu deuten sein, dass Tumore mit hohen ERβg-Werten besser auf eine Therapie ansprechen und daher stärker in ihrer Teilungsaktivität beeinflusst werden. Dies lässt auf eine Rolle der ERβg-Expression als prädiktiver Marker für eine Anthrazyklintherapie schließen. Einige Studien zu dieser Fragestellung sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tab. 12: ERβg als prädiktiver Wert

Erläuterung: n = Patientenzahl, Meth. = Methode, IHC = Immunhistochemie, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, Ther. = Therapie, Tam. = Tamoxifen, Target = untersuchte Größe, ERβg-Exp. = ERβg-Expression, ^s = signifikant, ^{ns} = nicht signifikant.

Autor (Referenz)	n	Meth.	Ther.	Target	Prädiktion
Murphy <i>et al.</i> , 2002	27	IHC	Tam.	ERβg-Exp.	positiv ^s
Esslimani-Sahla <i>et al.</i> , 2004	50	IHC	Tam.	ERβg-Exp.	positiv ^s
Cappelletti <i>et al.</i> , 2004	47	PCR	Tor.	ERβg-Exp.	keine
Murphy <i>et al.</i> , 2002	27	PCR	Tam.	ERβg-Exp.	keine
Speirs <i>et al.</i> , 1999	17	PCR	Tam.	ERβg-Exp.	negativ ^s
Chang <i>et al.</i> , 2005	102	PCR	Tam.	ERβg-Exp.	negativ ^{ns}

4.4 Östrogenrezeptor β1

4.4.1 ERβ1-Expression und Proliferation

Der proliferationshemmende Effekt von ERβ1 auf Mammakarzinom-Zellen ist diverse Male beschrieben (Secreto *et al.*, 2007; Omoto *et al.*, 2003). Wir können das für zwar für ERβg und ERβ2, nicht jedoch für ERβ1 bestätigen (siehe Kapitel 3.5.3). Unsere Daten für ERβ1 lassen keine klaren Zusammenhänge zwischen der ERβ1-Expression und der Zellteilungs-Aktivität erkennen. Viele Proliferations-Studien werden *in vitro* an Mammakarzinom-Zelllinien durchgeführt. Diese Modelle können zwar ein Anhaltspunkt für die Situation *in vivo* sein, spiegeln diese jedoch nicht exakt wieder. Daher können die Ergebnisse nur bedingt miteinander verglichen werden.

4.4.2 ER β 1-Entwicklung im Verlauf der Therapie

Die Untersuchung des ER β 1-Verhaltens zeigte in allen Therapie-Untergruppen häufiger eine Abnahme als dies bei den anderen Östrogenrezeptoren der Fall war (siehe Kapitel 3.5.4). Am deutlichsten war dies in der Anthrazyklin-Gruppe ausgeprägt. In der Literatur ist wenig über den Einfluss von Medikamenten auf die ER β 1-Expression bekannt. Miller beschreibt eine Zunahme von ER β 1 unter Tamoxifen-Therapie (Miller *et al.*, 2006 a). Das könnte durch eine mögliche stabilisierende Wirkung von Tamoxifen auf ER β verursacht werden. Dadurch würde ein Abbau im Proteasom reduziert und die ER β -Proteinspiegel zunehmen (Horner-Glister *et al.*, 2005).

Da wir eine ER β 1-Reduktion in allen Therapieschemata beobachteten, ist es eher unwahrscheinlich, dass dies durch einen wirkstoffspezifischen Effekt auf die ER β 1-Expression verursacht wurde. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der medikamenteninduzierte Stress auf unklare Weise zu einer *Downregulation* von ER β 1 führt.

4.4.3 Prädiktive Eigenschaften von ER β 1

Es ist nicht eindeutig geklärt, welchen Stellenwert in der Vorhersage einer Therapie-*Response* die ER β 1-Isoform hat (siehe Tab. 13). Es scheint jedoch ein Zusammenhang zwischen der ER β 1-Expression und einer erhöhten Sensitivität gegenüber Tamoxifen zu bestehen (Murphy *et al.*, 2005; Iwase *et al.*, 2003). Wir konnten Ähnliches weder für die Aromataseinhibitoren noch für die Chemotherapeutika beobachten (siehe Kapitel 3.5.5).

Miller und Kollegen erkennen keine Verbindung zwischen der Expressionsänderung von ER β 1 während einer neoadjuvanten Tamoxifentherapie und der *Therapieresponse* (Miller *et al.*, 2006 a). Diese Ergebnisse sind mit unseren vereinbar. Wir sahen in keiner Therapie-Untergruppe Unterschiede im ER β 1-Verhalten zwischen *Respondern* und *Nonrespondern*.

Tab. 13: ERβ1 als prädiktiver Wert

Erläuterung: n = Patientenzahl, ZK = Zellkultur, Meth. = Methode, IHC = Immunhistochemie, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, WB = Western Blot, Ther. = Therapie, Tam. = Tamoxifen, AI = Aromataseinhibitoren, Target = untersuchte Größe, ERβ1-Exp. = ERβ1-Expression, ERβ1-Änd. = ERβ1-Änderung, ^s = signifikant, ^{ns} = nicht signifikant.

Autor (Referenz)	n	Meth.	Ther.	Target	Prädiktion
Iwase <i>et al.</i> , 2003	77	IHC	Tam. oder AI	ERβ1-Exp.	positiv ^{ns}
Miller <i>et al.</i> , 2006 a	36	IHC	Tam.	ERβ1-Exp.	keine
Murphy <i>et al.</i> , 2002	27	PCR	Tam.	ERβ1-Exp.	keine
Murphy <i>et al.</i> , 2005	ZK	PCR	Tam.	ERβ1-Exp.	positiv ^s
		IHC WB			
Miller <i>et al.</i> , 2006 a	36	IHC	Tam	ERβ1-Änd..	keine

4.5 Östrogenrezeptor β2

4.5.1 ERβ2-Expression und Proliferation

Unsere Ergebnisse zeigten, dass hohe ERβ2-Werte häufiger mit einer Negativität für Ki-67 einhergehen als niedrige ERβ2-Expressionen (siehe Kapitel 3.6.3). Das weist auf einen antiproliferativen Effekt von ERβ2 hin, wie er für Östrogenrezeptor β insgesamt beschrieben ist (Lazennec *et al.*, 2001; Cordera *et al.*, 2006; Saji *et al.*, 2000; Roger *et al.*, 2001). Bisher wurde nur in wenigen Studien analysiert, ob eine Aktivität des ERβ2 die Proliferation von Mammakarzinom-Zellen hemmt. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Studien sind kontrovers. Eine Arbeitsgruppe beobachtete eine antiproliferative Wirkung von ERβ2 in MCF7-Zellen (Omoto *et al.*, 2003). Secreto *et al.* sahen keinen Einfluss der ERβ2-Expression auf die Zellteilung in Hs578T-Zellen (Secreto *et al.*, 2007). Die Unterschiede in den Beobachtungen könnten durch die verschiedenen Zelltypen zu erklären sein.

