Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter
Unter Anleitung von PD Dr. rer. nat. R. Simon

Prävalenz und klinische Relevanz der TPD52 Gen-Amplifikation in humanen Mammakarzinomen

Promotion

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Bernhard Martin Andre Nagel
aus Sindelfingen

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 21.02.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Dr. I. Witzel
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. B. Hünecke

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis: 4

2 Einleitung 7

2.1 Das Mammakarzinom 7

2.2 Genetik des Mammakarzinoms 18

2.3 TPD52 25

2.4 Ziel der Arbeit 28

3 Material und Methoden 30

3.1 Untersuchungsmaterial 30

3.1.1 Breast Prognosis TMA 30

3.1.2 Reagenzien und Geräte 32

3.2 Methoden 34

3.2.1 Kultivierung pBAC-E.coli-Klonen 34

3.2.2 pBac-DNA-Extraktion aus einer pBac-E.coli-Flüssigkultur 35

3.2.3 FISH-Sondenmarkierung 35

3.2.4 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) 37

3.2.5 Auswertung 39

3.2.6 Statistik 39

4 Ergebnisse 40

4.1 TPD52 Amplifikation im Mammakarzinom 40

4.1.1 Assoziation zum Tumorphänotyp 41

4.1.2 Assoziation zu molekularen Parametern: 42

4.1.3 Assoziation zur Patientenprognose 45

5 Diskussion 47

6 Zusammenfassung 52

7 Literaturverzeichnis 53

8 Anhang 73
8.1 Tabellenverzeichnis 73
8.2 Abbildungsverzeichnis 73
9 Danksagung 74
10 Lebenslauf 75
11 Erklärung 76

1 Abkürzungsverzeichnis:

AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 = PKB
Anti-DIG-AK	Anti Digoxigenin-Antikörper
ASK1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
BAC	bacterial artificial chromosome (künstliches Bakterienchromosom)
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bp	Basenpaare (base pair)
BRCA 1; 2	breast cancer 1; 2, early onset
CCND1	cyclin D1
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEP	Centromeric probe
c-MYC (v-MYC)	myelocytomatosis viral oncogene homolog
COT-DNA	competitor DNA
CpG-ODN	Cytosin phosphatidyl Guanin Oligodesoxynukleotid
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
dH_2O	destilliertes Wasser
DCIS	duktales Carcinoma in-situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EB	Elution Buffer
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGFR	epidermal growth factor receptor gene
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ERBB	siehe: HER 2
FISH	Fluoreszens in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor

GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HCL	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HER2 (v-erb-b2)	erythroblastic leucemia viral oncogen homolog
Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulin growth factor
IHC	Immunhistochemie
kDa	kilo Dalton
Ki67	Antikörper der MKI67 (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67) bindet.
LAMB1	laminin, beta 1
LCIS	lobuläres Carcinoma in-situ
LOH	loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotie)
MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog
mD52	murines TPD52
MMT-Virus	murine mammary tumour virus
MRPS28	mitochondrial ribosomal protein S28
NaOH	Natriumhydroxid
NaSCN	Natriumthiocyanat
NP40	Octylphenoloxypolyethoxyethanol
OSP	overlapping synthetic peptide (Überlappendes synthetisches Peptid)
PBS	Phophate buffered saline
PEST-Sequenz	Peptidsequenz die viel Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) enthält
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKB	Protein Kinase B
POL I	Polymerase 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SK-BR-3	Humane Brust Adenokarzinom Zell-Linie
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
SSC	saline-sodium citrate
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TCEB1	transcription elongation factor B
TMA	tissue micro array
TMEM70	transmembrane protein 70
TNM	Tumor Staging: tumour, lymph nodes, metastasis
TPD52	tumor protein D52
TP53 Gen	Tumor (suppressor Protein) 53 Gen
TWEEN	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UICC	International Union Against Cancer
VAMP8	vesicle-associated membrane protein 8
WHO	World Health Organisation

2 Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau. Weltweit macht es 23% der weiblichen Malignome aus und ist für 14% der krebsbedingten Todesfälle verantwortlich (Jemal et al., 2011). Die Inzidenzen sind weltweit stetig ansteigend, allerdings sind große Unterschiede zwischen entwickelten Industriestaaten und Entwicklungsländern zu verzeichnen. So stieg das kumulative Erkrankungsrisiko bei 15-79 jährigen Frauen in Entwicklungsländern von 2,4% 1980 auf 3,8% 2010, in entwickelten Ländern von 6,5% 1980 auf 8,6% 2010 an. Die Zahl der Todesfälle stieg weltweit von 250.000 1980 auf 425.000 2010 an. Allerdings konnten die Überlebensraten deutlich verbessert werden, was sich in einer abnehmenden Mortalität-zu-Inzidenz Rate ausdrückt. Diese Rate sank von 1980 bis 2010 in Entwicklungsländern von etwa 0,37 auf 0,26 und in Industriestaaten von etwa 0,32 auf 0,2 (Forouzanfar et al., 2011).

In Deutschland erkranken zurzeit jährlich mehr als 58.000 Frauen an Brustkrebs. Damit ist das Mammakarzinom in der Bundesrepublik für 29% aller Krebserkrankungsfälle bei Frauen verantwortlich. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren und damit 6 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Die relativen 5-Jahresüberlebensraten für Brustkrebspatientinnen in Deutschland werden aktuell mit 83 - 87% angegeben (Robert Koch-Institut, 2010).

Die Ursache des Brustkrebses ist noch weitgehend unklar. Bekannt sind unterschiedliche Risikofaktoren, die zu einem höheren relativen Erkrankungsrisiko führen:

Eine frühe erste Regelblutung führt zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko (Brinton et al., 1988; Hsieh et al., 1990; Kvale and Heuch, 1988). So hätten Frauen mit einer Menarche jenseits des 15. Lebensjahres ein um 23% geringeres Risiko als Frauen mit einer ersten Menstruationsblutung vor dem 12. Lebensjahr (Brinton et al., 1988). Möglicherweise könnte eine frühe Menarche ein stärkerer Risikofaktor für Brustkrebs darstellen, der vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert wird, als für Brustkrebs, der nach der 5. Lebensdekade diagnostiziert wird (Helmrich et al., 1983; Kampert et al., 1988). Jedoch belegen eine Vielzahl von Untersuchungen, dass unabhängig vom Zeitpunkt der Diagnose, eine frühe Menarche ein Risikofaktor für Brustkrebs ist (Brinton et al., 1988; Choi et al., 1978; Hsieh et al., 1990; Kvale and Heuch, 1988; Paffenbarger et al., 1980).

Kinderlosigkeit oder die späte Geburt des ersten Kindes wurden ebenfalls als Risikofaktoren erkannt. Auch Unfruchtbarkeit, sowie das späte Auftreten der Menopause, erhöhen das Risiko an Brustkrebs zu erkranken (Kelsey et al., 1993). Neuere Daten weisen daraufhin, dass das Alter zum Zeitpunkt jedweder Geburt und nicht nur der Ersten ausschlaggebend für eine Risikoerhöhung ist. Geburten vor dem 30. Lebensjahr scheinen einen protektiven Effekt zu haben (Wohlfahrt and Melbye, 2001). Allerdings beeinflussen diese reproduktiven Faktoren vor Allem das Risiko für Hormonrezeptor positive Mammakarzinome (Yang et al., 2011).

Orale Kontrazeptiva haben einen leichten Effekt auf das Brustkrebsrisiko. So ist dieses bei gegenwärtigem und kürzlich zurückliegendem Gebrauch um 15 bis 20% erhöht, verglichen mit Probandinnen, die niemals orale Kontrazeptiva eingenommen haben (CGHFBC, 1996). Allerdings gleicht sich innerhalb von 10 Jahren nach dem Absetzen der Präparate, unabhängig von der Dauer der Einnahme, das relative Risiko an jenes der Nichtnutzerinnen an. Dies ist insbesondere von Relevanz, da Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen jung sind und ohnehin ein geringes Risiko haben an Brustkrebs zu erkranken. Deshalb ist die Zunahme des Erkrankungsrisikos durch orale Kontrazeptiva von geringer Bedeutung (La Vecchia et al., 2001). Die Hormontherapie zur Linderung postklimakterischer Beschwerden erhöht das Brustkrebsrisiko (Collins et al., 2005; Farquhar et al., 2005; Greiser et al., 2005; Lee et al., 2005; Shah et al., 2005). Ein erhöhtes Risiko zeigte sich aber erst nach einer Anwendung über fünf oder mehr Jahre (Lee et al., 2005; Shah et al., 2005). Die Risikoerhöhung ist bei kombinierten Östrogen-Gestagen-Präparaten ausgeprägter als bei Östrogen-Präparaten (Farquhar et al., 2005; Greiser et al., 2005). Jedoch sinkt das Risiko nach Absetzen der Hormontherapie innerhalb weniger Jahre und unterscheidet sich dann nicht vom Risiko derjenigen Frauen, die niemals eine Hormontherapie angewendet haben (Farquhar et al., 2005). Diese Ergebnisse sind Grundlage der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. In einer neuen Studie wurde die Hormontherapie als Risikofaktor für Brustkrebs in Frage gestellt (Stevenson et al., 2011).

Ein viel diskutiertes Thema ist der Einfluss von Ernährung auf das Brustkrebsrisiko. Die festgestellten Effekte, wie das Absinken des Risikos durch viel Obst und Gemüse, sowie das steigende Risiko durch den vermehrten Konsum von Grillfleisch, rotem Fleisch und tierischen Fetten, bewerteten manche Autoren als geringfügig (Ewertz et al., 2001; Fackenthal et al., 2001). Aktuell konnte kein Zusammenhang von erhöhtem Brustkrebsrisiko

und dem Konsum von tierischen Fetten gefunden werden (Park et al., 2011). Jedoch konnte eine neue Studie einen eindeutig protektiven Effekt von vermehrtem Gemüsekonsum aufzeigen (Masala et al., 2012). Offene Fragen in diesem Gebiet sind die Langzeiteffekte von Substanzen, die während des Bratens entstehen (z.B. heterozyklische Amine), oder auch Rückstände von Pestiziden auf Gemüse oder Obst.

Alkoholkonsum ist studienübergreifend mit einem leichten Brustkrebsrisiko assoziiert (Smith-Warner et al., 1998). Die Einnahme von Hormonen oder auch andere Faktoren, wie zum Beispiel genetische Polymorphismen (Park et al., 2000), könnten das alkoholbedingte Risiko beeinflussen.

Tabakkonsum wurde ebenfalls als Risikofaktor identifiziert. Allerdings spielt die genetische Ausstattung bezüglich verstoffwechselnder Enzyme hier eine große Rolle. So konnten verschiedene Metaanalysen für rauchende Frauen mit einem N- acetyltransferase 2 (NAT2) langsam acetylierenden Genotyp ein um 27% erhöhtes Brustkrebsrisiko im Vergleich zu Nichtraucherinnen feststellen. Bei mehr als 20 Packyears wurde bei diesen Frauen eine Risikoerhöhung von 49% errechnet. Raucherinnen mit einem NAT2 schnell acetylierenden Genotyp hatten kein erhöhtes Risiko. Es konnten klare Dosis-Wirkungs-Beziehungen bezüglich der Anzahl der Packyears und Gesamtdauer der Exposition hergestellt werden. Diese Ergebnisse waren für prä – und postmenopausalen Brustkrebs einheitlich. Auch erhöht Passivrauchen das Brustkrebsrisiko vor der Menopause um 65% bei, die selbst niemals geraucht hatten. Bei postmenopausalen Frauen ist die Beweislage unzureichend. Für diese Zusammenhänge gibt es überzeugende biologische Belege. So enthält Zigarettenrauch über 20 verschiedene Karzinogene, unter anderen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und heterozyklische Amine, welche in Tierversuchen über genotoxische Mechanismen Brustkrebs auslösen (Johnson et al., 2011).

Schon lange ist bekannt, dass Übergewicht das Brustkrebsrisiko bei postmenopausalen Frauen erhöht. Der Zusammenhang scheint weitestgehend unabhängig von anderen Risikofaktoren zu sein und sich mit zunehmendem Alter noch zu verstärken. Allerdings scheint das Ansteigen des Brustkrebsrisikos durch steigenden body-mass-index (BMI) vor allem in Ländern mit eher niedriger Brustkrebsinzidenz an Einfluss zu gewinnen. In Hochrisikoländern scheint sich das Risiko bei einem BMI von etwa 25kg/m² zu stabilisieren, was bei Ländern mit niedrigem oder mittlerem Risiko nicht der Fall ist. Die Gewichtszunahme im Erwachsenenalter ist vor allem bei denjenigen Frauen ein einflussreicher und konstanter Risikofaktor, die nach ihrer Menopause nicht an einer Hormonthera-

pie teilgenommen haben. Dieser Zusammenhang könnte durch den erhöhten endogenen Östrogen-Spiegel bei übergewichtigen Frauen erklärbar sein. Körperliche Aktivität, welche mit einem geringerem Brustkrebsrisiko einhergeht, ist jedoch nicht von der Menopause abhängig, sondern wirkt sich bei allen Frauen gleichermaßen aus (Vainio, 2002).

Epidemiologische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Geschlechtshormone (Östrogene, Progestagene, Androgene) eine wichtige Funktion bei der Entwicklung des Mammakarzinoms einnehmen. So deuten vor allem die Risikoerhöhung durch eine frühe Menarche und eine späte Menopause auf eine Rolle von Östrogen und auch Gestagenen in der Pathogenese des Mammakarzinoms hin (Travis and Key, 2003). Auch steigen die Neuerkrankungsraten, im Gegensatz zu nicht-hormonabhängigen Karzinomen, wie dem kolorektalen Karzinom, nicht überproportional mit zunehmendem Alter an. Die Inzidenzraten steigen prämenopausal deutlich steiler an als postmenopausal, wenn die Eierstöcke die Produktion von Östrogen und Progesteron einstellen und die ovarielle Androgenproduktion nach und nach abnimmt (Key and Pike, 1988; Pike et al., 1993). Die Östrogen-Überschuss-Hypothese ist hier von zentraler Bedeutung. Sie besagt, dass das Brustkrebsrisiko durch erhöhte Östrogenspiegel gesteigert wird, indem die zirkulierenden Hormone am Brustgewebe mutagen und proliferationsfördernd wirken (Martin and Boyd, 2008; Pike et al., 1993; Russo and Russo, 2004; Travis and Key, 2003). Östradiol erhöht die Zellteilungsrate von Brustdrüsenzellen *in vitro* (Key, 1999). Östrogene und ihre Metaboliten verursachen sowohl in Zellkultur als auch in Tierversuchen DNA-Schäden, genetische Instabilität und Zellmutationen (Travis and Key, 2003). Das Risiko ist bei denjenigen Frauen nach der Menopause höher, die erhöhte Testosteron – und Androstendion – Plasmaspiegel haben, erniedrigte Spiegel des Sexualhormon bindenden Globulins (SHBG), sowie erhöhte Östron – und Östradiolspiegel und freies Östradiol, welches nicht an SHBG gebunden ist (Key et al., 2002; Pike et al., 1993; Tavassoli F.A., 2003). Eine zweite wichtige Theorie ist die Östrogen/Progesteron – Hypothese, welche besagt, dass das Krebsrisiko bei erhöhten Plasma – und Gewebsspiegeln beider Hormone noch etwas höher ist als bei alleinigem Östrogenüberschuss (Bernstein and Ross, 1993; Key, 1999). Bei Frauen vor der Menopause konnte in mehreren Studien kein Zusammenhang von Brustkrebsrisiko und erhöhten Östrogen-, Progesteron- und Androgen - Plasmaspiegeln gefunden werden (Bernstein and Ross, 1993; Helzlsouer et al., 1994; Rosenberg et al., 1994; Secreto and Zumoff, 1994; Thomas et al., 1997). Allerdings fand eine

neue umfangreiche Metaanalyse eine leichte Risikoerhöhung bei prämenopausalen Frauen durch erhöhte endogene Östradiolspiegel (Walker et al., 2011).
Eine der Folgen von Übergewicht und mangelnder Bewegung ist die Entwicklung einer Insulinresistenz. Erhöhte Insulinspiegel könnten in Ovarien und Nebennieren zu einer vermehrten Ausschüttung von Geschlechtshormonen, insbesondere Androgenen, sowie zu einer Abnahme der Syntheserate der Leber und damit auch von SHBG, führen (Kaaks, 1996). Erhöhte Plasmaandrogenspiegel führen vor allem postmenopausal zu verstärkter Östrogenproduktion im Fettgewebe und damit zu ansteigenden Östron – und Östradiol – Spiegeln. Jedoch erhielt die Hypothese, dass chronische Hyperinsulinämie erklären könnte, warum postmenopausal niedrige SHBG – Plasmaspiegel und erhöhte Androgen – und Östrogenspiegel mit einem erhöhtem Brustkrebsrisiko assoziiert sind (Kaaks, 1996), nur begrenzt Zuspruch (Del Giudice et al., 1998; Kaaks et al., 2002). Im Mausmodell fördert Hyperinsulinämie die Bildung von Lungenmetastasen ausgehend von primären Mammakarzinomen (Ferguson et al., 2012).
Zuletzt bleibt noch die Virus - Hypothese zu erwähnen, die auf der Grundlage von Tierexperimenten entwickelt wurde. In Mäusen ist hier der MMT-Virus, ein Retrovirus, ein Auslöser für Brustkrebs und wird durch die Muttermilch auf die Tochtertiere übertragen (Tavassoli, 2003). Auch sind erhöhte Cytomegalievirus-Antikörperspiegel beim Menschen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Cox et al., 2010).

Mammakarzinome leiten sich aus Epithelien der Brustdrüse, am häufigsten aus den Epithelzellen der terminalen duktulolobulären Einheit ab. Brusttumore können aber nicht nur vom Epithel, sondern auch wie das Lipom, vom Stroma der Brust oder wie der Phylloidestumor von beiden Geweben abstammen. 40 – 50% der Tumore treten im oberen äußeren Quadranten der Brust auf.
Mammakarzinome metastasieren häufig lymphogen und hämatogen und neigen sehr früh zu einer generalisierten Tumoraussaat. Nach einer Therapie mit rezidivfreiem Intervall sind Spätmetastasen nach über 10 Jahren nicht selten. Entlang der Lymphbahnen siedeln sich die Karzinome vor allem in die axillären Lymphknoten ab, aber auch retrosternale und supraklavikuläre Lymphknoten sind betroffen. Über die Blutbahn metastasieren Mammakarzinome häufig in Beckenknochen, Wirbelkörper oder Schädelkalotte, aber auch in Organe wie die Lunge, die Leber oder das Gehirn (Riede, 2004).

Die Mehrzahl der Frauen stellt sich mit Symptomen vor, obwohl seit der Einführung des Mammographie Screenings für die Altersgruppe der 50-69 jährigen eine steigende Anzahl von asymptomatischen Fällen diagnostiziert wird. Es gibt beim Mammakarzinom keine spezifischen Zeichen oder Symptome, die eine sichere Differentialdiagnose zu einer Vielzahl von gutartigen Erkrankungen der Brust erlauben würden. Jedoch treten gutartigen Erkrankungen bei jungen Frauen wesentlich häufiger auf, während bösartige Erkrankungen häufiger bei älteren Frauen sind. Das häufigste Symptom bei Frauen sind Knoten in der Brust, die sowohl schmerzhaft, als auch schmerzlos sein können. Abnormitäten der Brustwarze, Einziehungen oder Ekzeme sind weniger häufig. Veränderungen der Brust sollten sowohl klinisch, als auch durch bildgebende Verfahren (Mammographie und Ultraschall) und durch eine feingewebliche Untersuchung abgeklärt werden. Die Mammographie sollte stets Teil der Bildgebung sein, außer bei Frauen unter 35 Jahren, bei welchen dieses Verfahren aufgrund des dichten Drüsenkörpers selten aussagekräftig ist. (Tavassoli F.A., 2003).

Die Diagnose wird mit Hilfe einer Gewebeprobe gestellt, die entweder sonographie - oder mammographiegesteuert mit einer Hohlnadel entnommen wird. Man unterscheidet bei den invasiven Mammakarzinomen folgende Unterformen:
Die größte Gruppe bilden die **invasiven duktalen Karzinome**, die sich vom Epithel der terminalen Gangsegmente herleiten und keiner anderen Kategorie invasiver Mammakarzinome angehören. Sie bekommen deshalb im Englischen das Kürzel „NOS“ (not otherwise specified) angehängt. In puplizierten Datensätzen reichte ihr Anteil von 40% bis 75% (Elston C.W., 1998). Diese weite Spanne könnte bedingt sein durch die fehlende Anwendung strenger Kriterien, die eine Zuordnung zu speziellen Unterformen erlauben würde, und auch durch die Tatsache, dass manche Arbeitsgruppen Tumoren, die eine Mischung aus duktalem NOS und einer Sonderform darstellen, der NOS – Gruppe und nicht einer gemischten Kategorie zuordnen. Das tubuläre Mammakarzinom stellt eine Sonderform dar. Es zeichnet sich durch eine hohe Gewebereife und eine gute Prognose aus. Ihr Anteil liegt bei unter 2%. Das papilläre Mammakarzinom, ebenfalls eine Sonderform, zeichnet sich durch gewucherte, papilläre Zellverbände aus, die im Gegensatz zu gutartigen Läsionen aus einem einzigen Zelltyp bestehen und nicht von Myoepithelzellen umgeben sind. Dieser Typ hat eine eher gute Prognose, tritt vor allem postmenopausal auf und hat einen Gesamtanteil von unter 1-2%. Eine weitere Sonderform ist das muzinöse

Mammakarzinom, welches seinen Namen durch die beträchtlichen Schleimmengen erhalten hat, welche die Zellen im Extrazellulärraum deponieren. Makroskopisch imponiert es deshalb durch seine gallertartige Schnittfläche. Es zeichnet sich ebenfalls durch eine gute Prognose aus, und macht 2% aller Mammakarzinome aus (Rasmussen et al., 1985; Scopsi et al., 1994; Toikkanen and Kujari, 1989). Die Sonderform des medullären Mammakarzinoms ist histologisch sehr zellreich und stromaarm. Die Zellen sind groß und undifferenziert und bilden dichte Zellnester. Das Stroma ist unterschiedlich stark durch Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert. Das medulläre Karzinom soll eine bessere Prognose als der duktale Typ haben (Jensen et al., 1997; Maier et al., 1977; Moore and Foote, 1949; Pedersen et al., 1995; Rapin et al., 1988; Reinfuss et al., 1995; Richardson, 1956; Ridolfi et al., 1977; Wargotz and Silverberg, 1988), allerdings wurde dies von anderen Arbeitsgruppen in Frage gestellt (Black et al., 1983; Ellis et al., 1992; Fisher et al., 1990). Der medulläre Typ hat einen Anteil von 1 bis 7% (Bloom et al., 1970; Rapin et al., 1988), abhängig von der Strenge der angewandten diagnostischen Kriterien. Weitere Sonderformen sind die kribriformen, mikropapillären, apokrinen und metaplastischen Mammakarzinome. Diese und noch weitere Formen kommen aber insgesamt sehr selten vor und sollen nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Auch in der Brust treten neuroendokrine Tumore auf, die ähnliche morphologische Eigenschaften haben wie die neuroendokrinen Tumore des Gastointestinaltraktes und der Lunge. Sie exprimieren in mehr als 50% des Fälle neuroendokrine Marker. Diese Tumore machen etwa 2 – 5% der Mammakarzinome aus und treten vornehmlich im sechsten und siebten Lebensjahrzehnt in Erscheinung (Sapino et al., 2001). Neuroendokrine Differenzierung tritt auch bei den insgesamt sehr seltenen Brusttumoren des Mannes auf (Scopsi et al., 1991).

Die zweite große Gruppe neben den duktalen Karzinomen bilden die **invasiven lobulären Mammakarzinome** (ILK). Sie haben einen Anteil von 5 bis 15% (du Toit et al., 1989; Ellis et al., 1992; Martinez and Azzopardi, 1979; Sastre-Garau et al., 1996; Toikkanen et al., 1997). In den letzten 20 Jahren wurde ein Anstieg der Inzidenz bei Frauen über 50 festgestellt (Li et al., 2000a). Dies wurde mit einem vermehrten Gebrauch von Hormonpräparaten in Verbindung gebracht (Bonnier et al., 1995; Li et al., 2000b; O'Connor et al., 1998). Das mittlere Alter beim ILK liegt 1 – 3 Jahre über dem medianen Alter bei invasiven duktalen Mammakarzinomen (Sastre-Garau et al., 1996). Histologisch zeichnen sich die ILK durch Kleinzelligkeit mit geringem Zusammenhalt der Epithelkomplexe und folglich dissoziiertem Wachstum aus. Grund dafür sind Veränderungen oder fehlende

Expression des E – Cadherin Gens, dessen Genprodukt an Zell-Zell-Verbindungen beteiligt ist. Klinische Besonderheiten sind die häufige bilaterale Tumorentwicklung (8-19% der Fälle) (DiCostanzo et al., 1990; du Toit et al., 1989; Fechner, 1972). Einige Studien fanden damit eine höhere Bilateralität als bei invasiven duktalen Karzinomen (Horn and Thompson, 1988; Silverstein et al., 1994), andere Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede feststellen (de la Rochefordiere et al., 1994; Healey et al., 1993; Parker et al., 1989). Manche Untersuchungen fanden häufig auch eine multizentrische Tumorentwicklung in der gleichen Mamma (DiCostanzo et al., 1990; Lesser et al., 1982), was aber in anderen klinischen (Sastre-Garau et al., 1996) oder radiologischen (Le Gal et al., 1992) Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte.

Ausgesprochen wichtig für die Diagnosestellung und weitere Therapieplanung sind das „Grading“ und das „Staging“. Ersteres basiert auf der Bewertung von tubulärer Morphologie, Kernpolymorphismen und Mitoserate. Jeder Faktor wird einzeln mit Hilfe eines Scoring-Systems mit 1 bis 3 Punkten bewertet. Die drei Einzelscores werden nachfolgend zu einem Gesamtscore von 3 bis 9 Punkten addiert. Man unterscheidet so Tumore mit dem Differenzierungsgrad 1, 2 oder 3: G1 = hoch differenziert (3-5 Scorepunkte), G2 = mittelgradig differenziert (6-7 Scorepunkte), G3 = wenig differenziert (8-9 Scorepunkte). Viele Studien haben eine starke Assoziation zwischen dem histologischen Differenzierungsgrad und dem Überleben bei Mammakarzinomen festgestellt. Deshalb ist das „Grading“ ein sehr wichtiger Prognosefaktor (Elston CW, 1998; Henson et al., 1991). Beim „Staging“ wird der Tumor nach festgelegten Kriterien der WHO und UICC nach Tumorausdehnung und Nachweis von Metastasen in bestimmte Stadien eingeteilt:

Pathologische TNM-Klassifikation der Mammakarzinome (Singletary et al., 2002)

(Abkürzungen: LNN = Lymphknoten; AMI = Arteria mammaria interna)

pT-Primärtumor

pTX - Primärtumor kann nicht beurteilt werden

pT0 - kein Anhalt für Primärtumor

Tis - Carcinoma in situ

pT1 - Tumor ≤ 2 cm

pT1mic - Mikroinvasion ≤ 0,1 cm

pT 1a - Tumor > 0,1 cm ≤ 0,5 cm

pT 1b - Tumor > 0,5 cm ≤ 1,0 cm

pT 1c - Tumor > 1,0 cm ≤ 2,0 cm

pT2 - Tumor > 2,0 cm ≤ 5,0 cm

pT3 - Tumor > 5,0 cm

pT4 - Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut

pT4a - Tumor mit Ausdehnung auf die Brustwand

pT4b – Tumor mit Haut - Ödem (inkl. Apfelsinenhaut), - Ulzeration oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust

pT4c - Kriterien 4a und 4b gemeinsam

pT4d - inflammatorisches Karzinom

pN – Regionäre Lymphknoten

pNX - regionäre LNN können nicht beurteilt werden

pN0 - keine regionalen LNN - Metastasen

pN1mi - Mikrometastasen > 0,2 mm ≤ 2 mm

pN 1a - Metastasen in 1–3 ipsilateralen axillären LNN, ≥ 1 Metastase > 0,2 cm

pN 1b - Metastasen in ipsilateralen LNN entlang der AMI mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinel-LNN-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren;

pN 1c - Metastasen in 1–3 ipsilateralen axillären LNN **und** in ipsilateralen LNN entlang der AMI mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinel-LNN-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren;

pN 2a - Metastasen in 4–9 ipsilateralen axillären LNN, ≥ 1 Metastase > 2 mm

pN 2b - Metastasen in klinisch auffälligen ipsilateralen LNN entlang der AMI bei Fehlen axillärer LNN-Metastasen;

pN 3a - Metastasen in ≥ 10 ipsilateralen axillären LNN (zumindest eine > 2 mm) **oder** in ipsilateralen infraklavikulären LNN

pN 3b - Metastasen in klinisch auffälligen LNN entlang der AMI mit ≥ 1 axillären LNN-Metastase **oder** Metastasen in ≥ 3 axillären LNN und in LNN entlang der AMI mit mikroskopischen Metastasen, die durch Sentinel-LNN-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren;

pN 3c - Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären LNN

pM-Fernmetastasen

pMX - Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

M0 - keine Fernmetastasen

pM1 – Fernmetastasen

Zusätzlich zu dieser Einteilung wird in der Primärdiagnostik der Hormonrezeptorstatus (Progesteron – und Östrogenrezeptor) und der HER- 2-Status der Tumorzellen immunhistochemisch oder mit FISH-Technik festgestellt. Auf der Grundlage dieser Daten und unter Einbeziehung der Wünsche und individuellen Risikofaktoren der Patientinnen wird dann eine Therapieplanung erstellt.

Die Basis bildet hierbei eine chirurgische Therapie. Dabei wird der Tumor mit einem tumorfreien Rand exstirpiert (R0-Resektion) (Blichert-Toft et al., 1998). Der mikroskopisch gemessene Sicherheitsabstand zwischen Tumor und Resektionsrand sollte beim invasiven Karzinom mindestens 1mm betragen (O'Higgins et al., 1998). Wenn immer möglich sollte brusterhaltend operiert werden, da diese Methode mit anschließender Bestrahlung der alleinigen, sogenannten modifizierten Mastektomie (radikale, ganzheitliche Entfernung der Brust) in punkto Überleben gleichwertig ist (EBCTCG, 1995; Fisher et al., 2002; Veronesi et al., 2002; Wald et al., 1995; Weaver et al., 2000). Je nach Tumorausbreitung müssen auch angrenzende Lymphknoten entfernt werden. Hier hat die Einführung der sogenannten Sentinel-Node-Biopsie entscheidende therapeutische Verbesserungen gebracht. Bei dieser Methode wird der erste Lymphknoten des Abflussgebietes mit Hilfe eines Radionuklids aufgesucht, entnommen und histologisch untersucht. Ist er frei von Tumorzellen, kann auf eine radikale Lymphknotenentfernung der Axilla verzichtet werden. Durch dieses Verfahren konnte eine deutliche Verminderung der Kurz – und Langzeitmorbidität erreicht werden. Die zusätzliche Bestrahlung der betroffenen Brust führt zu einer Verbesserung der lokalen Tumorkontolle (Clarke et al., 2005; Shafiq et al., 2007; Van de Steene et al., 2004) und zu einer relevanten Senkung der Mortalität (Clarke et al., 2005; Peto, 2006; Shafiq et al., 2007; Vinh-Hung and Verschraegen, 2004; Whelan T, 2007). Beide Effekte sind unabhängig vom Alter der Patientinnen (de Bock et al., 2006; Fyles et al., 2004; Hughes et al., 2004; Zhou and Recht, 2004). Auch nach Mastektomie wird bei einem hohen Lokalrezidivrisiko zusätzlich bestrahlt und damit eine deutliche Senkung der lokalen Rezidivwahrscheinlichkeit erreicht (Clarke et al., 2005; Clarke, 2000; EBCTCG, 1995; Truong et al., 2004; Van de Steene et al., 2000; Van de Steene et al., 2004; Whelan T, 2007). Ein Nutzen der Nachbestrahlung des regionalen Lymphabflusses ist heute noch nicht belegt und muss deshalb individuell entschieden werden (Recht et al., 2001; Truong et al., 2004). Bei Patientinnen mit primär inoperablen Tumoren wird derzeit eine primäre

systemische Chemotherapie mit anschließender Operation und Nachbestrahlung empfohlen (Kaufmann et al., 2003; Shenkier et al., 2004; Truong et al., 2004). Für die medikamentöse Behandlung der Primärerkrankungen stehen als Therapieformen die Chemotherapie, die endokrine Therapie und die Antikörpertherapie einzeln oder in Kombination zur Verfügung (EBCTCG, 2006; M Clarke, 2005). Durch diese systemischen Therapien lassen sich die Rezidivrate und die Mortalität senken. Dies gilt für die Polychemotherapie (insbesondere bei Gabe von Anthrazyklinen und Taxanen), für die medikamentöse Ausschaltung der Ovarialfunktion, sowie für Tamoxifen, Aromatasehemmer und Trastuzumab. Das absolute Ausmaß dieser Effekte hängt vom Risiko der Erkrankung ab (Bethesda, 2001; Clarke, 1998; EBCTCG, 2006; M Clarke, 2005). Die adjuvante endokrine Therapie (Tamoxifen) oder Chemotherapie (Anthrazykline) können die kumulativen 15-Jahres-Mortalitätsraten um jeweils 30% senken, in Kombination offenbar noch mehr. Die hohe Effektivität einer adjuvanten Antikörpertherapie mit Trastuzumab bei Patientinnen mit HER-2-überexprimierenden Tumoren ist gut belegt (Joensuu et al., 2006; Piccart-Gebhart et al., 2005; Romond et al., 2005; Slamon et al., 2006).

Prognosefaktoren erlauben Ausssagen über Überlebensraten, Rezidiv- und Metastasenneigung, sowie über Therapierbarkeit. Der Befall der Lymphknoten der Achselhöhle ist der wichtigste prognostische Faktor bei Brustkrebspatientinnen. Viele Studien haben gezeigt, dass mit zunehmendem Lymphknotenbefall die Zahl der krebsfreien Jahre abnimmt und die Überlebensraten zurückgehen (Fitzgibbons et al., 2000).

Die Tumorgröße erlaubt wichtige prognostische Ausagen über einen möglichen Lymphknotenbefall und das Überleben, sogar bei kleinen Tumoren (T1a und T1b) (Chen and Schnitt, 1998).

Die einzelnen histologischen Tumortypen unterscheiden sich in den 10-Jahre-Überlebensraten zum Teil erheblich. Für Brustkrebs im Allgemeinen beträgt die Rate etwa 55%. Beim duktalen Karzinom ist die Rate mit 35 – 50% vergleichbar oder leicht schlechter (Ellis et al., 1992). Die Prognose der Sonderformen ist jedoch weitaus besser. Das tubuläre Karzinom hat eine hervorragende Langzeitprognose (Carstens et al., 1985; Carstens et al., 1972; Cooper et al., 1978; Ellis et al., 1992; McDivitt et al., 1982; Oberman and Fidler, 1979; Peters et al., 1981). Beim kribriformen Karzinom ergab sich eine 10 – Jahre - Überlebensrate von 90% (Ellis et al., 1992) bis 100% (Page et al., 1983). Beim medullären Karzinom werden bis über 90% (Jensen et al., 1997; Rapin et al., 1988; Wargotz and Silverberg, 1988), beim muzinösen Karzinom 80% (Komaki et al., 1988) bis

100% (Fentiman et al., 1997; Norris and Taylor, 1965) angegeben. Beim lobulären Karzinom wurden im Vergleich zum duktalen Karzinom sowohl bessere (Dixon et al., 1982; du Toit et al., 1989; Ellis et al., 1992; Silverstein et al., 1994; Toikkanen et al., 1997) als auch schlechtere (Ashikari et al., 1973) Überlebensraten festgestellt. Andere Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede feststellen (Peiro et al., 2000; Sastre-Garau et al., 1996).

Der Malignitätsgrad (Grading) der Tumoren ist ebenfalls von wichtiger prognostischer Bedeutung. Unabhängig von Lymphknotenbefall und Tumorgröße werden bei Tumoren mit höherem Malignitätsgrad häufiger Fernmetastasen und schlechtere Überlebensraten beobachtet (Contesso et al., 1987; Elston and Ellis, 1991; Fisher et al., 1993; Fitzgibbons et al., 2000; Goldhirsch et al., 1998; Mansour et al., 1994; Nixon et al., 1996; Rosen et al., 1989). Die Kombination aus histologischem Typ und Grading lässt bessere prognostische Aussagen zu als der histologische Typ nur für sich (Pereira et al., 1995).