4.5.2 ERβ2-Entwicklung im Therapieverlauf

Die Untersuchung von ERβ2 im Therapieverlauf zeigte unabhängig vom Therapieschema keine klaren Entwicklungstendenzen. Die Mehrzahl der Tumore verhielt sich zwar stabil, jedoch waren auch Rezeptorabnahmen in ähnlicher Häufigkeit zu beobachten (siehe Kapitel 3.6.4). In der Literatur ist

nicht beschrieben, ob die Therapie mit Anthrazyklinen, Taxanen oder Aromatasehemmern einen Einfluss auf die ER β 2-Expression hat.

Die Therapie mit Tamoxifen scheint keine Auswirkungen auf die Expression von ER β 2 zu haben (Miller *et al.*, 2006 a).

4.5.3 ER β 2 als prädiktiver Wert

Untersuchungen in Bezug auf den prädiktiven Stellenwert von ER β 2 beziehen sich in aller Regel auf eine Tamoxifentherapie. Diese Artikel lassen jedoch keinen eindeutigen Schluss zu (siehe Tab. 14). Es scheint aber ein positiver Zusammenhang zwischen der ER β 2-Expression und dem Therapieansprechen zu bestehen, zumindest wenn die Expression mit PCR oder *Western Blot* ermittelt wurde. Die widersprüchlichen Ergebnisse für WB und IHC könnten auf der Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern zu beruhen. Bei immunhistochemischer Expressionsanalyse von ER β 2 beobachteten wir für die endokrine Therapie mit AI keine Zusammenhänge zwischen Expression und Therapieansprechen. Selbiges trifft laut Literatur auch für Tamoxifen zu (Esslimani-Sahla *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006 a; Saji *et al.*, 2005).

In der Chemotherapie-Gruppe, vor allem in der Taxan-Gruppe, wurden bei *Respondern* häufiger starke ER β 2-Expressionen ermittelt als bei *Nonrespondern* (siehe Kapitel 3.6.5). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ER β 2 als möglicher prädiktiver Wert für eine Taxan-Therapie anzusehen ist.

Tab. 14: ER β 2 als prädiktiver Wert

Erläuterung: n = Patientenzahl, Meth. = Methode, IHC = Immunhistochemie, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, WB = Western Blot, Ther. = Therapie, Tam. = Tamoxifen, Target = untersuchte Größe, ER β 2-Exp. = ER β 2-Expression, ER β 2-Änd. = ER β 2-Änderung, ^s = signifikant.

Autor (Referenz)	n	Meth.	Ther.	Target	Prädiktion
Esslimani-Sahla <i>et al.</i> , 2004	50	IHC	Tam.	ER β 2-Exp.	keine
Miller <i>et al.</i> , 2006 a	36	IHC	Tam.	ER β 2-Exp.	keine
Saji <i>et al.</i> , 2005	67	IHC	Tam.	ER β 2-Exp.	keine
Palmieri <i>et al.</i> , 2004	23	WB	Tam.	ER β 2-Exp.	positiv ^s
Vinayagam <i>et al.</i> , 2007	141	PCR	Tam.	ER β 2-Exp.	positiv ^s
Murphy <i>et al.</i> , 2002	27	PCR	Tam.	ER β 2-Exp.	keine
Miller <i>et al.</i> , 2006 a	36	IHC	Tam.	ER β 2-Änd.	keine

Unsere Ergebnisse zeigten weiterhin, dass bei *Respondern* signifikant häufiger eine ERβ2-Abnahme zu beobachten ist ($p = 0,047$) (siehe Kapitel 3.6.6). Der kausale Zusammenhang zwischen ERβ2-Abnahme und *Therapieresponse* ist bisher nicht bekannt. Erklärbar wäre dies mit zwei unterschiedlichen Ansätzen. Eine Möglichkeit wäre, dass Zellen mit starker ERβ2-Expression sensibler gegenüber Chemotherapeutika sind und eher abgetötet werden. Übrig blieben noch Zellen, die ERβ2 schwach oder gar nicht exprimieren, was zu einer geringeren ERβ2-Klassifikation führen würde. Die verringerte ERβ2-Expression wäre also eine Folge der Chemotherapie und des Therapieansprechens. Das würde zu unseren Ergebnissen passen, nach denen Tumore, die ERβ2 stark exprimieren, eher auf eine Taxan-Therapie ansprechen.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von ERα durch Östrogen zu einer reduzierten Apoptoserate nach Taxan-Behandlung führt (Sui *et al.*, 2007) und somit eine Taxanresistenz in Mammakarzinom-Zelllinien entsteht. Da ERβ2 einen dominant negativen Effekt auf die ERα-Funktion hat (Speirs *et al.*, 2004), könnte eine starke ERβ2-Expression eine gesteigerte Taxan-Sensitivität von Tumorzellen zur Folge haben.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die verminderte ERβ2-Expression nicht die Folge des Therapieansprechens, sondern die Voraussetzung dafür ist. Unsere Daten weisen auf eine antiproliferative Wirkung von ERβ2 hin. Es wäre denkbar, dass Tumore, deren ERβ2-Expression abnimmt, zunächst verstärkt proliferieren. Daraus würde wiederum eine gesteigerte Chemosensitivität und damit eine verbesserte *Response* resultieren.

In Zukunft könnte untersucht werden, ob Medikamente, die zu einer reduzierten Expression bzw. Aktivität von ERβ2 führen, eine neue Therapieoption für die *Nonresponder* der Chemotherapie darstellen. Mögliche Beispiele für solche Medikamente wären blockierende Anti-ERβ2-Antikörper oder *small molecules*, die eine Bindung von ERβ2 an andere Östrogenrezeptoren im Zytoplasma hemmen.