Auch die Infiltration von Lymphgefäßen ist ein wichtiger und unabhängiger Prognosefaktor. Dies gilt insbesondere für Patienten mit T1/N0 – Tumoren (Chen and Schnitt, 1998; Lee et al., 1997; Leitner et al., 1995; Rosen et al., 1993; Rosen et al., 1981; Roses et al., 1982). Man ist so in der Lage, Patientinnen zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für einen Befall der axillären Lymphknoten haben. Haut- und Muskelinfiltrationen, sowie Gefäßeinbrüche sind mit einer erhöhten Metastasierungsneigung korreliert (Riede, 2004).

Oft entscheidend für den Therapieerfolg, und damit auch wichtiger Prognosefaktor, ist der sogenannte Rezeptorstatus. Die Zellen der meisten Mammakarzinome sind in variabler Dichte mit Östrogen (ER) – und/oder Progesteronrezeptoren (PR) bestückt. Dies macht ihre hormonelle Regulierbarkeit und ihr Ansprechen auf Antihormone (Tamoxifen, Aromatasehemmer) wahrscheinlich (Bundred, 2001; EBCTCG, 1992; Isaacs et al., 2001; McGuire and Clark, 1992; Osborne, 1998). ER/PR – positive Tumoren sprechen in 60 – 70% der Fälle auf Tamoxifen an, während dies weniger als 10% der ER/PR – negativen Tumore tun (ASCO, 1998; Fitzgibbons et al., 2000; Goldhirsch et al., 2001). Das Onkogen c-erb-B2 (Her2/neu) kodiert für ein Zellmembranprotein, welches in die Proliferation und Differenzierung der Krebszellen involviert ist (näheres im Genetikkapitel). Tumore mit immunhistochemisch nachweisbarer Überexpression dieses Onkogens lassen sich durch spezifische monoklonale IgG-Antikörper (Herceptin) beeinflussen (Cobleigh et al., 1999).

2.2 Genetik des Mammakarzinoms

Krebs wird heute als eine genetische Erkrankung aufgefasst, da Tumore durch genetische Veränderungen, zum Beispiel Mutationen, entstehen. Verursacht werden diese durch Einwirken von physikalischen (zum Beispiel Ultraviolette-Strahlung) – oder chemischen (zum Beispiel Zigarettenrauch) Noxen, oder auch durch Virusinfektionen. Wenn diese Veränderungen Gene betreffen, deren Produkte die Neubildung, Differenzierung und den programmierten Zelltod (Apoptose) von Zellen steuern oder die Integrität des Genoms kontrollieren, kann eine Zelle maligne entarten. Allerdings muss dafür eine Zelle dafür vermutlich bis zu sieben Mutationen aufweisen (Greenblatt et al., 1994; Vogelstein and Kinzler, 1993), da eine einzelne Veränderung nicht ausreichen würde, um die komplexe Zellmaschinerie zum Entgleisen zu bringen. Auch ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Lebenszeit einer einzelnen Zelle ausreicht, um alle nötigen Veränderungen zu erlangen. Deshalb werden Mutationen über mehrere Zellgenerationen angehäuft, wobei jede einzelne Veränderung die Wahrscheinlichkeit für eine weitere erhöht. Tumore leiten sich meist von einer einzigen Körperzelle ab, sind also zunächst monoklonal. Da aber bald Nebenzelllinien mit verschiedenen genetischen Veränderungen entstehen, bestehen klinisch fassbare Tumore meist aus einer heterogenen Zellpopulation (Riede, 2004).

Gene, die in die Krebsentwicklung involviert sind, lassen sich allgemein in Onkogene, Tumorsuppressorgene und Suszeptibilitätsgene einteilen.

Onkogene entstehen, wenn die physiologisch vorkommenden Protoonkogene durch Mutation, Vervielfältigung oder veränderte Expression modifiziert wurden. Protoonkogene werden nur in bestimmten Situationen exprimiert (zum Beispiel embryologisches oder regeneratives Wachstum) und sind streng reguliert. Ihre Genprodukte können Wachstumsfakoren, Wachstumsfaktorrezeptoren oder auch intrazelluäre Bestandteile von Signalketten sein, welche ein Wachstumssignal von der Zelloberfläche zum Zellkern leiten. Vollziehen sich solche Prozesse in unkontrollierter Weise, können Zellen maligne entarten. Onkogene sind dominant, da die Mutation eines Allels bereits ausreicht, um einen Defekt hervorzurufen.

Tumorsuppressorgene begrenzen unter physiologischen Bedingungen die Zellvermehrung. Sie verhalten sich rezessiv, d.h. ein funktionstüchtiges Allel reicht aus, um eine Wachstumskontrolle zu gewährleisten. A. G. Knutson formuliert zu diesem Sachverhalt die „Two-Hit"-Theorie (Knudson, 1971). Sie besagt, dass zur Krebsentstehung zwei Mutationsereignisse nötig sind. Die erste Mutation betrifft das erste Allel. Findet dies bereits in Keimzellen statt, besitzen alle Körperzellen diesen Defekt. Man spricht dann von

Keimbahnmutation. Sie bildet die Grundlage für die familiären Tumorsyndrome. Findet die erste Mutation in einer Körperzelle statt, spricht man von einer somatischen Mutation. Die zweite Mutation betrifft dann das zweite noch intakte Allel in einer Körperzelle.

Suszeptibilitätsgene sind sowohl Gene, die für die genomische Integrität verantwortlich sind, als auch Tumorsuppressorgene, welche Tumorwachstum unterdrücken und Tumorzellen in die Apoptose zwingen. Außerdem werden zu dieser Gruppe Gene gezählt, die die Ausbildung des ortstypischen Stromas steuern und erst in zweiter Linie das Wachstum der Epithelzellen beeinflussen (Riede, 2004).

Verschiedene Arten von chromosomalen Veränderungen können nun diese drei Genkategorien betreffen und so zur Tumorentstehung beitragen. Die wichtigsten sollen hier aufgezählt und erläutert werden:

Die wichtigste genetische Alteration, die zu einer verstärkten Expression eines Onkogens führen kann, ist die Genamplifikation. Sie führt zur Entstehung einer Vielzahl von Genkopien. Verbleiben diese als mehrfache Sequenzkopien innerhalb des Chromosoms, werden sie als „homogenously staining regions“ (= HSR; deutsch: gleichartig anfärbbare Region) bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind die „double minutes“ sehr kleine Chromosomenstücke, die aus dem Chromosom herausgeschnitten wurden (Cowell, 1982; Storlazzi et al., 2010). Da sie kein Zentromer besitzen, werden sie bei der Zellteilung zufällig auf die Tochterzellen verteilt (Barker et al., 1980; Kanda et al., 2001; Levan et al., 1976).

Chromosomale Umlagerungen kommen in mehreren Varianten vor. Bei einer Translokation können zwei Gene so fusionieren, dass ein neues Fusionsgen entsteht, dessen Produkt ein Onkogen ist. Ein Beispiel hierfür ist die Philadelphia-Chromosom-Translokation bei der chronischen myeloischen Leukämie. Bei der Inversion treten zwei Brüche an verschiedenen Stellen des Chromosoms auf, wobei es zu einer Umlagerung um 180° kommt. Beim Nebenschilddrüsenadenom gelangt so das Protoonkogen Zyklin-D1 (Zellzyklusregulator), welches im Bruchbereich liegt, in den Promotorbereich des Parathormon - exprimierenden Gens und wird folglich überexprimiert (Riede, 2004). Auch kann infolge eines DNA-Bruches genetisches Material verloren gehen. Dies wird als Deletion bezeichnet und kann, sofern dies ein Tumorsuppressorgen betrifft, ebenfalls zur Tumorprogression beitragen.

Die schrittweise Entstehung von Tumoren konnte erstmals am Beispiel des Dickdarmkrebses nachvollzogen werden (Fearon and Vogelstein, 1990). Hier entstehen aus den Epithelzellen der Darmwand zuerst gutartige Adenome, aus denen dann die bösartigen

Karzinome entstehen. Außerdem konnten bestimmte Veränderungen auf DNA-Ebene mit morphologischen Entwicklungsstadien assoziiert werden (Bardi et al., 1995; Kelemen et al., 1994; Ried et al., 1996).

In der Mamma betreffen die frühesten fassbaren Veränderungen die Regulation der Zellzahl in Form einer Hyperplasie. Der nächste Schritt ist die atypische Hyperplasie, bei der bereits mehrere kleine Zellklone genetisch instabil werden. Die Progression zu den nichtinvasiven (LCIS und DCIS) – und schließlich invasiven Karzinomen beruht dann auf einer kaskadenartigen Abfolge von genetischen Störungen (Riede, 2004). Das lange angenommene Modell, dass linear alle diese Stadien auf dem Weg zum invasiven Mammakarzinom durchschritten werden müssen, hat sich aber als zu vereinfachend herausgestellt, da heute verschiedene Entstehungspfade bekannt sind. So scheinen mittelgradig differenzierte invasive duktale Karzinome eine Gruppe zu sein, die über mehrere verschiedene Wege entstehen kann und die zum Teil auch ein Endstadium in der Krebsentwicklung darstellt (Buerger et al., 2001; Buerger et al., 1999b). Nach dem linearen Modell sollten sich aber alle G3 differenzierten Karzinome aus G2 – differenzierten Karzinomen entwickeln. Klinische Verlaufsstudien zeigten im Vergleich zur Referenzpopulation eine höchstens 1,5-fache Erhöhung des Entartungsrisikos für die duktale Hyperplasie, aber eine 4- bis 5-fache Erhöhung bei der atypischen duktalen Hyperplasie und eine 8-bis 10-fache Erhöhung beim DCIS (Fitzgibbons et al., 2000). Die seltenen, gutartigen Adenome der Mamma sind nicht mit einem erhöhten Risiko für maligne Entartung assoziiert. Lediglich Adenome mit apokriner Differenzierung scheinen monoklonal zu sein und könnten deshalb eine Vorläuferläsion darstellen (Wells et al., 1995). Durch Mikrosatellitenanalyse können Allelimbalancen in Zellen detektiert werden. Fehlt ein Allel, so spricht man vom Verlust der Heterozygotie (LOH). LOH kann ein starker Hinweis auf neoplastische Veränderung in Zellen sein. Jedoch wurde LOH auch im umgebenden Bindegewebe von nichtinvasiven (Moinfar et al., 2000) und invasiven (Kurose et al., 2001; Moinfar et al., 2000) Mammakarzinomen, sowie in morphologisch normal erscheinenden Milchgängen (Larson et al., 1998) gefunden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass in der Entwicklung von Brustkrebs morphologisch erkennbaren Veränderungen frühe genetische Alterationen voranschreiten. Auch scheinen Interaktionen zwischen Stroma – und Epithelzellen eine Rolle in der Brustkrebsentwicklung zu spielen.

Die Mammakarzinome stellen eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen dar. Zum Beispiel wird mit zytogenetischen Methoden oder hochauflösenden Mikroarrays versucht,

Untergruppen zu definieren, um herauszufinden, wie verschiedene Entwicklungsstadien zusammenhängen. So konnten neuerdings anhand von Expressionsprofilen Mammakarzinome in „luminal“, „ERBB2 positive“, „normal breast“ und „basal-like“ klassifiziert werden (Perou et al., 2000). Während über die Zusammenhänge zwischen normalen Epithelzellen, gutartigen Adenomen, Hyperplasien und malignen Krebsstadien oft noch große Unklarheit herrscht (Boecker et al., 2001), konnten verschiedene Entwicklungswege von bereits klonal veränderten Zellen über nicht-invasive Karzinome zu invasiven Karzinomen näher beleuchtet werden. Zum Beispiel führen Verluste auf dem langen Arm von Chromosom 16 (16q) und Zugewinne von 1q dazu, dass sich ein Zellklon zu einem LCIS (zusätzlicher Verlust des E-Catherin-Gens) oder zu einem gut differenzierten DCIS entwickelt. Zugewinne auf 17q12 führen hingegen zu einem schlecht differenzierten DCIS (Boecker et al., 2001; Buerger et al., 1999a; Buerger et al., 2000). Unbalancierte Translokationen zwischen 1q und 16p, Isochromosombildung 1q und Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p) sind häufige Aberrationen, die, jede für sich, zu Brustkrebs führen können. Auch Zugewinne auf 8q wurden häufig beschrieben (Buerger et al., 1999b; Teixeira et al., 2002; Tirkkonen et al., 1998). Neben diesen sogenannten monoklonalen Entstehungspfaden gibt es auch polyklonale Tumorprogression, bei der der maligne Phänotyp durch das Zusammenwirken mehrerer Zellklone zustande kommt, die jeder für sich nicht bösartig sind. Kommunikation über Zell-zu-Zell-Kontakte und parakrine Sekretion von Signalmolekülen könnten eine Erklärung für dieses Phänomen sein (Teixeira et al., 2002). Im Folgenden soll auf die wichtigsten Gene bei der Entstehung von Brustkrebs näher eingegangen werden:

Das ERBB2 (HER2/neu) Onkogen gehört seit über 20 Jahren zu den am meisten beforschten Brustkrebsgenen. Es kodiert für einen 185 kDa schweren Wachstumsfaktorrezeptor (Kallioniemi et al., 1992). HER2 ist Teil der ERBB – Rezeptorfamilie mit Tyrosinkinaseaktivität, zu der auch EGFR/HER1, ERBB3/HER3 und ERBB4/HER4 gehören. Nach Bindung ihrer Liganden dimerisieren diese Rezeptoren miteinander und aktivieren sich selbst durch Autophosphorylierung. Dadurch werden intrazellulär weitere Proteine aktiviert. Dabei können diese Rezeptoren untereinander Heterodimere, oder mit demselben Rezeptortypen Homodimere bilden. An jedes Homo-/Heterodimer binden wiederum nur spezifische Liganden. Auch können durch jede einzelne Kombination von Rezeptordimer und spezifischem Liganden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden. Dadurch kommt eine erstaunliche Vielfalt von Signalmöglichkeiten zustande

(Olayioye et al., 2000). HER2 ist jedoch der einzige ERBB-Rezeptor, für den bis heute noch kein Ligand gefunden wurde. Allerdings stellt er den bevorzugten Dimerisierungspartner für die anderen ERBB-Rezeptoren dar (Graus-Porta et al., 1997; Tzahar et al., 1996) und spielt eine große Rolle bei der Signalverstärkung (Beerli et al., 1995; Graus-Porta et al., 1995). Eine der wichtigsten Signalkaskaden, die über ERBB-Rezeptoren aktiviert werden, ist der PI3K/Akt – Signalweg. Er ist in den meisten Tumoren von Bedeutung, in Brustkrebs durch Mutationen im Akt-Protein (Bleeker et al., 2008; Stemke-Hale et al., 2008) und in der p110α-Untereinheit des PI3K-Proteins (Bachman et al., 2004; Saal et al., 2005; Stemke-Hale et al., 2008). Außerdem ist bei Mammakarzinomen ein Verlust des PTEN-Proteins häufig, welches ein funktioneller Antagonist von PI3K ist (Saal et al., 2005). HER2 ist in 15 – 25% der Mammakarzinome amplifiziert (Ali et al., 1988; Slamon et al., 1987; van de Vijver et al., 1987) und/oder überexprimiert (Corbett et al., 1990; Gullick et al., 1991; Kallioniemi et al., 1991; Paik et al., 1990; Tandon et al., 1989; van de Vijver et al., 1988; Venter et al., 1987). Die HER2 Amplifikation oder Überexpression ist ein Indikator für eine schlechte Prognose (Borg et al., 1991; Gullick et al., 1991; Kallioniemi et al., 1991; Paik et al., 1990; Paterson et al., 1991; Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989; Tandon et al., 1989; Tsuda et al., 1989). Außerdem ist sie mit einer erhöhten Proliferationsrate (Borg et al., 1991; Kallioniemi et al., 1991), einem niedrigem Östrogenrezeptorstatus (Borg et al., 1991; Gullick et al., 1991; Kallioniemi et al., 1991; Slamon et al., 1987; Tandon et al., 1989) und einem hohen Entdifferenzierungsgrad (Gullick et al., 1991; Kallioniemi et al., 1991; Paik et al., 1990; Paterson et al., 1991) bei duktalen Karzinomen assoziiert, was ihre herausragende Bedeutung bei der Brustkrebsentwicklung unterstreicht.

Die Wirkung von Östrogenen und Antiöstrogenen auf die Brustepithelien wird über Östrogenrezeptorproteine (ER) vermittelt (Ip et al., 1979; Katzenellenbogen et al., 1987). Es sind zwei verschiedene ER bekannt (ERα und ERβ), die von zwei verschiedenen Genen kodiert werden (Pettersson and Gustafsson, 2001). Der ER befindet sich intrazellulär und dimerisiert nach Bindung des Substrates, woraufhin er im Zellkern als Transkriptionsfaktor die Expression von zahlreichen Proteinen steuern kann (Rachez and Freedman, 2001), beispielsweise des Progesteronrezeptors (PR) (Narayanan et al., 2005). Weitere wichtige ER-Zielgene sind cMYC (Dubik and Shiu, 1992; Prall et al., 1998a; Prall et al., 1998b), welches in etwa 11% aller Mammakarzinome amplifiziert ist (Berns et al., 1992; Cuny et al., 2000), sowie der Zellzyklusregulator CCND1 (Dubik and Shiu, 1992; Prall et al.,

1998a; Prall et al., 1998b) welcher in 14% der Fälle amplifiziert ist (Cuny et al., 2000). So lassen sich Mammakarzinome grundlegend in ER-positive und ER-negative klassifizieren. Letztere haben durch eine starke Expression von proliferationsfördernden Genen eine deutlich schlechtere Prognose (Desmedt et al., 2008; Iwamoto et al., 2011; Reis-Filho et al., 2010; Reyal et al., 2008; Wirapati et al., 2008). Der ER ist eines der wichtigsten therapeutischen Zielproteine beim Mammakarzinom (Sunderland and Osborne, 1991). Mehr als 70% aller Brustkrebse exprimieren den ER zum Zeitpunkt der Diagnose (Stierer et al., 1993). Die routinemäßige Bestimmung des ER-Status durch Immunhistochemie ist daher das Fundament für eine Entscheidung zur Behandlung mit Antiöstrogenen wie Tamoxifen (Andersen and Poulsen, 1989). Die Überexpression des ER kann auch durch eine Amplifikation des entsprechenden Genlokus zustande kommen. So wurde die Amplifikation des ESR1-Gens (kodiert für ERα) in 20% aller Mammakarzinome gefunden (Holst et al., 2007; Tomita et al., 2009). Diese hohe Prävalenz wird gegenwärtig noch kontrovers diskutiert (Albertson, 2008; Brown et al., 2008; Reis-Filho et al., 2008; Vincent-Salomon et al., 2008).

Der Progesteronrezeptor (PR) kommt in der Brustdrüse in zwei verschiedenen Isoformen vor (PRA und PRB), die beide von demselben Gen kodiert werden (Graham et al., 1995). Er ist ebenfalls ein intrazellulärer Rezeptor, der nach Bindung des Liganden als Transkriptionsfaktor fungiert, aber auch unter anderem mit Signalmolekülen des MAP-Kinase-Signalweges interagieren kann (Dressing et al., 2009). 40% der Mammakarzinome sind sowohl ER als auch PR-positiv, weniger als 5% sind ausschließlich PR-positiv (Osborne, 1998). Anhand des PR-Status können, unabhängig vom ER-Status, gute Voraussagen zum Ansprechen auf hormonelle Therapien bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen gemacht werden (Harris J, 1991; Ravdin et al., 1992).

Etwa 5-10% aller Mammakarzinom sind hereditär (Honrado et al., 2005; Rahman and Scott, 2007). Anfang der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die Gene BRCA1 und BRCA2 entdeckt (Hall et al., 1990; Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995; Wooster et al., 1994). Keimbahnmutationen in diesen Genen sind für etwa 16% der hereditären Mammakarzinome verantwortlich (Peto et al., 1999; Ponder, 2000). Sie erhöhen das Erkrankungsrisiko um das 10- bis 20-fache, was einer Wahrscheinlichkeit von 70-80% gleichkommt, bis zum siebzigsten Lebensjahr erkrankt zu sein (Narod and Foulkes, 2004). Bei beiden handelt es sich um Tumorsuppressorgene, deren Genprodukte unter anderem in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert sind (Gudmundsdottir

and Ashworth, 2006; Turner et al., 2004). Mutationen, die funktionsunfähige Proteine hervorbringen, bahnen somit den Weg für weitere unkontrollierte Veränderungen des Erbgutes.

2.3 TPD52

TPD52 gehört der *Tumor Protein D52 Familie* an. Beim Menschen umfasst diese bisher vier Mitglieder: D52 (Byrne et al., 1995), D53 (Byrne et al., 1996; Byrne et al., 1998a), D54 (Byrne et al., 1998b; Nourse et al., 1998) und D55 (Cao et al., 2006). Diese Sequenzen kodieren für kleine hydrophile Polypeptide mit einer Länge von 180 bis 200 Aminosäuren (AS) (Byrne et al., 1996; Nourse et al., 1998). Allen gemeinsam ist ein Coiled-Coil-Motiv von etwa 50 AS, sowie eine PEST-Sequenz am N - und C-Terminus, welche mit einer Regulation der Proteinstabilität assoziiert wurde (Byrne et al., 1996; Rogers et al., 1986). Der zentrale Bereich der Polypeptide ist bei allen Mitgliedern der D52-Familie und in allen Spezies hoch konserviert und umfasst auch das Coiled-Coil-Motiv. Dieses wird für homodimere und heterodimere Interaktionen mit anderen D52-Mitgliedern sowie anderen Bindungspartnern benötigt (Byrne et al., 1998b; Thomas et al., 2002). TPD52 kommt physiologisch in sekretorischen Epithelien vor. So findet man eine starke Expression unter anderem in exokrinen Zellen des Pankreas, der Tränen – und Submandibulardrüsen, in den Hauptzellen des Magens, sowie Panethzellen (Groblewski et al., 1999). TPD52-Proteine liegen sowohl frei im Zystosol, als auch membrangebunden vor. Jedoch enthält die AS-Sequenz keine lipid - assoziierten Motive, so dass davon ausgegangen wird, dass TPD52 über weitere Adaptorproteine an Phospholipidmembranen akkumuliert (Thomas et al., 2001). So findet man das Protein in inaktiven sekretorischen Zellen vor allem auf der zytoplasmatischen Seite des trans-Golgi-Apparates (Thomas et al., 2004). In Drosophila-Zellen führte ein Abschalten des D52-Orthologs mit siRNA zu einer Hemmung der Sekretion (Bard et al., 2006), in Zellen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* führt ein Abschalten des Orthologs zu einer verminderten Fetteinlagerung in Darmepithelien (Ashrafi et al., 2003). Eine neue Studie konnte nachweisen, dass TPD52 Calcium-abhängig am Serin136 phosphoryliert wird und daraufhin an der Plasmamembran akkumuliert. Sowohl eine Überexpression als auch die Phosphorylierung von TPD52 waren mit einer vermehrten Anhäufung von LAMP1 an der Plasmamembran assoziiert (Thomas et al., 2010b). Dies zeigt eine Funktion von TPD52 bei Calcium-abhängigen ly-

sosomalen Transporten auf und bestätigt vorangegangene Ergebnisse, die auf eine Rolle bei intrazellulären Transportprozessen hinwiesen.

Ein gut untersuchter Bindungspartner von TPD52 ist MAL2. Dies ist ein integrales Membranprotein, welches an sogenannten „lipid rafts“ in Epithelzellen lokalsiert ist. Es soll für die Transzytose von Proteinen zuständig sein, welche mit einem GPI-Anker ausgestattet sind (de Marco et al., 2002). Des Weiteren interagiert TPD52 Calcium-abhängig mit Annexin VI in Azinuszellen des Pankreas. Annexin VI kann ebenfalls an Phospholipidmembranen binden und spielt zusammen mit TPD52 eine Rolle bei der Bildung und dem Transport von Endosomen (Thomas et al., 2002). TPD53 interagiert mit Synaptobrevin 2 und Synaxin 1, die beide Teil des SNARE-Komplexes sind, welcher von Vesikeln benötigt wird, um mit der Plasmamembran zu verschmelzen (Proux-Gillardeaux et al., 2003). Eine Splicevariante von TPD53 bindet an 14-3-3 Proteine, welche selbst wiederum mit einer Vielzahl von Signalmolekülen im weitesten Sinne interagieren können (Boutros et al., 2003). Die Aktivität von ASK1 wird durch TPD53 verstärkt (Cho et al., 2004). ASK1 spielt eine zentrale Rolle bei der Cytokin –und Stressinduzierten Apoptose. Oft ist die funktionelle Bedeutung der Proteininteraktionen unklar, jedoch wird deutlich, dass TPD52-Proteine eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen innehaben.

TPD52 wurde 1995 zum ersten Mal beschrieben. Das Gen war aufgefallen, als eine cDNA-Bibliothek, die aus einem primären duktalen Mammakarzinom erstellt wurde, nach überexprimierten Sequenzen durchsucht wurde. In-situ-Hybridisierungen von Brustkrebs-Paraffinschnitten mit RNA-Proben konnten zeigen, dass das neu entdeckte Transkript ausschließlich in Krebszellen zu finden war, nicht jedoch in den Zellen des umgebenden Bindegewebes. Das TPD52 Gen konnte dann auf Chromosom 8q21 lokalisiert werden (Byrne et al., 1995). Dies war von besonderer Bedeutung, da ein 8q Zugewinn zu den häufigsten Veränderungen bei Brustkrebs zählt, und 8q21 auf der Brustkrebszelllinie SK-BR-3 als eigenständiges Amplikon gefunden worden war (Kallioniemi et al., 1994). In dieser Zell - Linie konnte später gezeigt werden, dass das 8q21 Amplikon aus drei eigenständig amplifizierten Bereichen besteht. Das mittlere Amplikon enthält TPD52. Der BAC-Klon RP11-795H2, der TPD52 markiert, war amplifiziert, während die flankierenden Klone RP11-697N7 und RP11-35L24 normale Kopiezahlen anzeigten. Dies weist darauf hin, dass TPD52 das Ziel - Gen des mittleren 8q21-Amplikons sein könnte (Rodriguez et al., 2007). Überexpression des TPD52-Gens sind heute in malignen Entartungen der Brust (Balleine et al., 2000; Pollack et al., 2002; Rodriguez et al., 2007), der

Prostata (Rubin et al., 2004; Wang et al., 2004), des Ovars (Byrne et al., 2005), der Lunge (Chen et al., 1996; Zhu et al., 2007), des Kolons (Malek et al., 2002) sowie in Pankreaskarzinomen (Loukopoulos et al., 2007), Seminomen (Alagaratnam et al., 2009; Skotheim et al., 2006), Multiplen Myelomen (Largo et al., 2006), Ewing-Sarkomen (Machado et al., 2011) und B-Zell-Malignomen (Tiacci et al., 2005) bekannt. In Karzinomen der Mamma, der Prostata und des Ovars wurde gezeigt, dass ein Teil der Überexpressionen auf Genamplifikationen des 8q21.13 Lokus zurückzuführen sind (Balleine et al., 2000; Byrne et al., 2005; Pollack et al., 2002; Rodriguez et al., 2007; Rubin et al., 2004; Wang et al., 2004).

In Zell - Linien – und Tierversuchen wurde TPD52 hinsichtlich seiner Funktionen bei Tumorentstehung und Progression untersucht. TPD52 wird Estradiol (Byrne et al., 1996) – und Androgen-abhängig (DePrimo et al., 2002; Nelson et al., 2002; Rubin et al., 2004; Wang et al., 2004) exprimiert. Beide Hormone beschleunigen wiederum die Zellteilung in Karzinomen der Mamma bzw. der Prostata. Ein weiterer Hinweis auf die östrogenabhängige Expression von TPD52 in Mammakarzinomen ist, dass TPD52 in Genexpressionsanalyen mit Microarrays, zusammen mit dem Östrogenrezeptor und anderen östrogenabhängigen Genen, ein charakteristisches Expressionsmuster bildet (Ross and Perou, 2001). Einen ähnlichen Befund lieferte eine weitere Studie, in der TPD52 stärker in ER+ Tumoren als in ER- Tumoren exprimiert wurde (Gruvberger et al., 2001). Die Transfektion von 3T3-Fibroblasten-Zellkulturen mit dem Mausortholog mD52 induzierten einen onkogenen Phänotyp mit einer deutlich gesteigerten Proliferationsrate, einem Verlust der Kontaktinhibition zwischen den Zellen und der neu erworbenen Fähigkeit, in Softagar zu wachsen. Die Implantation der transformierten Zellen in gesunde, immunkompetente Mäuse führte zur Bildung von Metastasen (Lewis et al., 2007). In der Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP führte eine Herabregulation der endogenen TPD52 Expression zu einer gesteigerten Apoptoserate, wohingegen die Überexpression eines EGFP-D52 Fusionsproteins zu verstärkter Zellproliferation und Zellmigration führte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass TPD52 die Zellmigration durch eine Bindung von αvβ3-Integrin an das Matrixmolekül Vitronectin über eine Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges verstärkt (Ummanni et al., 2008). Mamma – und Prostatakarzinome metastasieren u.a. in die Knochen, deren extrazelluläre Matrixproteine spezifisch an αvβ3-Integrin binden (Cooper et al., 2002; Hullinger et al., 1998). Deshalb könnte TPD52 über eine αvβ3-Integrin vermittelte Zellmigration eine Rolle bei der Bildung von Knochenmetastasen spielen (Ummanni

et al., 2008). PrLZ, ein weiteres Mitglied der TPD52 Familie, welches auf 8q21.1 kodiert ist und vor allem in Prostatakarzinomen exprimiert wird, verstärkt die Phosphorylierung der Akt und Stat3 Proteine und bewirkt so eine Hochregulierung der Bcl-2 Expression. Dadurch wird die Apoptose in Prostatakarzinomzellen verhindert (Zhang et al., 2011). Außerdem verstärkt PrLZ in Prostatakarzinomzellen die cMYC Genexpression und fördert Androgen-unabhängige Zellproliferation (Yu et al., 2010). Es konnte auch eine Verbindung zwischen der funktionellen Rolle bei Vesikelbildung und Membranfusion und der onkogenen Rolle hergestellt werden. TPD52 sammelte sich, vor allem bei hohen intrazellulären Kalziumspiegeln, an vesikulären Strukturen, die VAMP8 enthielten. VAMP8 ist für die Fusion von Endomembranen bei Abschluss der Zellteilung notwendig (Low et al., 2003). Dies weist stark darauf hin, dass TPD52 eine Schlüsselrolle in Membranfusionsprozessen spielt, die bei der Zellteilung von schnell proliferierenden Tumorzellen notwendig sind (Thomas et al., 2010a). Impfstudien an Mäusen zeigten eine mögliche Bedeutung von TPD52 als Therapieziel auf. Als wirksam erwiesen sich mD52-spezifische überlappende synthetische Peptide, das mD52 Protein in Kombination mit CpG-Oligodesoxynukleotiden, sowie mD52 cDNA zusammen mit GM-CSF. Es konnte eine starke zelluläre Immunität in tumorkranken Mäusen erzeugt werden, welche zu einem verringerten oder ganz ausbleibendem Tumorwachstum und zu einem verlängerten Überleben führte. Dabei kam es zu keiner autoimmunen Reaktion gegen normale Zellen, die physiologische Mengen an TPD52 exprimierten. Außerdem konnte die Bildung eines immunologischen Gedächnisses gezeigt werden (Lewis et al., 2009; Mirshahidi et al., 2009; Payton et al., 2008). TPD52 Überexpression wurde außerdem mit besserem Ansprechen auf Radiotherapie in Verbindung gebracht (Niu et al., 2010).

2.4 Ziel der Arbeit

Bisherige Arbeiten weisen darauf hin, das TPD52 eine Bedeutung für die Entstehung, Progression und die Therapie von Mammakarzinomen hat. Allerdings wurden Amplifikationen bisher nur am Zell - Linienmodell oder an Primärtumoren mit sehr geringen Fallzahlen untersucht. Daten zu klinischen Relevanz liegen bisher nur zur TPD52 Expression vor. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Prävalenz und prognostische Relevanz von TPD52-Amplifikationen in humanen Mammakarzinomen anhand eines großen und so-

wohl klinisch als auch molekular gut charakterisierten Mammakarzinom-Tissue-Micro-Arrays (TMA) zu klären.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Breast Prognosis TMA

Um die Amplifikationen epidemiologisch evaluieren zu können, wurde der „Breast Prognosis TMA“ ausgewertet. Die Zusammenstellung dieses TMAs ist bereits beschrieben worden (Ruiz et al., 2006) und wird in Tabelle 1 nochmals aufgeführt. Für 420 Patienten ist die Art der adjuvanten Therapie bekannt. Eine Gruppe von 261 Patientinnen wurde nur mit Tamoxifen behandelt und erhielt keine zusätzliche adjuvante zytotoxische Chemotherapie. Die Therapie wurde standardmäßig für 5 Jahre durchgeführt, wobei allerdings keine detaillierten Informationen erhältlich waren. Die Behandlung und Evaluation der Patientinnen erfolgte am Unispital Basel (Schweiz), dem Frauenkrankenhaus Rheinfelden und dem Kreiskrankenhaus Lörrach im Zeitraum von 1985 bis 2000. Die behandelnden Ärzte wurden kontaktiert und so die klinischen „follow-up“-Daten der Patientinnen gesammelt. Die Daten für das „staging“ wurden den Pathologieberichten entnommen. Dazu gehörten der maximale Tumordurchmesser, das pT-Stadium und der Lymphknotenstatus (Anzahl untersuchter und Anzahl positiver Lymphknoten, pN-Stadium).

Mit Hilfe des „Breast Prognosis TMA“ wurden 2198 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Mammakarzinome untersucht, die aus 4 verschiedenen Kollektiven stammen. Die Verwendung dieser Daten wurde durch die Ethikkommission des Universitätsspitals Basel genehmigt.

1) 648 Tumore stammen von Patientinnen, die aufgrund eines Mammakarzinoms am Chirurgischen Spital des Kantonspitals Basel, an der Frauenklinik des Kantonspitals Basel, an der Frauenklinik Rheinfelden oder im Kreiskrankenhaus Lörrach operiert wurden und deren Tumormaterial am Institut für Pathologie des Kantonspitals Basel untersucht wurde. Zu allen Patientinnen sind Daten zum weiteren Krankheitsverlauf, zu angewandten Therapien und zum Zeitpunkt des Auftretens von Rezidiven oder Metastasen vorhanden. So konnten sowohl tumorspezifische, wie auch Roh-Überlebensraten angegeben werden.

2) Weitere 324 Tumore wurden am Institut für Pathologie des Stadtspitals Triemli in Zürich aufgearbeitet. Auch hier gibt es Daten zu angewandten Therapien, Rezidiven, sowie zu Todeszeitpunkt und Todesursache. Auch bei diesen Patientinnen konnte man tumorspezifische und Roh-Überlebensraten bestimmen.

3) Zu 785 Mammakarzinomen, die am Institut für klinische Pathologie in Basel untersucht wurden, liegen lediglich Daten zu den Roh-Überlebensraten, nicht jedoch zu den tumorspezifischen Überlebensraten vor.

4) Zu 446 Mammakarzinomen, die am Institut für Pathologie des Kantonspitals Basel aufgearbeitet wurden, konnten ebenfalls lediglich Daten zu den Roh-Überlebensraten erhoben werden.

Das mittlere Überlebensalter der Patientinnen betrug 62 Jahre (26 bis 101 Jahre), bei einer mittleren Beobachtungszeit von 68 Monaten (1 bis 176 Monate). Die Roh-Überlebensraten wurden entweder durch die betreuenden Ärzte der betroffenen Patientinnen oder über das Krebsregister in Basel erhoben. Tumorstadium, Tumordurchmesser und Lymphknotenstatus der untersuchten Tumoren wurden jeweils den ersten pathologischen Berichten (1992) entnommen.

Die histologischen Schnitte eines jeden Tumors wurden durch einen von zwei Pathologen (Prof. J. Torhorst, Prof. G. Sauter) begutachtet, um den histologischen Tumortyp zu definieren und den histologischen Grad entsprechend der Einteilung von Bloom-Richard-Elston (BRE) festzustellen (Elston and Ellis, 2002).