4.6 Progesteronrezeptor

4.6.1 PgR-Expression und Proliferation

Auch für PgR wurde untersucht, ob es eine Verbindung zwischen seiner Expression und dem Proliferationsverhalten der Tumore gibt. Wir konnten diesbezüglich keine Zusammenhänge feststellen (siehe Kapitel 3.7.3). Clarke und Kollegen zeigen, dass die hormonabhängige Proliferation von menschlichem Mammagewebe, welches in Mäuse implantiert wurde, zwar von Östrogen, nicht jedoch von Progesteron beeinflusst wird (Clarke *et al.*, 2006). Es scheinen also weder die Progesteron-Exposition noch die PgR-Expressionsstärke einen direkten Einfluss auf die Proliferation zu haben.

4.6.2 Änderung der PgR-Expression im Therapieverlauf

Im Verlauf nahm die PgR-Expression unabhängig vom Therapieschema ab (siehe Kapitel 3.7.4). Für die Therapie mit AI ist dieses Phänomen in der Literatur beschrieben (Miller *et al.*, 2006 b; Bershtein *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2002). Zu erklären ist das vor allem durch die reduzierten Östrogenspiegel, ausgelöst durch die AI-Therapie. Da die PgR-Expression durch Östrogene und ER α gesteuert wird, kommt es bei abfallenden Östrogenspiegeln zur verminderten Transkription und Translation von PgR.

Viele Arbeitsgruppen können bezüglich des PgR keine Unterschiede vor und nach der Chemotherapie erkennen (siehe Tab. 15). Taucher ermittelte wie wir eine Abnahme der PgR-Expression im Verlauf der Chemotherapie (Taucher *et al.*, 2003). Wir beobachteten eine Reduktion tendenziell häufiger in prämenopausalen Frauen. Das könnte darauf hinweisen, dass bei diesen Frauen durch die Chemotherapie die Menopause künstlich eingeleitet wird und dies wiederum eine reduzierte PgR-Expression zur Folge hat.

Tab. 15: PgR-Änderung im Therapieverlauf

Erläuterung: n = Patientenzahl, IHC = Immunhistochemie, AI = Aromataseinhibitoren, ^s = signifikant.

Autor (Referenz)	n	Methode	Behandlung	Änderung der Expression
Penault-Llorca <i>et al.</i> , 2003	115	IHC	Anthrazykline	keine Änderung
Bottini <i>et al.</i> , 1996	99	IHC	Anthrazykline	keine Änderung
Burcombe <i>et al.</i> , 2005	118	IHC	Anthrazykline	keine Änderung
Arens <i>et al.</i> , 2005	25	IHC	Anthrazykline + Taxane	keine Änderung
Schneider <i>et al.</i> , 2000	48	IHC	Anthrazykline +/- Taxane	keine Änderung
Taucher <i>et al.</i> , 2003	214	IHC	Anthrazykline + Taxane	Abnahme ^s
Dowsett <i>et al.</i> , 2005	330	IHC	Tamoxifen	Zunahme ^s
			AI	Abnahme ^s
Miller <i>et al.</i> , 2003	48	IHC	Tamoxifen	keine Änderung
			AI	Abnahme ^s
Miller <i>et al.</i> , 2006 b	63	IHC	AI	Abnahme ^s
Anderson <i>et al.</i> , 2002	23	IHC	AI	Abnahme

4.6.3 PgR als prädiktiver Wert

Der PgR-Status ist zusammen mit dem ER α -Status einer der Parameter, die in der Routine für die Therapieauswahl herangezogen werden (siehe Tab. 16). Tumore, die positiv für diese Rezeptoren sind, zeigen ein besseres Ansprechen auf endokrine Medikamente. Dabei wird jedoch kontrovers diskutiert, ob PgR die prädiktiven Eigenschaften von ER α verbessert oder ergänzt (Early BC Trialists' Collab. Group 1998; Bardou *et al.*, 2003). Wir konnten in der endokrinen Therapiegruppe für PgR keine prädiktiven Eigenschaften feststellen, die über die von ER α hinausgehen (siehe Kapitel 3.7.5).

Bezüglich der unterschiedlichen Chemotherapie-Schemata kommen viele Studien zu dem Schluss, dass die PgR-Expression nicht auf eine *Response* hinweist (Burcombe *et al.*, 2005; Vyzula *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2000). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dieser Studie. Wir sahen keinen Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen und der PgR-Expressionsstärke bzw. der PgR-Expressionsänderung.

Tab. 16: PgR als prädiktiver Wert

Erläuterung: n = Patientenzahl, Meth. = Methode, IHC = Immunhistochemie, LBA = Ligandenbindungs-Assay, SDG = Saccharose-Dichtegradient, Ther. = Therapie, Anthra. = Anthrazykline, Tax. = Taxane, Tam. = Tamoxifen, AI = Aromataseinhibitoren, Target = untersuchte Größe, PgR-Exp. = ER α -Expression, ^s = signifikant.

Autor (Referenz)	n	Meth.	Ther.	Target	Prädiktion
Prisack <i>et al.</i> , 2005	517	IHC	Anthra.	PgR-Exp.	negativ ^s
Kariya <i>et al.</i> , 2005	30	IHC	Anthra.	PgR-Exp.	keine
Burcombe <i>et al.</i> , 2005	118	IHC	Anthra.	PgR-Exp.	keine
Schneider <i>et al.</i> , 2000	48	IHC	Anthra. +/- Tax.	PgR-Exp.	keine
Guarneri <i>et al.</i> , 2006	1731	IHC	Anthra. +/- Tax.	PgR-Exp.	negativ ^s
Elledge <i>et al.</i> , 2000	205	IHC LBA	Tam.	PgR-Exp.	positiv ^s
Bardoue <i>et al.</i> , 2003	1688	SDG	Tam.	PgR-Exp.	positiv ^s
Iwase <i>et al.</i> , 2003	77	IHC	Tam. oder AI	PgR-Exp.	positiv ^s

4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass die Hormonrezeptorexpression in Zusammenhang zu wichtigen biologischen Tumorparametern steht, die auch Einfluss auf den Therapieerfolg haben. So wiesen Tumore mit starker ER α -, ER β g- und ER β 2-Expression weniger Zellteilungsaktivität auf als Tumore mit schwacher Expression. Außerdem wurde deutlich, dass das Einwirken von Medikamenten zu einer Änderung der Expression von Tumorparametern führt. So zeigte sich im Verlauf der neoadjuvanten Therapie eine reduzierte Expression von Ki67, ER β 1 und PgR.