Tabelle 1: Breast Prognosis TMA

Histologie		***Fallzahl***
	Duktales Karzinom	*1531*
	Lobuläres Karzinom	*311*
	Muzinöses Karzinom	*69*
	Kribriformes Karzinom	*64*
	Medulläres Karzinom	*57*
	Tubuläres Karzinom	*56*
	Papilläres Karzinom	*30*
	unbekannt	*22*
	Apokrines Karzinom	*15*
	Klarzelliges Karzinom	*14*
	Atypisch medulläres Karzinom	*9*
	Metaplastisches Karzinom	*7*
	Karzinosarkom	*2*
	Lipidreiches Karzinom	*2*
	Lipidreiches oder histiozytisches Karzinom	*2*
	Neuroendokrines Karzinom	*2*
	Kleinzelliges Karzinom	*2*
	Adenoid-zystisches Karzinom	*1*
	Histiozytisches Karzinom	*1*
	Siegelring Karzinom	*1*

Gesamt		*2198*
Stadium des Primärtumors		
	pT1	*815*
	pT2	*1018*
	pT3	*124*
	pT4	*242*
Lymphknotenstatus		
	pN0	*944*
	pN1	*789*
	pN2	*121*
Grading		
	G1	*543*
	G2	*841*
	G3	*651*

Die Fälle lassen sich beim „staging“ und „grading“ nicht auf 2198 summieren, da in einigen Fällen die Daten fehlen.

3.1.2 Reagenzien und Geräte

Anzucht von pBac-E.coli Klonen

- pBAC-E.coli-Klon RP11-795H2, RZPD: RPCIB753H02795Q, Vektor: pBACe3.6
- Kulturmedium: Luria-Broth-Base (25g/l dH_2O); autoklaviert (Invitrogen)
- Antibiotikum Chloramphenicol (34 mg/ml Ethanol abs.) (SIGMA-ALDRICH)
- Schüttelinkubator- Thermocycler K 15/300 (Incutec IH 50)
- Schüttelmaschine LS 10 (gerhardt)

DNA Extraktion

QIAprep Spin Miniprep KIT 250 von QIAgen; P1(20ml P1+200µl (10mg/ml)RNase A, bei 4°C), (P2, N3, PE und EB (Elution Buffer: 10mM Tris-Cl,pH 8,5) Puffer sowie „QIAprep spin“ Säulen sind in diesem Extraktions KIT enthalten.

- Zenrifugen - Biofuge fresco (Heraeus Instruments)
- JOTA-AVE (B.Braun Biotech International)
- Thermomixer compact (Eppendorf)
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (peqLab)
- Sondenmarkierung
- Nick Translation System (Invitrogen)
- Digoxigenin 11 dUTP (Roche)

- Polymerase I – 10 U/µl (Invitrogen)
- dNTP-Mix (Invitrogen)
- pBac-DNA-Lösung (selbst hergestellt)
- DNAse Enzym Mix - 0,5 U/µl Pol I, 0,4mU/µl DNase I (Invitrogen)
- Minishaker IKA, Vibrofix VF1 Electronic (Janke&Kunkel IKA Labortechnik)
- Thermocycler

<u>Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)</u>

1.Entparaffinierung,proteolytische Vorbehandlung und Hybridisierung

- Objektträger (Starfrost)
- 24x32mm Deckgläschen (Marienfeld-Superior)
- Destilliertes Wasser (H_20)
- Ethanol (70%, 80%, 95%) (MERCK)
- Xylol (MERCK)
- VP 2000 Pretreatment Reagent; NaSCN, pH 5,4 (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL,pH 2,0); Pepsin 250mg (Vysis)
- Fixogum (Marabu)
- Hybrite - Thermobrite,Statspin (Abbot Molecular)
- Wasserbäder (GFL-Gesellschaft für Labortechnik; Typ:1002, Typ:1083)
- Heizplatte (MEDAX)
- Küvetten 100 ml (Glaswerk Wertheim)
- Selbst hergestellte DNA-Sonde
- COT Human DNA (Roche)
- Zentromersonde – CEP 8; Spectrum Orange (Abbot)
- Hybridisierungsmix (Master Mix 1.0: aus 5ml deionisiertes Formamid, 1g Dextransulfat, 1,5ml 20xSSC; mit H_2O auf 7ml aufgefüllt; pH=7

2. Detektion

- Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection; (Roche) enthält:
  1. Blocking Solution (Lösung aus niedermolekularen Proteinen)
  2. Anti-DIG monoclonal antibody against digoxigenin mouse IgG1
  3. Anti-Mouse-Ig-DIG-F$(ab)_2$ fragment from sheep

- DAPI – 0,2mM 4'5-Diamindino-2-Phenyl-Indol; Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)
- Antifade – p-Phenylenediamine (PPD)
- Brutschrank (WTB BINDER)
- Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss)

3. Waschpuffer

- Hybridisierungswaschpuffer:2xSSC+0,3%NP40;pH=7,25 (SSC=2xsodiumcitrat,NaCl),(NP40=Octylphenoloxypolyethoxyethanol)
- PBS–Phosphate buffered saline=Natriumchlorid, (Di)Natriumhydrogenphosphat (DakoCytomation)
- Detektionswaschpuffer: 0,2% TWEEN in 1x PBS; pH=7,4 (TWEEN=Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)
- pH-Meter –Digital pH Meter pH 525 (WTW-Wissenschaftlich Technische Werkstätten)

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung pBAC-E.coli-Klonen

Zuerst wurde der passende pBAC-E.coli Klon für die TPD52-Gensonde auf der Webseite www.ensembl.org herausgesucht. Der Klon (BAC RP11-795H2, RZPD, Deutschland) hat eine Länge von 187,2 kb und umfasst das gesamte TPD52-Gen, welches auf 8q21.13 liegt.

In einen 100 ml Erlenmeyerkolben werden 10 ml Medium gefüllt. Dieses wird mit 10 µl der pBac-E. coli-Kultur aus dem Glycerol-Stock (150 µl Glycerol; autoklaviert in 2ml-Kryoröhrchen mit 850 µl E.coli-Kultur) oder mit einem Abstrich aus dem Stab-Stock angeimpft. Dazu wird mit abgeflammter Pinzette ein autoklavierter Zahnstocher gefasst. Es werden 30 µl Chloramphenicol dazugegeben, da der Klon eine Chloramphenicolresistenz enthält. Die angeimpfte Kultur wird bei Raumtemperatur und 200 rpm im Schüttelinkubator für 2 Tage inkubiert. 10 µl der trüb gewordenen Kultur werden in 10 ml frisches LB-Medium überführt und 30 µl Chloramphenicol überimpft. Diese Kultur wird bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert.

3.2.2 pBac-DNA-Extraktion aus einer pBac-E.coli-Flüssigkultur

Die DNA wurde mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ extrahiert. Es werden 3 ml (2 ml + 1 ml) der hergestellten pBac-E.coli-Flüssigkultur in ein 2 ml- Eppendorf-Röhrchen überführt für 90 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das entstandene Pellet wird in 250 µl Puffer P1 (Zusatz von RNAse) vollständig resuspendiert. Es werden 250 µl Puffer P2 zugegeben, welcher SDS zur Spaltung der Zellmembran und Denaturierung der Proteine, sowie NaOH zur Denaturierung der chromosomalen und Plasmid-DNA enthält. Durch 6-8 maliges Invertieren wird die Probe durchmischt und inkubiert. Es werden 350 µl Puffer N3, welcher Natriumacetat enthält, beigegeben und durch 6-8 maliges Invertieren die Suspension neutralisiert und die Plasmid-DNA renaturiert. Nach 10 - minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wird der Überstand, welcher die Plasmid-DNA enthält in eine „QIAprep spin Säule“ überführt. Diese wird für 60 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an die Säule bindet und der Duchfluss in einer Eppendorfküvette aufgefangen und später verworfen werden kann. Die Säule wird mit 500 µl ethanolhaltigem 70% PE-Puffer beladen und durch Zentrifugation für 60 Sekunden bei 13.000 rpm gewaschen. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Die Säule wird in eine frische Eppendorfküvette gestellt, mit 50 µl auf 70°C erwärmten Elutionspuffer EB beladen und anschließend 60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation für 60 Sekunden bei 13.000 rpm wird das Eluat in der Eppendorfküvette aufgefangen und bei 4°C aufbewahrt. Die Messung der Konzentration und Reinheit der erhaltenen DNA erfolgt durch photometrische Messung (DNA Absorption bei 260 nm) am Nano Drop ND-1000 mit dem Programm: “ND3.1.0:Nucleic Acid“. Die Leerprobe mit 1,5µl des verwendeten Elutionspuffers EB dient als Referenz. Die Proben, die einen ausreichenden DNA-Gehalt von mindestens 50 ng/µl und eine Reinheitsratio (260/280 Absorptionsverhältnis DNA/Proteine, welche die Probe verunreinigen) zwischen 1,8 und 2,0 vorweisen, werden zur DIG-Nick Translation für die Sondenherstellung weiterverwendet.

3.2.3 FISH-Sondenmarkierung

Die Nick-Translation ist eine Methode zur Markierung von DNA. Mit dem Enzym DNase werden Einzelstrangbrüche („nicks“) an der DNA gesetzt. Dann werden mit Hilfe des En-

zyms Polymerase I, welches eine 5‘-3‘-Exonukleaseaktivität besitzt, Digoxigenin-markierte Nukleotide in den DNA-Strang eingefügt. Die Polymerase I baut dabei vom 5‘-Ende her die zum Komplementärstrang passenden Nukleotide ein und entfernt gleichzeitig am 3‘-Ende einen Nukleotidbaustein. Da der zuvor erfolgte Einzelstrangbruch nicht wieder verschlossen werden kann, wird die Lücke gewissermaßen verschoben, daher der Name „Nick-Translation“. Die DNA wird dabei auch in Fragmente passender Länge unterteilt. Dieses kann durch Gel - Elektrophorese kontrolliert werden.

Es werden 5 µl dNTP-Mix, ein Nukleotidmix ohne dTTP mit je 0,2 mM, in ein 0,5 ml Eppendorfröhrchen pipettiert. Dann werden 1 µl Digoxigenin-dTTP (1 mM) hinzugegeben. Das zu verwendende Volumen der zuvor hergestellen DNA-Lösung ist aus der Konzentration der Lösung zu berechnen um einen 50 µl-Ansatz zu erhalten. Dafür wird die optimale Menge der DNA von 2000 ng durch die Konzentration der aktuellen Probe geteilt:

$2000\ ng\ /\ X_{\text{Konzentration der Probe}}\ ng/\mu l = X_{\text{benötigte DNA-Lösung}}\ \mu l$

Ist das errechnete Volumen kleiner als die höchst zulässige Menge von 38 µl, wird die Differenz zu 38 µl mit dH_2O aufgefüllt. Schließlich werden 5 µl Polymerase I-DNase-Mix (0,5 U/µl Pol I, 0,4 U/µl DNase I) und 1 µl Polymerase I (10 U/µl) hinzugegeben. Danach wird der 50 µl DIG-Nick-Translationsansatz gemischt und kurz zentrifugiert.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über den DIG-Nick-Translationsansatz:

dNTP-Mix ohne dTTP	*5µl*
Digoxigenin 11-dUTP	*1µl*
pBAC-DNA-Lösung	*38µl*
Pol I-/ DNase Enzym Mix	*5µl*
DNA Polymerase I	*1µl*
Ansatzmenge	*50µl*

Der Ansatz wird für 90 Minuten im Thermocycler bei 15°C inkubiert. Anschließend werden 5 µl Polymerase I-DNase-Mix zugegeben und in der Pipettenspitze durchmischt. Der Sondenansatz wird weitere 15 Minuten im Thermocycler bei 15°C inkubiert. Die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stop-Puffer (0,5 M EDTA, pH 8,0) beendet. Zum Abschluss wird der Ansatz im Vortex durchmischt, kurz zentrifugiert und bei 4°C gelagert.

3.2.4 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

3.2.4.1 Methode

FISH ist eine Methode, mit der zum Beispiel DNA-Sequenzen sichtbar gemacht werden können. Um das zu untersuchende Gen TPD52 darzustellen, wurde eine selbst hergestellte TPD52-Gensonde verwendet. Als Referenz diente eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosoms 8, auf welchem TPD52 liegt. Die Arbeitsschritte werden in zwei Arbeitstage aufgeteilt. Am ersten Tag wird der zu untersuchende TMA auf dem Objektträger entparaffiniert und vorbehandelt. Anschließend wird die Gen- sowie Zentromersonde zur Hybridisierung auf den Objektträger gegeben. Am zweiten Arbeitstag werden unspezifische gebundene Sonden abgewaschen. Die korrekt hybridisierten Gensonden werden mit Antikörpern detektiert, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Danach wird das Chromatin des Gewebes gegengefärbt und das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.2.4.2 Vorbehandlung und Hybridisierung

Zum Entparaffinieren werden die 4µm dicken TMA-Schnitte, die auf einen Objektträger fixiert sind dreimal in Xylol für jeweils 10 Minuten und anschließend zweimal in 96% Ethanol für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Objektträger werden für 3 Minuten auf eine 48°C warme Heizplatte gelegt, um das Ethanol zu verdampfen. Anschließend werden die Gewebe bei 80°C mit Pretreatment-Lösung (NaSCN-pH=5,4) für 15 Minuten inkubiert. NaSCN bindet an Disulfidbrücken und bricht damit die Tertiärstruktur von Proteinen im Gewebe sowie der Zellmembran auf. Die Objektträger werden 2 Minuten in dH_2O bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend werden die Gewebeschnitte 150 Minuten in einer Protease–Lösung (0,01M HCL, (pH=2.0) + 250 mg Pepsin) bei 37°C inkubiert, wodurch alle Proteine verdaut werden. Es wird erneut 2 Minuten in dH_2O gewaschen. Dann werden die Objektträger für jeweils für 3 Minuten in 70%, 80% und 96% Ethanol gestellt, wodurch dem Gewebe Wasser entzogen wird. Das vorbehandelte Gewebe ermöglicht der Sonde einen leichten Zugang in den Zellkern, wo sie an die zu untersuchende Sequenz binden kann.

Für die Hybridisierung werden 20 µl Sonden-Hybridisierungsmix benötigt. Dieser enthält 14,5 µl kommerzielle Zentromersonde von Chromosom 8 (CEP8), 2,0 µl humane COT-

DNA (1 g/µl) und 3,5 µl Sonden-DNA. In der CEP8-Lösung sind 14 µl Basis-Hybridisierungsmix enthalten. COT-DNA verhindert Kreuzhybridisierungen mit unspezifischen und repetitiven DNA-Sequenzen. Der Basis-Hybridisierungsmix enthält Formamid, welches die Denaturierungstemperatur der DNA senkt, indem es Wasserstoffbrückenbindungen schwächt. Dies erleichtert die Auftrennung des DNA-Doppelstranges.
Die 20 µl Sondenhybridisierungsmix werden auf die Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Deckgläschen werden mit Fixogum luftdicht versiegelt. Dies vermeidet ein Austrocknen während der Hybridisierung. Da die kommerziellen Zentromersonden bereits direkt mit einem lichtempfindlichen Fluorochrom markiert sind, müssen ab diesem Zeitpunkt die Objektträger vor Licht geschützt werden um ein frühzeitiges Ausbleichen zu verhindern. Die Objektträger werden in den Thermobrite gelegt, dort 10 Minuten bei 72°C denaturiert und anschließend für 24-72 Stunden bei 37°C hybridisiert.

3.2.4.3 Waschen und Antikörperdetektion

Die Objektträger werden aus dem Thermobrite genommen, Fixogum und Deckgläschen werden entfernt. Die Objektträger werden kurz in Hybridisierungswaschpuffer bei Raumtemperatur gestellt, bis weitere Küvetten Hybridisierungswaschpuffer im Wasserbad eine Temperatur von 72°C erreicht haben. Darin werden die Objektträger 2 Minuten gestellt, wobei die nicht gebundene Sonden-DNA abgewaschen wird.
Die Objektträger werden kurz in PBS-Puffer gestellt und anschließend mit 500µl 1x Blocking Solution eingedeckt. Diese besteht aus niedermolekularen Proteinen und sättigt freie Bindungsstellen von proteinbindenden Oberflächen ab. Dadurch werden unspezifische Antikörperbindungen vermieden, was später unter dem Mikroskop als Hintergrundleuchten die Auswertung erheblich stören würde. Nach 45 Minuten in einer dunklen Inkubationskammer wird die Blocking Solution abgekippt und der Objektträger mit dem ersten Detektions-Antikörper für 75 Minuten bei 37°C (im Brutschrank) in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach werden die Objektträger 3 Mal für jeweils eine Minute in Detektionswaschpuffer bei 37°C gewaschen um nicht gebundene Antikörper (AK) zu entfernen. Mit derselben Vorgehensweise werden der zweite und dritte AK inkubiert und abgewaschen. Allerdings wird beim dritten Mal für jeweils 5 Minuten gewaschen.
Der erste AK bindet an das Hapten (Digoxigenin) der Gensonde. Der zweite AK bindet an den ersten. Der dritte AK, an den ein Fluorochrom gebunden ist, bindet an den zweiten AK. Dadurch entsteht eine Bäumchenstruktur die der Signalverstärkung dient.

Nach Waschung des dritten fluoreszenzgekoppelten Antikörpers muss der Objektträger in einem dunklen Raum lufttrocknen.

Auf die Objektträger werden jeweils ein Tropfen DAPI/Antifade gegeben dann mit einem Deckgläschen abgedeckt. DAPI färbt das Chromatin des Gewebes an und macht damit die Zellkerngrenzen sichtbar, was bei der Auswertung die Zugehörigkeit eines Gen- oder Zentromersignals zum jeweiligen Zellkern ermöglicht. Antifade verhindert das beschleunigte Ausbleichen der Signale.

3.2.5 Auswertung

Die fertigen Objektträger wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei wurde die Rate TPD52-Signale / Zentromer 8-Signale in den einzelnen Krebszellen für jede Gewebeprobe bestimmt. Als *„Amplifikation“* wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen TPD52-Signalen wie Zentromer 8-Signalen (Rate TPD52 /Cep8 $\geq$ 2,0) definiert. Gewebeproben, die eine TPD52/Cep8-Rate größer als 1,0 aber kleiner als 2,0 aufwiesen (1,0 < TPD52/Cep8-Rate < 2,0), wurden als „*gains*“ gewertet. Gewebeproben mit 2 Gensignalen und einer Rate TPD52/Cep8 = 1,0 wurden als *„normal“* definiert, Proben mit mehr als 2 Gensignalen und einer Rate TPD52/Cep8 = 1,0 wurden als *„polysom“* gewertet. Eine Rate TPD52/Cep8 < 1,0 wurde als *„Deletion“* definiert.