Die ER β -Expression scheint eine gewisse Bedeutung als prädiktiver Wert für die neoadjuvante Chemotherapie zu haben. Wir beobachteten als erste Arbeitsgruppe, dass ER β g und ER β 2 bei *Respondern* tendenziell stärker exprimiert sind, als bei *Nonrespondern*. Außerdem zeigten wir erstmals, dass *Responder* signifikant häufiger eine ER β 2-Abnahme im Verlauf aufweisen als *Nonresponder*. Das bessere Ansprechen der Tumore, deren ER β 2-Expression abnimmt, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass ER β 2 einen proliferationshemmenden Effekt hat. Durch die reduzierte ER β 2-Expression kommt es zunächst zu einer vermehrten Proliferation, was die Tumore

sensitiver gegenüber Chemotherapien macht. Daher wird bei ihnen häufiger eine Remission festgestellt.

In dieser Studie waren viele Tendenzen und einige signifikante Ergebnisse zu erkennen. Da eine relativ kleine Population untersucht wurde, erreichten einige der Ergebnisse keine Signifikanz. Diese sollten daher in einer Folgestudie mit größerer Patientenzahl auf ihre Validität überprüft werden.

Weiterhin könnte versucht werden, Medikamente zu entwickeln, die zu einer reduzierten Expression bzw. Aktivität von ER β 2 führen. Mögliche Optionen wären zum Beispiel Antikörper oder an *small molecules*. Diese würden vermutlich zunächst zu einer gesteigerten Proliferation der Tumore führen. Wenn sie jedoch in Kombination mit zytotoxischen Medikamenten eingesetzt würden, könnte das ein besseres Therapieansprechen zur Folge haben.

5. Zusammenfassung

Prädiktive Marker haben einen bedeutenden Stellenwert, da viele Mammakarzinom-Patientinnen eine systemische Therapie erhalten, von der sie nicht profitieren. Der Hormonrezeptor-Status ist ein wesentliches Kriterium für die Therapieauswahl, wobei bislang nur Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PgR) in der Routine bestimmt werden. Weiterhin ist bekannt, dass Medikamente die Proteinexpression von Tumoren beeinflussen können (z.B. Ki67, PgR).

Wir stellten uns daher die Frage, ob eine neoadjuvante Therapie eine Veränderung der Expression von Östrogenrezeptor β Isoformen (ER β) bewirkt. Außerdem untersuchten wir, ob die Expressionsstärke bzw. eine Expressionsänderung von ER β oder seiner Isoformen ER β 1 und ER β 2 als prädiktive Werte von Bedeutung sind.

Dafür wurden 69 neoadjuvant behandelte Mammakarzinom-Patientinnen untersucht. Sie wurden nach erhaltener Therapie in 3 Gruppen unterteilt (1. Anthrazykline, 2. Taxane, 3. Aromatasehemmer; Gruppe 1+2 = Chemotherapie-Gruppe). Ihnen wurde vor und nach der systemischen Therapie Gewebe entnommen. Aus diesem wurden *Tissue-Microarrays* hergestellt, an denen die Expression bzw. die Expressionsänderung von ER α , ER β gesamt (ER β g), ER β 1, ER β 2, PgR und Ki-67 immunhistochemisch untersucht wurde.

Wir konnten zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der ER-Expression und der Proliferation besteht. Tumore mit starker ER α -, ER β g- und ER β 2-Expression zeigten weniger Teilungsaktivität.

Es wurde bestätigt, dass eine neoadjuvante Therapie die Expression von Tumorparametern beeinflusst. Ki67, ER β 1 und PgR zeigten im Therapieverlauf eine Abnahme ihrer Expression.

ER β scheint als prädiktiver Wert von Bedeutung zu sein. Wir konnten als erste Gruppe beobachten, dass *Responder* der Chemotherapie eine stärkere ER β g- und ER β 2-Expression aufweisen als *Nonresponder*. Weiter zeigten wir erstmals bei *Respondern* der Chemotherapie signifikant häufiger eine ER β 2-Abnahme.

Wir sahen sowohl Tendenzen als auch signifikante Ergebnisse bezüglich der prädiktiven Eigenschaften von ER β -Isoformen, vor allem von ER β 2. Diese sollten in einer Folgestudie mit größerem Patientenkollektiv validiert werden.

Es stellt sich zukünftig die Frage, ob Medikamente, die zu einer selektiven Hemmung der ER β 2-Expression bzw. der ER β 2-Aktivität führen, eine neue Therapieoption für *Nonresponder* in der Chemotherapie darstellt. Hier wäre zum Beispiel an Antikörper oder *small molecules* zu denken. Diese würden möglicherweise zunächst zu einer gesteigerten Proliferation führen. Wenn sie jedoch in Kombination mit zytotoxischen Medikamenten eingesetzt würden, könnte das eine besseres Therapieansprechen zur Folge haben.

6. Verzeichnisse

6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AI	Aromataseinhibitoren
Anthra.	Anthrazykline
AP-1	Aktivatorprotein-1
Aqua dest.	Aqua destillata
BET	Brusterhaltende Therapie
CK	Cytokeratin
DAB	3,3'-Diamminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Östrogenrezeptor
ERE	<i>estrogen-response element</i>
ERα	Östrogenrezeptor alpha
ERβ cx	Syn. Östrogenrezeptor beta Isoform 2
ERβ	Östrogenrezeptor beta
ERβ1	Östrogenrezeptor beta Isoform 1 (Syn. Wildtyp)
ERβ2	Östrogenrezeptor beta Isoform 2
Exp.	Expressions
GnRH	<i>gonadotropin releasing hormone</i>
H ₂ O	Aqua destillata
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HCl	Salzsäure
HER-2/neu	<i>human epidermal growth-factor receptor 2</i>
HR	Hormonrezeptor
HRP	<i>Horseradishperoxidase</i> , Meerrettichperoxidase

i. v.	intravenös
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
LBA	Ligandenbindungs-Assay
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
Meth.	Methode
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Neo1	Anthrazyklin-Therapie
Neo2	Taxan-Therapie
Neo3	Aromatasehemmer-Therapie
ns	nicht signifikant
p. o.	per os
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PgR	Progesterorezeptor
PgRA	Progesterorezeptor A
PgRB	Progesterorezeptor B
pH	pH-Wert
post	nach der Therapie
PR	<i>partial remission</i>
prae	vor der Therapie
pTMA	Paraffin-Tissue-Microarray
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
Rand. Stud.	Randomisierte Studie
RNA	Ribonukleinsäure

s	signifikant
SD	<i>stable disease</i>
SDG	Saccharose-Dichtegradient
Tab.	Tabelle
TAF	Transkriptions-Aktivierungsfaktoren
Tam.	Tamoxifen
Tax.	Taxane
Ther.	Therapie
TMA	Tissue Microarray
Tor.	Toremifen
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
WB	<i>Western Blot</i>
z. B.	zum Beispiel