3.2.6 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, „Grading“, „Staging“, molekularen Parametern und Genamplifikationen darzustellen, wurden die „Contingency table analysis“ sowie der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und Patientenüberleben zu untersuchen, wurde der Log-rank-Test verwendet. Die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander wurden mit Hilfe der Cox Regression in Relation zum Patientenüberleben gesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 TPD52 Amplifikation im Mammakarzinom

Von den 2198 primären Mammakarzinomen des Breast-Prognosis-TMA konnten 1351 (61,5%) erfolgreich mit FISH analysiert werden. Für 847 (38,5%) Gewebe-Spots konnte der TPD52 Amplifikationsstatus nicht bestimmt werden, weil entweder die FISH-Signalstärke nicht ausreichte oder der Gewebespot während der Vorbehandlung abgeschwommen war.

Von den 1351 analysierbaren Tumoren zeigten 120 (8,88%) eine TPD52 Amplifikation gemäß den vordefinierten Kriterien (siehe: 3.2.5). Von diesen 120 amplifizierten Tumoren wurden 16 (1,18%) als High-Level Amplifikationen (mehr als 10 Gensignale) vom Cluster-Typ (Gensignale sind dicht gedrängt oder als „Wolken“ zu sehen) bewertet. 31 (2,29%) wurden als Low-Level Amplifikationen (weniger als 10 Gensignale) vom Cluster-Typ eingestuft. Die restlichen 73 (5,40%) wurden als extrachromosomale Amplifikationen bezeichnet, da sie zwar eine Gen/Zentromer-Rate von mindestens 2 aufwiesen, die Signale aber nicht gedrängt, sondern auf den ganzen Zellkern verteilt erschienen.

Vom analysierbaren Gesamtkollektiv zeigten 195 (14,43%) einen leichten Zugewinn („gain“). 1036 (76,68%) zeigten keinen Zugewinn oder waren polysom und wurden als „normal“ zusammengefasst.

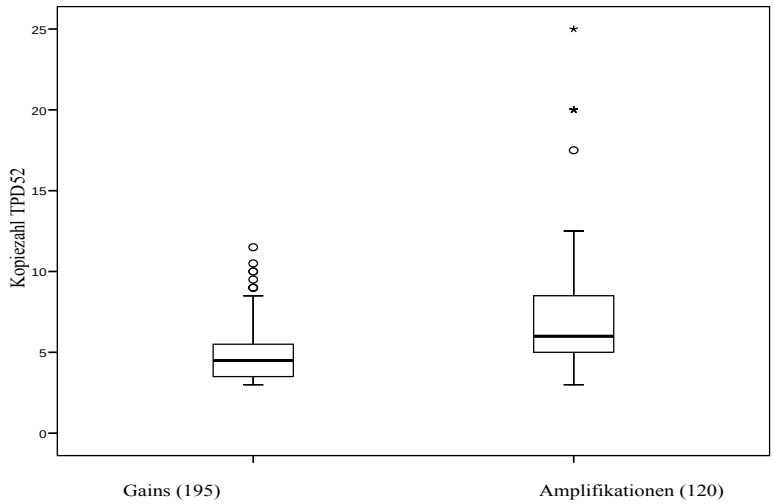

Abbildung 1: Verteilung der TPD52-Kopiezahl in 315 Mammakarzinomen mit TPD52-Gains und -Amplifikationen gemäß den vordefinierten Kriterien

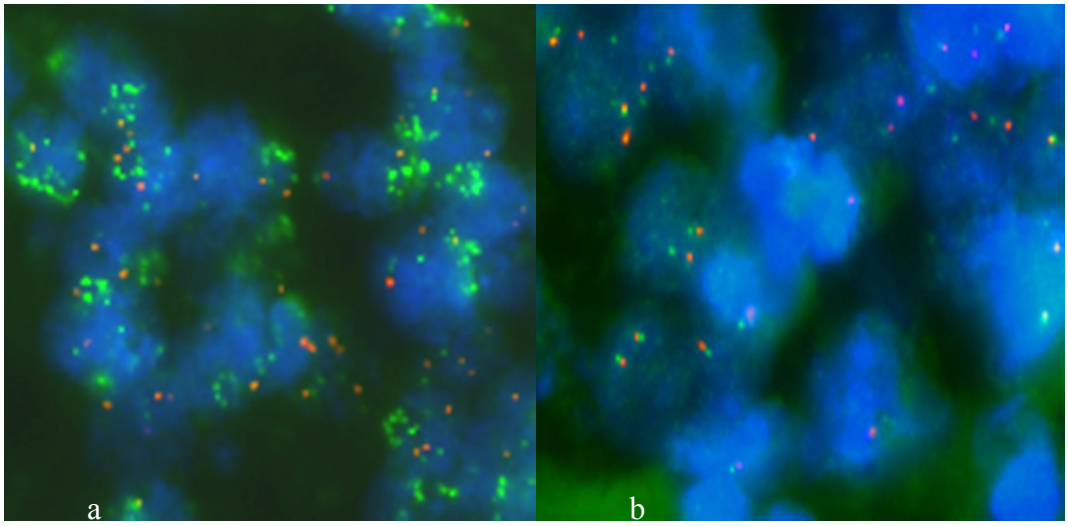

Abbildung 2: Beispiele von Mammakarzinomen mit (a) und ohne (b) TPD52-Amplifikation: Die roten Signale geben die Kopiezahl von Chromosom 8 an, die grünen Signale zeigen die Kopiezahl des TPD52-Gens. FISH-Analyse, 630fache Vergrößerung. ((a)Slide F, Block A, Feld 7d; (b) Slide A, Block A, Feld 2i)

4.1.1 Assoziation zum Tumorphänotyp

Die Häufigkeit von TPD52-Amplifikationen nahm mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad zu: 61/499 (12,22%) der G3-Tumore, 38/543 (7,00%) der G2-Tumore und lediglich 21/307 (6,84%) der G1-Tumore zeigten Amplifikationen. Ein ähnliche Häufigkeitsverteilung war bei leichten Genzugewinnen zu beobachten: 99/499 (19,84%) der G3-Tumore, 73/543 (13,44%) der G2-Tumore und nur 23/307 (7,49%) der G1-Tumore zeigten „Gains“. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ($p<0,0001$).

TPD52-Amplifikationen waren häufiger in pN2-Tumoren 11/80 (13,75%) als in pN1-Tumoren 46/486 (9,47%) und pN0-Tumoren 43/560 (7,68%). Allerdings waren der Zusammenhang zur Metastasierung statistisch nicht signifikant ($p=0,4041$).

Beim Zusammenhang von Tumorstadium und der Amplifikationshäufigkeit war eine leichte Tendenz, jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang festzustellen: bei 163/17 (10,43%) der pT4-Tumoren, 88/8 (9,09%) der pT3-Tumore, 638/55 (8,62%) der pT2-Tumore sowie 453/39 (8,61%) der pT1-Tumore waren TPD52-Amplifikationen zu finden ($p=0,8987$).

Die TPD52-Amplifikation traten gehäuft bei 8/53 Fällen in Karzinomen vom medullären Typ (15,09%) auf. Lediglich 87/981 (8,87%) der duktalen und 9/162 (5,56%) der lobulären Karzinome zeigten eine Amplifikation. Allerdings waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Tabelle 2: TPD52-Amplifikation und klinisch-pathologische Parameter invasiver Mammakarzinome

			TPD52 Amplifikationsstatus			
		Auswertbar für TPD52 (n)	*Normal (%)*	*Gain (%)*	*Amplifikation (%)*	*P-Wert*
Alle		*1351*	*1036 (77%)*	*195 14(%)*	*120 (9%)*	
Histologie	*Duktales Karzinom*	*981*	*745 (76%)*	*149 (15%)*	*87 (9%)*	
	Lobuläres Karzinom	*162*	*134 (83%)*	*19 (12%)*	*9 (5%)*	*0,1325*
	*Medulläres Karzinom **	*47*	*29 (66%)*	*10 (19%)*	*8 (15%)*	*0,2360*
	Papilläres Karzinom	*15*	*11 (73%)*	*2(13%)*	*2(13%)*	
	Kribriformes Karzinom	*64*	*24 (75%)*	*4 (13%)*	*4 (13%)*	
	Muzinöses Karzinom	*36*	*32 (89%)*	*3 (8%)*	*1 (3%)*	
	Andere	*78*	*61 (78%)*	*8 (10%)*	*9 (12%)*	
pT-Stadium	*pT1*	*453*	*355 (78%)*	*59 (13%)*	*39 (9%)*	*0,8987*
	pT2	*638*	*484 (76%)*	*99(16%)*	*55 (9%)*	
	pT3	*88*	*66 (75%)*	*14 (16%)*	*8 (9%)*	
	pT4	*163*	*124 (76%)*	*22 (14%)*	*17 (10%)*	
pN-Stadium	*pN0*	*560*	*440 (79%)*	*77 (14%)*	*43 (8%)*	*0,4041*
	pN1	*486*	*363 (75%)*	*77(16%)*	*46 (9%)*	
	pN2	*80*	*57 (71%)*	*12 (15%)*	*11 (14%)*	
Grading	*G1*	*307*	*263 (86%)*	*23 (7%)*	*21 (7%)*	*<0.0001*
	G2	*543*	*432 (80%)*	*73 (13%)*	*38 (7%)*	
	G3	*499*	*339 (68%)*	*99 (20%)*	*61 (12%)*	
ER	*Positiv*	*971*	*757 (78%)*	*137 (14%)*	*77 (8%)*	*0,0521*
	Negativ	*316*	*227 (72%)*	*52 (16%)*	*37 (12%)*	
PR	*Positiv*	*447*	*351 (79%)*	*64 (14%)*	*32 (7%)*	*0,2326*
	Negativ	*798*	*604 (76%)*	*114(14%)*	*80 (10%)*	

Die Prozentangaben wurden zur besseren Übersicht auf – oder abgerundet
**Die medullären Karzinome umfassen ebenfalls die atypisch medullären Karzinome*

4.1.2 Assoziation zu molekularen Parametern:

Die Daten zu den folgenden molekularen Parametern wurden in vorangegangenen Studien auf diesem Tissue Micro Array gesammelt. Die entsprechende Studie wird hinter dem jeweiligen Parameter zitiert. Die Assoziationen zu diesen Parametern ergaben folgende Ergebnisse:

Korrelation mit HER2-FISH-Daten (Al-Kuraya et al., 2004): 37/207 (17,87%) der HER2 amplifizierten Tumore waren ebenfalls TPD52 amplifiziert, während nur 71/920 (7,72%) der HER2 negativen Tumore eine Amplifikation von TPD52 aufwiesen ($p<0,0001$).

Korrelation mit cMYC-FISH-Daten (Al-Kuraya et al., 2004): 18/59 (30,51%) der cMYC-Ampifizerten, 36/222 (16,22%) der cMYC-Gains und nur 43/775 (5,55%) der cMYC Negativen waren TPD52 amplifizert ($p<0,0001$).

Korrelation mit Ki67-IHC (Ruiz et al., 2006): Anhand des prozentualen Anteils der Ki67 exprimierenden Zellen, dem Ki67 Färbeindex, wurden die Tumore in die Gruppen „high“,

„intermediate-high“, „intermediate-low“ und „low“ unterteilt. 50/398 (12,56%) der Gruppe Ki67- „high“, 25/288 (8,68%) der Gruppe Ki67- „intermediate-high“, 22/286 (7,69%) der Gruppe Ki67-„intermediate-low“ und 10/207 (4,83%) der Gruppe Ki67-„low“ waren TPD52 amplifiziert (p=0,0003)

Korrelation mit ER-IHC (Al-Kuraya et al., 2004) und PR-IHC (Al-Kuraya et al., 2004): Hier ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Allerdings waren Amplifikationen bei ER-Negativen Tumoren häufiger (11,71% Amplifikationen bei ER-negativen gegen 7,16% bei ER-positiven; p = 0,0521).

Korrelation mit MDM2-FISH (Al-Kuraya et al., 2004): 12/72 (16,67%) der MDM2 Amplifizierten und lediglich 103/1157 (8,90%) der MDM2 Negativen waren TPD52 amplifiziert (p=0,0356).

Korrelation mit CCND1-FISH (Al-Kuraya et al., 2004), p53-IHC (Ruiz et al., 2006), p16-IHC (Ruiz et al., 2006), BCL2-IHC (Ruiz et al., 2006): Hier ergaben sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 3: Korrelation von TPD52-Amplifikation mit anderen molekularen Parametern

			TPD52 Amplifikationsstatus			
		Auswertbar für TPD52 (n)	*Normal (%)*	*Gain (%)*	*Amplifikation (%)*	*P-Wert*
CCND1	*nicht-amplifiziert*[a]	*973*	*751 (77%)*	*140 (14%)*	*82 (8%)*	*0,0872*
	amplifiziert	*250*	*178 (71%)*	*41 (16%)*	*31 (12%)*	
cMYC	*nicht-amplifiziert*[a]	*997*	*779 (78%)*	*139 (14%)*	*79 (8%)*	*<0.0001*
	amplifiziert	*59*	*27 (46%)*	*14 (24%)*	*18 (31%)*	
MDM2	*nicht-amplifiziert*[a]	*1157*	*882 (76%)*	*172 (15%)*	*103 (9%)*	*0,0356*
	amplifiziert	*72*	*46 (64%)*	*14 (19%)*	*12 (17%)*	
HER2	*nicht-amplifiziert*[a]	*920*	*718 (78%)*	*131 (14%)*	*71 (8%)*	*<0.0001*
	amplifiziert	*207*	*130 (63%)*	*40 (19%)*	*37 (18%)*	

[a]*Fasst Tumoren mit normalen Genkopiezahlen und Gains zusammen*
Die Prozentangaben wurden zur besseren Übersicht auf – oder abgerundet

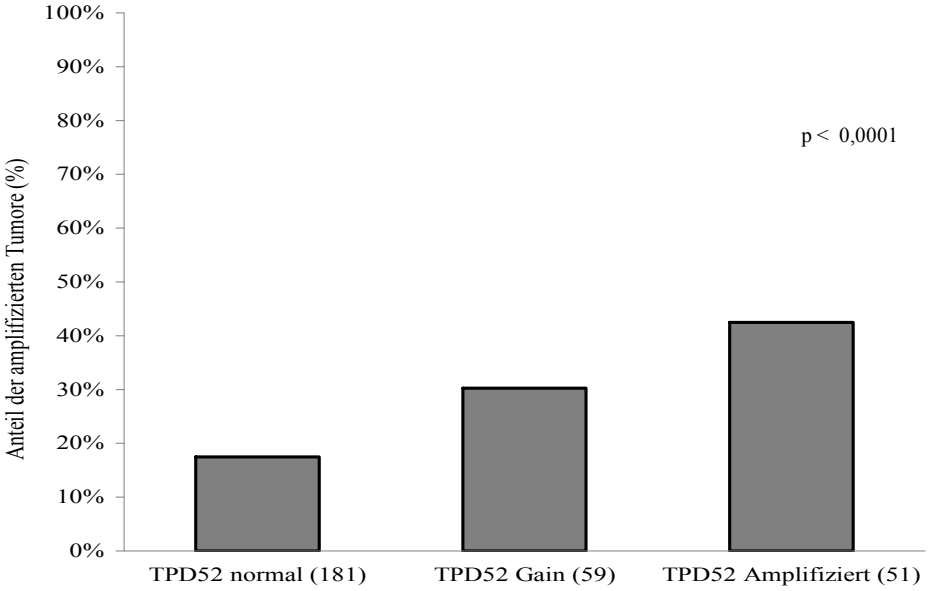

Abbildung 3: Anteil der Mamakarzinome, bei denen mindestens eines der Gene HER2, cMYC oder MDM2 amplifiziert ist, bei gleichzeitigem Vorhandensein von TPD52-Amplifikation oder Gains

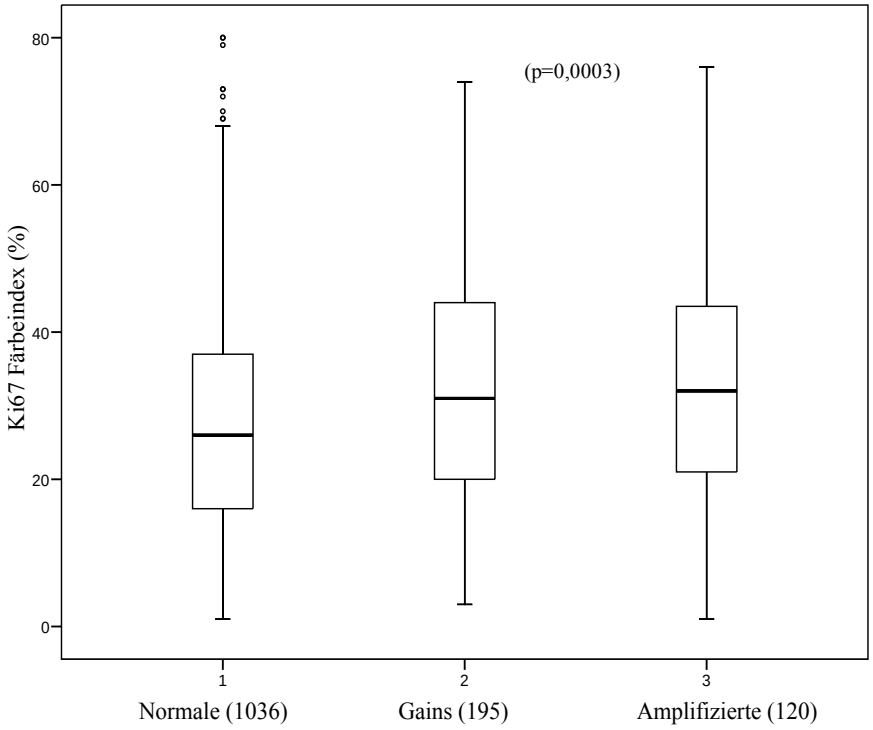

Abbildung 4: Zusammenhang zwischen Ki67 Färbeindex und TPD52-Zugewinnen in Mammakarzinomen

4.1.3 Assoziation zur Patientenprognose

Die Kaplan-Meier Analyse zeigte, dass Patienten mit TPD52-Amplifikation signifikant früher starben als Patienten mit Tumoren ohne TPD52-Amlifikation (p= 0,0022). Die Prognose für Patienten mit TPD52 "Gains" lag dazwischen. Die Multivariate Analyse mit Hilfe der Cox Regression zeigte, dass die TPD52 Amplifikation ein von T-Stadium, Nodalstatus und Grade unabhängiger prognostischer Faktor ist (p=0,037).