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zwei Modelle für die ER-Signalkaskade.....	- 2 -
Abb. 2: Die Strukturdomänen von ER α und ER β	- 3 -
Abb. 3: Einfluss der Östrogenrezeptoren auf die Transkription	- 6 -
Abb. 4: Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	- 12 -
Abb. 5: Prinzip der TMA-Herstellung	- 19 -
Abb. 6: Prinzip der immunhistochemischen Färbung	- 22 -
Abb. 7: Studiendesign	- 32 -
Abb. 8: Gliederung der Ergebnisse	- 34 -
Abb. 9: ER α -Status und Proliferation.....	- 35 -
Abb. 10: Entwicklung von ER α im Therapieverlauf	- 36 -
Abb. 11: ER α -Entwicklung und Therapieansprechen.....	- 37 -
Abb. 12: ER β g-Expression und Proliferation	- 39 -
Abb. 13: ER β g-Entwicklung im Therapieverlauf	- 40 -
Abb. 14: ER β g-Expression und Therapieansprechen	- 41 -
Abb. 15: Änderung der ER β 1-Expression im Therapieverlauf.....	- 42 -
Abb. 16: ER β 2-Expression und Proliferation	- 44 -
Abb. 17: ER β 2-Entwicklung im Therapieverlauf	- 45 -
Abb. 18: ER β 2-Expression und Therapieansprechen	- 46 -
Abb. 19: ER β 2-Veränderung und Therapieansprechen	- 47 -
Abb. 20: PgR-Entwicklung im Therapieverlauf	- 49 -
Abb. 21: Übersicht über die Hormonrezeptorexpression.....	- 50 -
Abb. 22: Übersicht Immunhistochemie der Hormonrezeptoren.....	- 51 -
Abb. 23: Expressionsprofil der Chemotherapie-Gruppe	- 52 -
Abb. 24: Expressionsprofil der Therapie-Untergruppe 1 (Anthrazykline).....	- 53 -
Abb. 25: Expressionsprofil der Therapie-Untergruppe 2 (Taxane).	- 55 -

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: verwendete Chemikalien	- 13 -
Tab. 2: verwendete Reagenziensets	- 13 -
Tab. 3: verwendete Antikörper	- 14 -
Tab. 4: Puffer und Lösungen.....	- 15 -
Tab. 5: verwendete Geräte.....	- 15 -
Tab. 6: Sonstiges	- 16 -
Tab. 7: Therapieschemata.....	- 17 -
Tab. 8: Einsatzbedingungen der Primärantikörper	- 25 -
Tab. 9: Klassifizierung der Hormonrezeptor-Expression	- 30 -
Tab. 10: Änderung der ER α -Expression.....	- 58 -
Tab. 11: ER α als prädiktiver Wert.....	- 59 -
Tab. 12: ER β g als prädiktiver Wert.....	- 62 -
Tab. 13: ER β 1 als prädiktiver Wert.....	- 64 -
Tab. 14: ER β 2 als prädiktiver Wert.....	- 65 -
Tab. 15: PgR-Änderung im Therapieverlauf.....	- 68 -
Tab. 16: PgR als prädiktiver Wert.....	- 69 -
Tab. 17: Patientencharakteristik.....	- 89 -

6.4 Literaturverzeichnis

- Anderson T.J., Dixon J.M., Stuart M., Sahmoud T., Miller W.R. (2002). Effect of neoadjuvant treatment with anastrozole on tumour histology in postmenopausal women with large operable breast cancer. *Br J Cancer*, 87: 334-8.
- Arens N., Bleyl U., Hildenbrand R. (2005). HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Virchows Arch*, 446: 489-96.
- Bafaloukos D. (2005). Neo-adjuvant therapy in breast cancer. *Ann Oncol*, 16: 174-81.
- Bain D.L., Franden M.A., McManaman J.L., Takimoto G.S., Horwitz K.B. (2001). The N-terminal region of human progesterone B-receptors: biophysical and biochemical comparison to A-receptors. *J Biol Chem*, 276: 23825-31.
- Balfe P., McCann A., McGoldrick A., McAllister K., Kennedy M., Dervan P., Kerin M.J. (2004 b). Estrogen receptor alpha and beta profiling in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, 30: 469-74.
- Balfe P.J., McCann A.H., Welch H.M., Kerin M.J. (2004 a). Estrogen receptor beta and breast cancer. *Eur J Surg Oncol*, 30: 1043-50.
- Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K., Clark G.M. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*, 21: 1973-9.
- Beral V., Million Women Study Collaborators (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 362: 419-27.
- Bernstein L. (2006). The risk of breast, endometrial and ovarian cancer in users of hormonal preparations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 98: 288-96.
- Bershtein L.M., Poroshina T.E., Zimarina T.S., Tsyrlina E.V., Zhiltsova E.K., Kovalevskii A.Y., Semiglazov V.F. (2004). Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in primary breast neoplasms and tumors exposed to neoadjuvant hormonal therapy. *Bull Exp Biol Med*, 138: 494-6.

- Bhat R.A., Harnish D.C., Stevis P.E., Lyttle C.R., Komm B.S. (1998). A novel human estrogen receptor beta: identification and functional analysis of additional N-terminal amino acids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 67: 233-40.
- Bottini A., Berruti A., Bersiga A., Brunelli A., Brizzi M.P., Marco B.D., Cirillo F., Bolsi G., Bertoli G., Alquati P., Dogliotti L. (1996). Effect of neoadjuvant chemotherapy on Ki67 labelling index, c-erbB-2 expression and steroid hormone receptor status in human breast tumours. *Anticancer Res*, 16: 3105-10.
- Burcombe R.J., Makris A., Richman P.I., Daley F.M., Noble S., Pittam M., Wright D., Allen S.A., Dove J., Wilson G.D. (2005). Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer*, 92: 147-55.
- Cappelletti V., Celio L., Bajetta E., Allevi A., Longarini R., Miodini P., Villa R., Fabbri A., Mariani L., Giovanazzi R., Galante E., Greco M., Grazia Daidone M. (2004). Prospective evaluation of estrogen receptor-beta in predicting response to neoadjuvant antiestrogen therapy in elderly breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 11: 761-70.
- Cavalieri E., Rogan E., Chakravarti D. (2004). The role of endogenous catechol quinones in the initiation of cancer and neurodegenerative diseases. *Methods Enzymol*, 382: 293-319.
- Chang H.G., Kim S.J., Chung K.W., Noh D.Y., Kwon Y., Lee E.S., Kang H.S. (2005). Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha gene. *J Mol Med*, 83: 132-9.
- Chang J., Powles T.J., Allred D.C., Ashley S.E., Clark G.M., Makris A., Assersohn L., Gregory R.K., Osborne C.K., Dowsett M. (1999). Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*, 17: 3058-63.
- Cianfrocca M., Goldstein L.J. (2004). Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*, 9: 606-16.
- Clarke R.B. (2006). Ovarian steroids and the human breast: regulation of stem cells and cell proliferation. *Maturitas*, 54: 327-34.
- Cleator S., Parton M., Dowsett M. (2002). The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 9: 183-95.