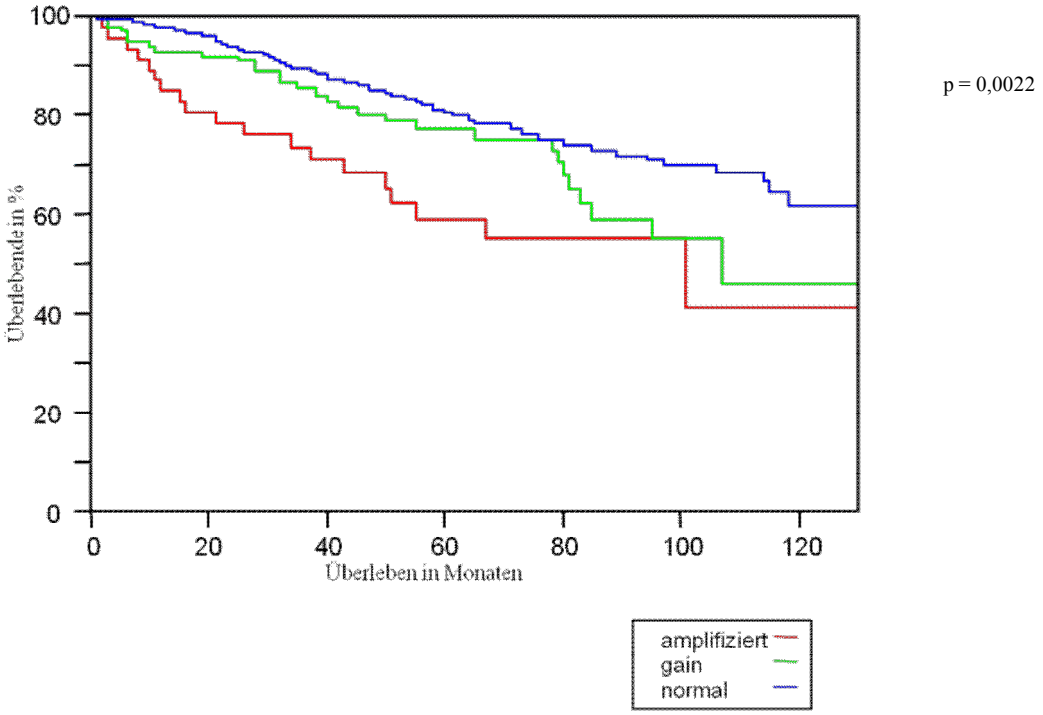

Abbildung 5: Einfluss der TPD52 Amplifikation auf das Überleben der Patientinnen

Tabelle 4: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens in Mammakarzinomen bezügliche des T Stadiums, Nodal Status, Gradings und des TPD52-Amplifikationsstatus

	Hazard Ratio für das Gesamtüberleben	*95% Konfidenzintervall*	*p-Wert*
Tumor Stadium			
pT1 vs. pT2	1,363	0,861 - 2,156	0,186
pT1 vs. pT3	1,525	0,705 - 3,297	0,284
pT1 vs. pT4	2,341	1,333 - 4,112	0,003
Nodal Status			
pN0 vs. pN1	3,048	1,927 - 4,821	<0,0001
pN0 vs. pN2	6,381	3,486 - 11,681	<0,0001
Tumor Grade			
G1 vs. G2	1,193	0,650 - 2,188	0,569
G1 vs. G3	2,684	1,519 - 4,741	0,001
TPD52-Amplifikation			
Normal vs. Gain	1,048	0,653 - 1,684	0,845
Normal vs. Amplifikation	1,814	1,036 - 3,175	0,037

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnten 1351 Mammakarzinome erfolgreich mit FISH untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Gen TPD52 in 8,88% der Mammakarzinome nach den zuvor definierten Kriterien amplifiziert ist.

Bisher wurden nur wenige Daten zur TPD52 Amplifikation publiziert. In einer Studie wurde die Amplifikationshäufigkeit mit 9% (3/32 Fällen) angegeben (Balleine et al., 2000). Dies stimmt gut mit den Daten der vorliegenden Studie überein. Allerdings sind diese Ergebnisse eher wenig zuverlässig, da zum einen eine sehr geringe Fallzahl untersucht wurde, die kaum eine zuverlässige Aussage über die Prävalenz der TPD52 Amplifikation in Mammakarzinomen zulässt. Zum anderen wurden diese Daten mit Southern Blot gewonnen, welches eine veraltete Methode ist, die zum Nachteil hat, dass die DNA aus dem gesamten Gewebe isoliert wird und so die Genome von Krebszellen und anderen Zelltypen vermischt werden, so dass sozusagen ein „Verdünnungseffekt“ stattfindet. Dadurch würde die Prävalenz sogar eher unterschätzt werden. Eine FISH-Studie mit einem künstlichen Hefechromosom als Sonde (YAC 936B3), welche das TPD52 Gen enthält, fand eine erhöhte Kopiezahl sogar in 60% (6/10 Fällen) (Fejzo et al., 1998). Allerdings lässt auch hier die geringe Fallzahl wohl kaum eine zuverlässige Aussage über die Prävalenz der TPD52 Amplifikation zu.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die TPD52-Amplifikation mit einer hohen Proliferationsaktivität, einem hohen Entdifferenzierungsgrad sowie mit schlechteren Überlebensraten signifikant korreliert. Dies deutet auf eine Bedeutung von TPD52 für die Tumorprogredienz. Die TPD52 Amplifikation war am häufigsten in medullären Mammakarzinomen zu finden. Diese zeichnen sich durch eine hohe Proliferatonsrate und die Expression von tumorrelevanten Proteinen wie EGFR aus (Matkovic et al., 2008). Signifikant war diese Häufung jedoch nicht. Auch schienen Amplifikationen tendenziell häufiger bei ER-negativen Tumoren zu sein, allerdings war auch dieses Ergebnis nicht signifikant. Der Vergleich mit anderen molekularen Parametern zeigte, dass bei HER2-, cMYC- und MDM2-Amplifikationen TPD52-Amplifikationen signifikant gehäuft auftraten. Die Daten zu diesen Parametern wurden in vorangegangenen Studien am selben TMA gesammelt. In zahlreichen Studien, unter anderem solche die den gleichen TMA verwendeten, konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Mammakarzinomen verschiedene DNA-Abschnitte häufig amplifiziert sind (Al-Kuraya et al., 2004; Albertson,

2006; Courjal et al., 1997; Courjal and Theillet, 1997; Melchor et al., 2005). Diese Untergruppe zeigt einen sogenannten „Amplifikations“-Phänotyp. Die TPD52-Amplifikation könnte ein Teil dieser Subgruppe sein, die sich durch häufige Genamplifikationen und große genetische Instabilität auszeichnet. Tumore, die vielfältige Genamplifikationen aufweisen, zeichnen sich unter anderem durch eine schlechte Prognose aus (Cuny et al., 2000). In einer der bereits erwähnten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das 8q21-Amplikon aus drei unterschiedlichen Amplikons besteht und TPD52 das Zielgen des mittleren sein könnte (Rodriguez et al., 2007). Des Weiteren konnte in einer Studie (Balleine et al., 2000) eine positive Korrelation zwischen der TPD52-Genkopiezahl und der Proteinexpression nachgewiesen werden. In der Brustkrebszelllinie SK-BR-3 korrelierte eine TPD52 Überexpression mit erhöhten Zellteilungsraten, dem Verlust der Kontaktinhibition und der Fähigkeit in Softagar zu wachsen, wohingegen verminderte eine TPD52 Expression zu erhöhten Apoptoseraten führte (Balleine et al., 2000; Rodriguez et al., 2007; Shehata et al., 2008). Genamplifikationen wurden in Mammakarzinomen in etwa 2-16% der Fälle gefunden: EGFR in 2% (Hadzisejdic et al.), MDM2 in 7%, cMYC in 11%, CCND1 in 14%, HER2 in 16% (Cuny et al., 2000). Die im Vergleich mittelmäßig hohe Prävalenz von 8,88%, die in der vorliegenden Studie gefunden wurde, ist ein weiterer Befund, der für die Rolle von TPD52 als Zielgen des mittleren 8q21-Amplikons spricht. Die verwendete Gensonde markiert außer TPD52 noch einen sehr kleinen 13 Kb langen Abschnitt des Gens MRPS28. Das entsprechende Protein ist Bestandteil der kleinen ribosomalen 28S Untereinheit in Mitochondrien. Eine onkogene Funktion wurde bisher nicht beschrieben. Theoretisch ist also ein maligner Phänotyp denkbar, der durch eine alleinige TPD52-Amplifikation gekennzeichnet ist, welche dem Tumor einen Selektionsvorteil bietet. Allerdings wurden auch die beiden Amplikons proximal und distal des TPD52-Amplikons bereits auf Ziel - Gene und ihre klinische und prognostische Relevanz untersucht (Choschzick et al., 2010; Nguyen Huu et al., 2008). Das proximale Amplikon, welches die potentiellen Ziel - Gene TCEB1 und TMEM70 enthält, ist ebenfalls mit einer hohen Proliferationsaktivität, einem hohen Entdifferenzierungsgrad, dem medullären Subtyp, einer schlechten Prognose sowie mit signifikant häufigeren HER2-, cMYC, -MDM2 und CCND1-Amplifikationen assoziiert. Auf 8q24 befindet sich außerdem das Onkogen cMYC, dessen Amplifikation eine relevante Rolle für Mammakarzinome zugeschrieben wird (Escot et al., 1986). Auch Amplifikationen von 8p12 sind bekannt (Cingoz et al., 2003). Etwa 60% der Mammakarzinome weisen ohnehin strukturelle und numerische

Veränderungen auf (Courjal and Theillet, 1997; Tirkkonen et al., 1998), meist in Form von geringen Genzahlveränderungen, wie teilweise oder vollständige Verluste von 8p oder Zugewinne von 8q (Rummukainen et al., 2001). Es ist also ebenfalls denkbar, dass die TPD52-Amplifikation zusammen mit anderen 8q21-Genamplifikationen im Sinne eines kumulativen Effektes einen malignen Phänotyp kennzeichnet.

Die vorliegende Studie konnte nachweisen, dass die TPD52-Amplifikation in Mammakarzinomen prognoserelevant ist. Daten zur klinischen Relevanz der TPD52 Amplifikation sind bisher nicht publiziert worden. Jedoch wurde in einer Studie bereits die klinische Bedeutung der TPD52 Überexpression mit Hilfe von Immunhistochemie untersucht (Shehata et al., 2008). Hierbei wurde ein Tissue Micro Array, bestehend aus 357 invasiven Mammakarzinomen, analysiert. Zu den Gewebeproben lagen jeweils Daten unter anderem zu dem Tumorgrad und dem Patientenüberleben vor. Eine hohe TPD52-Expression war signifikant assoziiert mit einer geringeren Überlebenszeit und einem hohen Entdifferenzierungsgrad. 9% der Grad 1 Tumore, 18% der Grad 2 Tumore und 35% der Grad 3 Tumore wiesen eine hohe TPD52 Expression auf. Eine Multivariate Analysemethode identifizierte die TPD52 Expression als einen unabhängigen Prädiktor für das Patientenüberleben. In der vorliegenden Studie wurde keine Expressionsanalyse gemacht, jedoch passt die Prognoserelevanz der Expression gut zu den eigenen Befunden. Gestützt wird dies durch die oben erwähnte Studie (Balleine et al., 2000), in der eine signifikant positive Korrelation zwischen TPD52 Genkopiezahl und TPD52 Expression, sowohl in Brustkrebszelllinien als auch in Brustkrebsgewebeproben, nachgewiesen werden konnte.

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse müssen auch methodische Probleme berücksichtigt werden. Die Amplifikationen wurden je nach Erscheinungsform unter dem Mikroskop in extrachromosomale Amplifikationen und in Cluster -Amplifikationen unterteilt. Cluster sind unter dem Mikroskop auch bei mäßiger Hybridisierungsqualität gut und sicher zu erkennen, da die Gensignale dicht gedrängt in „Wolken“ zusammenliegen und so eine Zelle mit Genamplifikationen von einer Zelle mit diploidem oder polysomen Chromosomensatz leicht unterschieden werden kann. In der vorliegenden Studie wurden 120/1351 (8,88%) der Mammakarzinome als amplifiziert gewertet. Davon waren 48/1351 (3,48%) Cluster - Amplifikationen. 73/1351(5,40%) wurden als extrachromosomale Amplifikationen gewertet, da die Gensignale hier nicht in „Wolken“, sondern deutlich getrennt voneinander auf den ganzen Zellkern verteilt erschienen. Tumorzellkerne können mehrere 10 µm im Durchmesser erreichen. Die Gewebe wurden jedoch mit einer

Schichtdicke von 4 µm geschnitten. Dieses Problem wird auch als „nuclear truncation“ bezeichnet und bedeutet, dass häufig auch genetisches Material verloren geht (de Pender et al., 2001). Dies kann zu Schwierigkeiten bei der Diagnose einer extrachromosomalen Amplifikation führen, da man bei dieser Gen – und Zentromersignale exakt auszählen muss und sich nicht auf das Vorhandensein eines „Clusters“ verlassen kann. Wie oben geschildert sind 8q-Abberationen häufig. So könnten extrachromosomale Amplifikationen auch durch großräumige Veränderungen wie Isochromosomenbildung oder Vermehrung größerer Teile von 8q zustande kommen. In diesem Fall wäre eine große Zahl von Genen amplifiziert, wobei es weniger offensichtlich wäre, bei welchem Gen es sich um das Zielgen handelt. Hier könnte ein biologischer Effekt also gar nicht maßgeblich von TPD52 abhängen. Trotzdem zeigen auch diese Fälle in der statistischen Analyse Prognoserelevanz. Dies ist aber zu erwarten, da auch diese Fälle keine euploiden Chromosomensätze mehr haben, also genetisch instabil sind (Yildirim-Assaf et al., 2007).

Eine FISH-Studie an einer solch großen Anzahl von Mammakarzinomen ist erst durch die Tissue Micro Array (TMA) Technologie möglich geworden. Es wäre unmöglich eine solche Anzahl von einzelnen Geweben mit einem angemessenen Arbeits-und Zeitaufwand zu untersuchen. Auch kann eine Sonde, welche selbst im Labor hergestellt werden muss, nur schwierig eine gleichbleibende Qualität aufweisen. Unterschiedliche Qualitäten und Hybridisierungseigenschaften würden auf Kosten der Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander gehen. Ein TMA, bei dem alle zu untersuchenden Gewebe auf wenigen Objektträgern Platz finden, ermöglicht eine Analyse aller Spots mit demselben Aliquot Sonde. Somit ist ein hohes Maß an Standardisierung gegeben. Die Gewebespots betragen 0,6 mm im Durchmesser und werden aus den Tumorgeweben ausgestanzt. Da Tumore jedoch oft sehr heterogen sind, stellt sich die Frage, ob ein 0,6 mm Gewebsstanze repräsentativ für den ganzen Tumor sein kann. Mehrere Studien konnten zeigen, dass sich mit einem TMA, der eine ausreichend große Anzahl an Geweben enthält, Assoziationen zwischen molekularen Parametern und anderen Tumoreigenschaften mit hochrepräsentativen p-Werten nachweisen lassen (Hoos et al., 2002; Nocito et al., 2001; Torhorst et al., 2001). Dies konnte auch an demselben Array, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, für das Protein Ki67 gezeigt werden. Dieses wird als Indikator für die Proliferationsaktiviät in Zellen verwendet und ist sehr heterogen in einzelnen Arealen des Tumors exprimiert. Trotz der Heterogenität konnten hochsignifikante Zusammenhänge mit allen untersuchten molekularen Parametern nachgewiesen werden (Ruiz et al., 2006).

TPD52 wird als ein mögliches Therapieziel bei Mammakarzinomen gesehen. Allerdings basiert diese Annahme bislang lediglich auf Tiermodellen. So wurden bereits erfolgreich therapeutische Strategien gegen Tumoren mit einer Überexpression des TPD52-Proteins im Mausmodel entwickelt. Payton et al. impften Mäuse mit dem Mausortholog mD52 zusammen mit CpG-Oligodesoxynukleotiden (ODN), um eine verstärkte Immunantwort zu erreichen. Die Versuchstiere entwickelten messbare mD52 spezifischen IgG Titer und bildeten spezifische zytotoxische T-Zellen. Eine Untersuchung der Organe konnte keine Infiltration von Immunzellen nachweisen, was für die Induktion einer Autoimmunreaktion sprechen würde. Um einen Impferfolg nachzuweisen wurden den Tieren syngene Tumorzellen, welche mD52 überexprimieren, intramuskulär injiziert. Während alle ungeimpften Tiere der Kontrollgruppe tödliche Tumoren und Lungenmetastasen entwickelten, wurden bei geimpften Tieren in bis zu 50% der Fälle die injizierten Tumorzellen abgestoßen. Die geimpften Tiere entwickelten keine Lungenmetastasen. Erfolgreich geimpften Tieren wurde 90 Tage nach der Erstinjektion erneut Tumorzellen gespritzt. Diese wurden wiederum erfolgreich abgestoßen, was für die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses spricht (Payton et al., 2008). Mirshahidi et al. konnten mit TPD52-spezifischen überlappenden synthetischen Peptiden (OSP) eine spezifische Immunantwort von CD4+ - und CD8+ T-Zellen in tumorkranken Mäusen erzeugen. Die Impfungen führten zu verringertem Tumorwachstum und zu verlängertem Überleben. Es konnte eine Langzeit-Überlebensrate von 40% erzielt werden. Nicht immunisierte Mäuse verstarben hingegen alle nach etwa 55 Tagen. Die Verwendung von CpG-ODN's als Adjuvans führte zu einer verstärkten Immunantwort und zu einer Anhebung der Langzeit-Überlebensrate auf 62,5%. Etwaige Nebenwirkungen wurden dadurch nicht verstärkt. Dabei kam es auch hier zu keiner autoimmunen Reaktion gegen normale Zellen, die physiologische Mengen an TPD52 exprimierten (Mirshahidi et al., 2009). Lewis et al. impften Mäuse mit mTPD52 cDNA zusammen mit GM-CSF und konnten damit hinsichtlich der Anzahl tumorfreier Versuchstiere, als auch des immunologischen Gedächtnisses, ein besseres Ergebnis als mit der Protein-ODN Impfung erzielen. Auch hier wurde keine Autoimmunität erzeugt (Lewis et al., 2009). Aufgrund der Stabilität der DNA sind Genamplifikationen leichter zu messen als eine RNA – oder Proteinüberexpression. Daher kann die Kenntnis ihrer klinischen Bedeutung auch wichtig für die Diagnostik sein. Falls also zielgerichtete Therapien gegen TPD52 klinische Anwendung fänden, wäre es ist denkbar, Patientinnen durch den Nachweis einer TPD52 Amplifikation für eine solche Therapie zu selektieren.