- Colleoni M., Viale G., Zahrieh D., Pruneri G., Gentilini O., Veronesi P., Gelber R.D., Curigliano G., Torrisi R., Luini A., Intra M., Galimberti V., Renne G., Nolè F., Peruzzotti G., Goldhirsch A. (2004). Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*, 10: 6622-8.
- Colozza M., de Azambuja E., Personeni N., Lebrun F., Piccart M.J., Cardoso F. (2007). Achievements in systemic therapies in the pregenomic era in metastatic breast cancer. *Oncologist*, 12: 253-70.
- Conneely O.M., Lydon J.P. (2000). Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids*, 65: 571-7.
- Cordera F., Jordan V.C. (2006). Steroid receptors and their role in the biology and control of breast cancer growth. *Semin Oncol*, 33: 631-41.
- Couse J.F., Korach K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 20: 358-417.
- Cowley S.M., Parker M.G. (1999). A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69: 165-75.
- Cunha G.R., Cooke P.S., Kurita T. (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol*, 67: 417-34.
- de Waard F., Thijssen J.H. (2005). Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special reference to nutritional status and first pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97: 451-8.
- Dotzlaw H., Leygue E., Watson P.H., Murphy L.C. (1997). Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 2371-4.
- Dougherty M.K., Schumaker L.M., Jordan V.C., Welshons W.V., Curran E.M., Ellis M.J., El-Ashry D. (2004). Estrogen receptor expression and sensitivity to paclitaxel in breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 3: 460-7.
- Dowsett M., Ebbs S.R., Dixon J.M., Skene A., Griffith C., Boeddinghaus I., Salter J., Detre S., Hills M., Ashley S., Francis S., Walsh G., Smith I.E. (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: 2477-92.
- Duffy M.J. (2005). Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem*, 51: 494-503.

- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 351: 1451-67.
- Elledge R.M., Green S., Pugh R., Allred D.C., Clark G.M., Hill J., Ravdin P., Martino S., Osborne C.K. (2000). Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer*, 89: 111-7.
- Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4258-65.
- Esslimani-Sahla M., Simony-Lafontaine J., Kramar A., Lavaill R., Mollevi C., Warner M., Gustafsson J.A., Rochefort H. (2004). Estrogen receptor beta (ER beta) level but not its ER beta cx variant helps to predict tamoxifen resistance in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 10: 5769-76.
- Frassoldati A., Adami F., Banzi C., Criscuolo M., Piccinini L., Silingardi V. (1997) Changes of biological features in breast cancer cells determined by primary chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 44: 185-92.
- Funke I., Eiermann W., Engel J., Harbeck N., Janni W., Lebeau A., Permanetter W., Rack B., Untch M., Wolf C. (2005). *Manual Mammakarzinome: Prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom*. Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag, 85-85.
- Fuqua S.A., Wiltschke C., Zhang Q.X., Borg A., Castles C.G., Friedrichs W.E., Hopp T., Hilsenbeck S., Mohsin S., O'Connell P., Allred D.C. (2000). A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res*, 60: 4026-9.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID), Robert Koch Institut (2006). *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*. 5. überarbeitete Auflage, 1-140.
- Giersiepen K., Heitmann C., Janhsen K., Lange C. (2006). *Brustkrebs. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, 25: 1-42.
- Goldhirsch A., Glick J.H., Gelber R.D., Coates A.S., Thurlimann B., Senn H.J. (2005). Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*, 16: 1569-83.

- Greene G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker A., Hort Y., Shine J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231: 1150-4.
- Guarneri V., Broglio K., Kau S.W., Cristofanilli M., Buzdar A.U., Valero V., Buchholz T., Meric F., Middleton L., Hortobagyi G.N., Gonzalez-Angulo A.M. (2006). Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol*, 24: 1037-44.
- Guarneri V., Conte P.F. (2004). The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 1: 149-61.
- Honrado E., Benitez J., Palacios J. (2005). The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol*, 18: 1305-20.
- Horner-Glister E., Maleki-Dizaji M., Guerin C.J., Johnson S.M., Styles J., White I.N. (2005). Influence of oestradiol and tamoxifen on oestrogen receptors-alpha and -beta protein degradation and non-genomic signalling pathways in uterine and breast carcinoma cells. *J Mol Endocrinol*, 35: 421-32.
- Horwitz K.B., Alexander P.S. (1983). In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology*, 113: 2195-201.
- Iwase H., Zhang Z., Omoto Y., Sugiura H., Yamashita H., Toyama T., Iwata H., Kobayashi S. (2003). Clinical significance of the expression of estrogen receptors alpha and beta for endocrine therapy of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 52 Suppl 1: 34-8.
- Järvinen T.A., Peltö-Huikko M., Holli K., Isola J. (2000). Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol*, 156: 29-35.
- Kariya S., Ogawa Y., Nishioka A., Moriki T., Ohnishi T., Ito S., Murata Y., Yoshida S. (2005). Relationship between hormonal receptors, HER-2, p53 protein, Bcl-2, and MIB-1 status and the antitumor effects of neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy in invasive breast cancer patients. *Radiat Med*, 23: 189-94.
- Katalanic A., Bartel C. (2006). Epidemiologie Mammakarzinom. Institut für Krebs epidemiologie e.V. Universität Lübeck, www.ike.uni-luebeck.de, 1-10.

- Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138: 863-70.
- Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5925-30.
- Lazennec G., Bresson D., Lucas A., Chauveau C., Vignon F. (2001). ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*, 142: 4120-30.
- Leung Y.K., Mak P., Hassan S., Ho S.M. (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:13162-7.
- Lewandowski S., Kalita K., Kaczmarek L. (2002). Estrogen receptor beta. Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett*, 524: 1-5.
- Leygue E., Dotzlaw H., Watson P.H., Murphy L.C. (1998). Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*, 58: 3197-201.
- Leygue E., Dotzlaw H., Watson P.H., Murphy L.C. (1999). Expression of estrogen receptor beta1, beta2, and beta5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer Res*, 59: 1175-9.
- Lonard D.M., Nawaz Z., Smith C.L., O'Malley B.W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell*, 5: 939-48.
- Martin M.B., Angeloni S.V., Garcia-Morales P., Sholler P.F., Castro-Galache M.D., Ferragut J.A., Saceda M. (2004). Regulation of estrogen receptor-alpha expression in MCF-7 cells by taxol. *J Endocrinol*, 180: 487-96.
- Mazouni C., Kau S.W., Frye D., Andre F., Kuerer H.M., Buchholz T.A., Symmans W.F., Anderson K., Hess K.R., Gonzalez-Angulo A.M., Hortobagyi G.N., Buzdar A.U., Pusztai L. (2007). Inclusion of taxanes, particularly weekly paclitaxel, in preoperative chemotherapy improves pathologic complete response rate in estrogen receptor-positive breast cancers. *Ann Oncol*, 18: 874-80.
- Miller W.R., Anderson T.J., Dixon J.M., Saunders P.T. (2006a). Oestrogen receptor beta and neoadjuvant therapy with tamoxifen: prediction of response and effects of treatment. *Br J Cancer*, 94: 1333-8.

- Miller W.R., Dixon J.M., Macfarlane L., Cameron D., Anderson T.J. (2003). Pathological features of breast cancer response following neoadjuvant treatment with either letrozole or tamoxifen. *Eur J Cancer*, 39: 462-8.
- Miller W.R., White S., Dixon J.M., Murray J., Renshaw L., Anderson T.J. (2006b). Proliferation, steroid receptors and clinical/pathological response in breast cancer treated with letrozole. *Br J Cancer*. 94: 1051-6.
- Mosselman S., Polman J., Dijkema R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 392: 49-53.
- Murphy L.C., Leygue E., Niu Y., Snell L., Ho S.M., Watson P.H. (2002). Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer. *Br J Cancer*, 87: 1411-6.
- Murphy L.C., Peng B., Lewis A., Davie J.R., Leygue E., Kemp A., Ung K., Vendetti M., Shiu R. (2005). Inducible upregulation of oestrogen receptor-beta1 affects oestrogen and tamoxifen responsiveness in MCF7 human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol*, 34: 553-66.
- Ogawa S., Inoue S., Watanabe T., Orimo A., Hosoi T., Ouchi Y., Muramatsu M. (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*, 26: 3505-12.
- Omoto Y., Eguchi H., Yamamoto-Yamaguchi Y., Hayashi S. (2003). Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbetacx/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7. *Oncogene*, 22: 5011-20.
- Palmieri C., Cheng G.J., Saji S., Zelada-Hedman M., Warri A., Weihua Z., Van Noorden S., Wahlstrom T., Coombes R.C., Warner M., Gustafsson J.A. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 9: 1-13.
- Palmieri C., Lam E.W., Mansi J., MacDonald C., Shousha S., Madden P., Omoto Y., Sunters A., Warner M., Gustafsson J.A., Coombes R.C. (2004). The expression of ER beta cx in human breast cancer and the relationship to endocrine therapy and survival. *Clin Cancer Res*, 10: 2421-8.
- Penault-Llorca F., Cayre A., Bouchet Mishellany F., Amat S., Feillel V., Le Bouedec G., Ferrière J.P., De Latour M., Chollet P. (2003). Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int J Oncol*, 22: 1319-25.

- Peng B., Lu B., Leygue E., Murphy L.C. (2003). Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms. *J Mol Endocrinol*, 30: 13-29.
- Pfeifer B., Preiß J., Unger C. (2006). *Onkologie Integrativ: Gynäkologische Tumoren (Kapitel 12)*. 1. Auflage, Urban und Fischer.
- Picard N., Charbonneau C., Sanchez M., Licznar A., Busson M., Lazennec G., Tremblay A. (2007). Phosphorylation of Activation Function-1 Regulates Proteasome-dependent Nuclear Mobility and E6-AP Ubiquitin Ligase Recruitment to the Estrogen Receptor {beta}. *Mol Endocrinol*, [Epub ahead of print].
- Ponglikitmongkol M., Green S., Chambon P. (1988). Organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J*, 7: 3385-8.
- Poola I., Abraham J., Liu A. (2002). Estrogen receptor beta splice variant mRNAs are differentially altered during breast carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82: 169-79.
- Prisack H.B., Karreman C., Modlich O., Audretsch W., Danae M., Rezai M., Bojar H. (2005). Predictive biological markers for response of invasive breast cancer to anthracycline/cyclophosphamide-based primary (radio-) chemotherapy. *Anticancer Res*. 25: 4615-21.
- Reeves G.K., Beral V., Green J., Gathani T., Bull D.: Million Women Study Collaborators (2006). Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *Lancet, Oncol* 7: 910-8.
- Ring A.E., Smith I.E., Ashley S., Fulford L.G., Lakhani S.R. (2004). Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*, 13: 2012-7.
- Roger P., Sahla M.E., Makela S., Gustafsson J.A., Baldet P., Rochefort H. (2001). Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res*, 61: 2537-41.
- Russo I.H., Russo J. (1996). Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, 104: 938-67.
- Russo J., Ao X., Grill C., Russo I.H. (1999). Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat*, 53: 217-27.

- Russo J., Russo I.H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102: 89-96.
- Saji S., Hirose M., Toi M. (2005). Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56: 21-6.
- Saji S., Jensen E.V., Nilsson S., Rylander T., Warner M., Gustafsson J.A. (2000). Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 337-42.
- Saji S., Omoto Y., Shimizu C., Warner M., Hayashi Y., Horiguchi S., Watanabe T., Hayashi S., Gustafsson J.A., Toi M. (2002). Expression of estrogen receptor (ER) (beta)cx protein in ER(alpha)-positive breast cancer: specific correlation with progesterone receptor. *Cancer Res*, 62: 4849-53.
- Salmon R.J., Alran S., Malka I., de Cremoux P., Rosty C., Languille O., Campana F.; Breast Group of the Institut Curie, Sigal-Zafrani B. (2006). Estrogen receptors evolution in neoadjuvant aromatase inhibitor (AI) therapy for breast cancer in elderly women: stability of hormonal receptor expression during treatment. *Am J Clin Oncol*, 29: 385-8.
- Schmidt-Matthiesen H., Bastert G., Wallwiener D. (2002). *Gynäkologische Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge auf Basis der AGO-Leitlinien*. 7. Auflage, Schattauer.
- Schneider J., Lucas R., Sánchez J., Ruibal A., Tejerina A., Martín M. (2000). Modulation of molecular marker expression by induction chemotherapy in locally advanced breast cancer: correlation with the response to therapy and the expression of MDR1 and LRP. *Anticancer Res*. 20: 4373-7.
- Secreto F.J., Monroe D.G., Dutta S., Ingle J.N., Spelsberg T.C. (2007). Estrogen receptor alpha/beta isoforms, but not betacx, modulate unique patterns of gene expression and cell proliferation in Hs578T cells. *J Cell Biochem*, 101: 1125-47.
- Shaaban A.M., O'Neill P.A., Davies M.P., Sibson R., West C.R., Smith P.H., Foster C.S. (2003). Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 27: 1502-12.
- Shapiro C.L., Recht A. (2001). Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 344: 1997-2008.
- Skliris G.P., Carder P.J., Lansdown M.R., Speirs V. (2001). Immunohistochemical detection of ERbeta in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer*, 84: 1095-8.

- Speirs V., Carder P.J., Lane S., Dodwell D., Lansdown M.R., Hanby A.M. (2004). Oestrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer. *Lancet Oncol* 5:174-81.
- Speirs V., Kerin M.J. (2000). Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg.* 87: 405-9.
- Speirs V., Malone C., Walton D.S., Kerin M.J., Atkin S.L. (1999). Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Res*, 59: 5421-4.
- Sternlicht M.D., Kouros-Mehr H., Lu P., Werb Z. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation*, 74: 365-81.
- Sui M., Huang Y., Park B.H., Davidson N.E., Fan W. (2007). Estrogen receptor alpha mediates breast cancer cell resistance to paclitaxel through inhibition of apoptotic cell death. *Cancer Res*, 67: 5337-44.
- Taucher S., Rudas M., Gnant M., Thomanek K., Dubsy P., Roka S., Bachleitner T., Kandioler D., Wenzel C., Steger G., Mittlböck M., Jakesz R. (2003). Sequential steroid hormone receptor measurements in primary breast cancer with and without intervening primary chemotherapy. *Endocr Relat Cancer*, 10: 91-8.
- Taylor A.H., Al-Azzawi F. (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol*, 24: 145-55.
- Toft D., Gorski J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 55: 1574-81.
- Tong D., Schuster E., Seifert M., Czerwenka K., Leodolte S., Zeillinger R. (2002). Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 71: 249-55.
- Tsai M.J., O'Malley B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem*, 63: 451-86.
- Vinayagam R., Sibson D.R., Holcombe C., Aachi V., Davies M.P. (2007). Association of oestrogen receptor beta 2 (ER beta 2/ER beta cx) with outcome of adjuvant endocrine treatment for primary breast cancer--a retrospective study. *BMC Cancer*, 7: 131.
- Vladusic E.A., Hornby A.E., Guerra-Vladusic F.K., Lupu R. (1998). Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res*, 58: 210-4.

Vyzula R., Dusek L., Zaloudík J., Demlová R., Klimes D., Selvekerová S. (2004). Breast cancer and neoadjuvant therapy: any predictive marker? *Neoplasma*, 51: 471-80.

Williams C., Brunskill S., Altman D., Briggs A., Campbell H., Clarke M., Glanville J., Gray A., Harris A., Johnston K., Lodge M. (2006). Cost-effectiveness of using prognostic information to select women with breast cancer for adjuvant systemic therapy. *Health Technol Assess*, 10: 1-204.

7. Anhang

Tab. 17: Patientencharakteristik

Abkürzungen: Prä. = Prämenopausal, Peri. = Perimenopausal, Post. = Postmenopausal, ypT = Tumorausdehnung, yN = Lymphknotenstatus, AI = Aromataseinhibitoren, PR = *partial remission*, SD = *stable disease*.

Merkmal	Anzahl
Total	• 69
Menopausestatus	
• Prä.	• 12
• Peri.	• 8
• Post.	• 49
Ausdehnung	
• ypT1	• 17
• ypT2	• 33
• ypT3	• 12
• ypT4	• 7
LK-Status	
• yN neg.	• 24
• yN pos.	• 45
Grading	
• I	• 3
• II	• 47
• III	• 19
Histologie	
• duktal	• 44
• lobulär	• 14
• duktulo-lobulär	• 8
• andere	• 3
Medikation	
• Anthrazyklin-basiert	• 17
• Taxan-basiert	• 30
• AI	• 22
Response	
• PR	• 34
• SD	• 35

Danksagung

Herzlichen Dank an Prof. Dr. med. D. Wallwiener für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Universitätsfrauenklinik Tübingen erstellen zu können.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. E.-F. Solomayer und Frau Prof. Dr. med. T. Fehm und für das Überlassen des Themas und die gute Unterstützung bei diesem Projekt.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Hans Neubauer für die gute Betreuung und Zusammenarbeit sowie das große wissenschaftliche Interesse an dieser Arbeit.

Für die Herstellung des pTMA und die Hilfe bei der Auswertung bedanke ich mich herzlich bei Dr. med. U. Vogel vom Pathologischen Institut des UKT.

Danke an Herrn Dr. Christoph Meisner vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Weiter bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Christina Neuburger, Ute Hilcher, Beate Kootz und Nicole Petzke für jegliche Unterstützung bei der Laborarbeit.

Dankeschön an Sandra Rodemeister und Alexandra Ruoff für eure Hilfe.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie, die mir mein Studium ermöglicht haben. Vielen Dank, dass Ihr mich immer unterstützt und so viel Rücksicht genommen habt.

Danke Dir Julia, für alle Geduld, jedes ermutigende Wort und jedes Gebet. Das hat mich immer wieder motiviert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin Kurt Friedrich Wurster
Geburtstag	08. Juli 1981
Geburtsort	Freudenstadt

Schulbildung

1988-1992	Grundschule: GHWRS Simmersfeld
1992-2001	Christophorus-Gymnasium Altensteig

Zivildienst

2001-2002	Kreiskrankenhaus Freudenstadt
-----------	-------------------------------

Hochschulbildung

2003-2005	Vorklinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2005	Ärztliche Vorprüfung
2005-2008	Klinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2008	Beginn des Praktischen Jahrs am Klinikum Stuttgart
13.11.2009	Ärztliche Prüfung