6 Zusammenfassung

Das Onkogen TPD52 wird als mögliches Therapieziel bei Brustkrebs angesehen. Bisherige Studien haben sich vor allem auf die Expression des Gens beschränkt. In Zell - linienversuchen führte die Überexpression von TPD52 zu verstärkter Proliferation sowie zu Zellenwachstum in Softagar. Unterdrückung der Proteinexpression trieb die Zellen verstärkt in die Apoptose. Allerdings liegt TPD52 in einem Bereich des Genoms (8q21.13), welcher in 9-60 % der Mammakarzinome in erhöhter Kopiezahl vorliegt (Balleine et al., 2000; Fejzo et al., 1998). Aufgrund der Kombination von onkogener Funktion und Genamplifikation ist TPD52 ein mögliches Zielgen des 8q21-Amplikons. Die klinische Relevanz wurde bislang nur auf Proteinebene untersucht, auf DNA-Ebene war dies bisher eine offene Fragestellung.

Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb, die Häufigkeit und klinische Bedeutung der TPD52-Amplifikation an einem großen Kollektiv von Mammakarzinomen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Veränderungen der TPD52-Kopiezahl mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) auf einem Tissue Micro Array mit über 2000 verschiedenen Mammakarzinomen analysiert. Amplifikationen wurden in insgesamt 8,88% der Tumore gefunden, 3,48% der Tumore zeigten sogenannte Cluster. Die Amplifikationen waren jeweils mit hohem Entdifferenzierungsgrad ($p < 0,0001$), hohem Ki67 Färbeindex ($p = 0,0003$), sowie cMYC-, HER2- (jeweils $p < 0,0001$) und MDM2-Amplifikationen ($p = 0,0356$) assoziiert. Keine signifikante Korrelation ergab sich mit der Expression von ER, p53, p16, BCL2, sowie zu CCND1-Amplifikationen. Der Log-Rank Test zeigte eine signifikant schlechtere Überlebensrate bei Patienten mit TPD52-Amplifikationen ($p = 0,0022$). Die Multivariate Cox Regressions Analyse ergab, dass die TPD52-Amplifikation ein von T-Stadium, Nodalstatus und Entdifferenzierungsgrad unabhängiger prognostischer Faktor ist ($p=0,037$).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle, die TPD52 bei der Entstehung und Progression eines malignen Phänotyps spielt. Sie zeigen, dass die Genamplifikation eine Untergruppe mit fortgeschrittenen, entdifferenzierten Mammakarzinomen mit ungünstiger Prognose kennzeichnet. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass TPD52-Amplifikationen signifikant häufiger in solchen Tumoren vorkommen, die sich bereits durch die Amplifikation anderer Genloci auszeichnen. Die Studie unterstreicht damit auch die Bedeutung von TPD52 als Therapieziel.

7 Literaturverzeichnis

Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kochli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G. 2004. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. Cancer Res 64:8534-8540.

Alagaratnam S, Hardy JR, Lothe RA, Skotheim RI, Byrne JA. 2009. TPD52, a candidate gene from genomic studies, is overexpressed in testicular germ cell tumours. Mol Cell Endocrinol 306:75-80.

Albertson DG. 2006. Gene amplification in cancer. Trends Genet 22:447-455.

Albertson DG. 2008. Conflicting evidence on the frequency of ESR1 amplification in breast cancer. Nat Genet 40:821-822.

Ali IU, Campbell G, Lidereau R, Callahan R. 1988. Lack of evidence for the prognostic significance of c-erbB-2 amplification in human breast carcinoma. Oncogene Res 3:139-146.

Andersen J, Poulsen HS. 1989. Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue. Prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer. Cancer 64:1901-1908.

ASCO. 1998. 1997 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on November 7, 1997 by the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 16:793-795.

Ashikari R, Huvos AG, Urban JA, Robbins GF. 1973. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Cancer 31:110-116.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. 2003. Genome-wide RNAi analysis of Caenorhabditis elegans fat regulatory genes. Nature 421:268-272.

Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH. 2004. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. Cancer Biol Ther 3:772-775.

Balleine RL, Fejzo MS, Sathasivam P, Basset P, Clarke CL, Byrne JA. 2000. The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 29:48-57.

Bard F, Casano L, Mallabiabarrena A, Wallace E, Saito K, Kitayama H, Guizzunti G, Hu Y, Wendler F, Dasgupta R, Perrimon N, Malhotra V. 2006. Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization. Nature 439:604-607.

Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S. 1995. Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. Genes Chromosomes Cancer 12:97-109.

Barker PE, Drwinga HL, Hittelman WN, Maddox AM. 1980. Double minutes replicate once during S phase of the cell cycle. Exp Cell Res 130:353-360.

Beerli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE. 1995. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. Mol Cell Biol 15:6496-6505.

Berns EM, Klijn JG, van Putten WL, van Staveren IL, Portengen H, Foekens JA. 1992. c-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. Cancer Res 52:1107-1113.

Bernstein L, Ross RK. 1993. Endogenous hormones and breast cancer risk. Epidemiol Rev 15:48-65.

Bethesda. 2001. National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: Adjuvant therapy for breast cancer November 1-3, 2000. Bethesda (MD): NIH. Available: http://odp.od.nih.gov/consensus/cons/114/114_statement.htm. Bethesda 2001.

Black CL, Morris DM, Goldman LI, McDonald JC. 1983. The significance of lymph node involvement in patients with medullary carcinoma of the breast. Surg Gynecol Obstet 157:497-499.

Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M, Scarpa A, Leenstra S, Frattini M, Barbareschi M, Grammastro MD, Sciarrotta MG, Zanon C, Marchetti A, Bardelli A. 2008. AKT1(E17K) in human solid tumours. Oncogene 27:5648-5650.

Blichert-Toft M, Smola MG, Cataliotti L, O'Higgins N. 1998. Principles and guidelines for surgeons--management of symptomatic breast cancer. On behalf of the European Society of Surgical Oncology. Ann Chir Gynaecol 87:101-109.

Bloom HJ, Richardson WW, Field JR. 1970. Host resistance and survival in carcinoma of breast: a study of 104 cases of medullary carcinoma in a series of 1,411 cases of breast cancer followed for 20 years. Br Med J 3:181-188.

Boecker W, Buerger H, Schmitz K, Ellis IA, van Diest PJ, Sinn HP, Geradts J, Diallo R, Poremba C, Herbst H. 2001. Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. J Pathol 195:415-421.

Bonnier P, Romain S, Giacalone PL, Laffargue F, Martin PM, Piana L. 1995. Clinical and biologic prognostic factors in breast cancer diagnosed during postmenopausal hormone replacement therapy. Obstet Gynecol 85:11-17.

Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H. 1991. ERBB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. Oncogene 6:137-143.

Boutros R, Bailey AM, Wilson SH, Byrne JA. 2003. Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins. J Mol Biol 332:675-687.

Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF, Jr. 1988. Menstrual factors and risk of breast cancer. Cancer Invest 6:245-254.

Brown LA, Hoog J, Chin SF, Tao Y, Zayed AA, Chin K, Teschendorff AE, Quackenbush JF, Marioni JC, Leung S, Perou CM, Neilsen TO, Ellis M, Gray JW, Bernard PS, Huntsman DG, Caldas C. 2008. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? Nat Genet 40:806-807; author reply 810-802.

Buerger H, Mommers EC, Littmann R, Simon R, Diallo R, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, van Diest PJ, Boecker W. 2001. Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. J Pathol 194:165-170.

Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, Riethdorf L, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. 1999a. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. J Pathol 187:396-402.

Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schafer KL, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. 1999b. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. J Pathol 189:521-526.

Buerger H, Simon R, Schafer KL, Diallo R, Littmann R, Poremba C, van Diest PJ, Dockhorn-Dworniczak B, Bocker W. 2000. Genetic relation of lobular carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ, and associated invasive carcinoma of the breast. Mol Pathol 53:118-121.

Bundred NJ. 2001. Prognostic and predictive factors in breast cancer. Cancer Treat Rev 27:137-142.

Byrne JA, Balleine RL, Schoenberg Fejzo M, Mercieca J, Chiew YE, Livnat Y, St Heaps L, Peters GB, Byth K, Karlan BY, Slamon DJ, Harnett P, Defazio A. 2005. Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer. Int J Cancer 117:1049-1054.

Byrne JA, Mattei MG, Basset P. 1996. Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52). Genomics 35:523-532.

Byrne JA, Mattei MG, Basset P, Gunning P. 1998a. Identification and in situ hybridization mapping of a mouse Tpd52l1 (D53) orthologue to chromosome 10A4-B2. Cytogenet Cell Genet 81:199-201.

Byrne JA, Nourse CR, Basset P, Gunning P. 1998b. Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. Oncogene 16:873-881.

Byrne JA, Tomasetto C, Garnier JM, Rouyer N, Mattei MG, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. 1995. A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence. Cancer Res 55:2896-2903.

Cao Q, Chen J, Zhu L, Liu Y, Zhou Z, Sha J, Wang S, Li J. 2006. A testis-specific and testis developmentally regulated tumor protein D52 (TPD52)-like protein TPD52L3/hD55 interacts with TPD52 family proteins. Biochem Biophys Res Commun 344:798-806.

Carstens PH, Greenberg RA, Francis D, Lyon H. 1985. Tubular carcinoma of the breast. A long term follow-up. Histopathology 9:271-280.

Carstens PH, Huvos AG, Foote FW, Jr., Ashikari R. 1972. Tubular carcinoma of the breast: a clinicopathologic study of 35 cases. Am J Clin Pathol 58:231-238.

CGHFBC. 1996. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Lancet 347:1713-1727.

Chen SL, Maroulakou IG, Green JE, Romano-Spica V, Modi W, Lautenberger J, Bhat NK. 1996. Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers. Oncogene 12:741-751.

Chen YY, Schnitt SJ. 1998. Prognostic factors for patients with breast cancers 1cm and smaller. Breast Cancer Res Treat 51:209-225.

Cho S, Ko HM, Kim JM, Lee JA, Park JE, Jang MS, Park SG, Lee DH, Ryu SE, Park BC. 2004. Positive regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by hD53L1. J Biol Chem 279:16050-16056.

Choi NW, Howe GR, Miller AB, Matthews V, Morgan RW, Munan L, Burch JD, Feather J, Jain M, Kelly A. 1978. An epidemiologic study of breast cancer. Am J Epidemiol 107:510-521.

Choschzick M, Lassen P, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, Heilenkotter U, Jaenicke F, Bokemeyer C, Izbicki J, Sauter G, Simon R. 2010. Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. Mod Pathol 23:603-610.

Cingoz S, Altungoz O, Canda T, Saydam S, Aksakoglu G, Sakizli M. 2003. DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization and their association with clinicopathologic parameters in breast tumors. Cancer Genet Cytogenet 145:108-114.

Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans E, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y. 2005. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 366:2087-2106.

Clarke MC, R.; Davies, C.; Godwin, J.; Gray, R.; Peto, R. 1998. EBCTCG. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet 1998a; 352 (9132):930-942.

Clarke MC, R.; Davies, C.; Godwin, J.; Gray, R.; Peto, R. 2000. EBCTCG: Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet 2000; 355 (9217):1757-1770.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol 17:2639-2648.

Collins JA, Blake JM, Crosignani PG. 2005. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. Hum Reprod Update 11:545-560.

Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. 1987. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. J Clin Oncol 5:1378-1386.

Cooper CR, Bhatia JK, Muenchen HJ, McLean L, Hayasaka S, Taylor J, Poncza PJ, Pienta KJ. 2002. The regulation of prostate cancer cell adhesion to human bone marrow endothelial cell monolayers by androgen dihydrotestosterone and cytokines. Clin Exp Metastasis 19:25-33.

Cooper HS, Patchefsky AS, Krall RA. 1978. Tubular carcinoma of the breast. Cancer 42:2334-2342.

Corbett IP, Henry JA, Angus B, Watchorn CJ, Wilkinson L, Hennessy C, Gullick WJ, Tuzi NL, May FE, Westley BR, et al. 1990. NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. J Pathol 161:15-25.

Courjal F, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R, Rodriguez C, Theillet C. 1997. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. Cancer Res 57:4360-4367.

Courjal F, Theillet C. 1997. Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. Cancer Res 57:4368-4377.

Cowell JK. 1982. Double minutes and homogeneously staining regions: gene amplification in mammalian cells. Annu Rev Genet 16:21-59.

Cox B, Richardson A, Graham P, Gislefoss RE, Jellum E, Rollag H. 2010. Breast cancer, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus: a nested case-control study. Br J Cancer 102:1665-1669.

Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H, Grenier J, Culine S, Theillet C. 2000. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. Cancer Res 60:1077-1083.

de Bock GH, van der Hage JA, Putter H, Bonnema J, Bartelink H, van de Velde CJ. 2006. Isolated loco-regional recurrence of breast cancer is more common in young patients and following breast conserving therapy: long-term results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer studies. Eur J Cancer 42:351-356.

de la Rochefordiere A, Asselain B, Scholl S, Campana F, Ucla L, Vilcoq JR, Durand JC, Pouillart P, Fourquet A. 1994. Simultaneous bilateral breast carcinomas: a retrospective review of 149 cases. Int J Radiat Oncol Biol Phys 30:35-41.

de Marco MC, Martin-Belmonte F, Kremer L, Albar JP, Correas I, Vaerman JP, Marazuela M, Byrne JA, Alonso MA. 2002. MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells. J Cell Biol 159:37-44.

de Pender AM, Alers JC, Vissers KJ, de Both NJ, Dinjens WN, van Dekken H. 2001. Evaluation of oncogene amplification in intact and truncated cell nuclei of gastro-esophageal cancer cell lines by DNA in situ hybridisation. Acta Histochem 103:127-138.

Del Giudice ME, Fantus IG, Ezzat S, McKeown-Eyssen G, Page D, Goodwin PJ. 1998. Insulin and related factors in premenopausal breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat 47:111-120.

DePrimo SE, Diehn M, Nelson JB, Reiter RE, Matese J, Fero M, Tibshirani R, Brown PO, Brooks JD. 2002. Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. Genome Biol 3:RESEARCH0032.

Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart M, Sotiriou C. 2008. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. Clin Cancer Res 14:5158-5165.

DiCostanzo D, Rosen PP, Gareen I, Franklin S, Lesser M. 1990. Prognosis in infiltrating lobular carcinoma. An analysis of "classical" and variant tumors. Am J Surg Pathol 14:12-23.

Dixon JM, Anderson TJ, Page DL, Lee D, Duffy SW. 1982. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Histopathology 6:149-161.

Dressing GE, Hagan CR, Knutson TP, Daniel AR, Lange CA. 2009. Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. Endocr Relat Cancer 16:351-361.

du Toit RS, Locker AP, Ellis IO, Elston CW, Nicholson RI, Blamey RW. 1989. Invasive lobular carcinomas of the breast--the prognosis of histopathological subtypes. Br J Cancer 60:605-609.

Dubik D, Shiu RP. 1992. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. Oncogene 7:1587-1594.

EBCTCG. 1992. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet 339:1-15.

EBCTCG. 1995. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. N Engl J Med 1995; 333 (22):1444-1455.

EBCTCG. 2006. EBCTCG. Metaanalysis, unpublished. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. 2006. In.

Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. 1992. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. Histopathology 20:479-489.

Elston C.W. EIO, editor. 1998. Classification of malignant breast disease. In: The Breast. Systemic Pathology. , 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Elston CW EI, editor. 1998. The Breast: Systemic pathology 3E. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Elston CW, Ellis IO. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 19:403-410.
Elston CW, Ellis IO. 2002. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. Histopathology 1991; 19; 403-410. Histopathology 41:151-152, discussion 152-153.
Escot C, Theillet C, Lidereau R, Spyratos F, Champeme MH, Gest J, Callahan R. 1986. Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. Proc Natl Acad Sci U S A 83:4834-4838.
Ewertz M, Holmberg L, Tretli S, Pedersen BV, Kristensen A. 2001. Risk factors for male breast cancer--a case-control study from Scandinavia. Acta Oncol 40:467-471.
Fackenthal JD, Marsh DJ, Richardson AL, Cummings SA, Eng C, Robinson BG, Olopade OI. 2001. Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations. J Med Genet 38:159-164.
Farquhar CM, Marjoribanks J, Lethaby A, Lamberts Q, Suckling JA. 2005. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. Cochrane Database Syst Rev:CD004143.
Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61:759-767.
Fechner RE. 1972. Infiltrating lobular carcinoma without lobular carcinoma in situ. Cancer 29:1539-1545.
Fejzo MS, Godfrey T, Chen C, Waldman F, Gray JW. 1998. Molecular cytogenetic analysis of consistent abnormalities at 8q12-q22 in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 22:105-113.
Fentiman IS, Millis RR, Smith P, Ellul JP, Lampejo O. 1997. Mucoid breast carcinomas: histology and prognosis. Br J Cancer 75:1061-1065.
Ferguson RD, Novosyadlyy R, Fierz Y, Alikhani N, Sun H, Yakar S, Leroith D. 2012. Hyperinsulinemia enhances c-Myc-mediated mammary tumor development and advances metastatic progression to the lung in a mouse model of Type 2 Diabetes. Breast Cancer Res 14:R8.
Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. 2002. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. N Engl J Med 347:1233-1241.
Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. 1993. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. Cancer 71:2507-2514.
Fisher ER, Kenny JP, Sass R, Dimitrov NV, Siderits RH, Fisher B. 1990. Medullary cancer of the breast revisited. Breast Cancer Res Treat 16:215-229.
Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ. 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 124:966-978.
Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, Naghavi M. 2011. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. Lancet 378:1461-1484.
Fyles AW, McCready DR, Manchul LA, Trudeau ME, Merante P, Pintilie M, Weir LM, Olivotto IA. 2004. Tamoxifen with or without breast irradiation in women 50 years of age or older with early breast cancer. N Engl J Med 351:963-970.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. 2001. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. J Clin Oncol 19:3817-3827.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ. 1998. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. J Natl Cancer Inst 90:1601-1608.

Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL. 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. Cancer Res 55:5063-5068.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. EMBO J 16:1647-1655.

Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE. 1995. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. Mol Cell Biol 15:1182-1191.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 54:4855-4878.

Greiser CM, Greiser EM, Doren M. 2005. Menopausal hormone therapy and risk of breast cancer: a meta-analysis of epidemiological studies and randomized controlled trials. Hum Reprod Update 11:561-573.

Groblewski GE, Yoshida M, Yao H, Williams JA, Ernst SA. 1999. Immunolocalization of CRHSP28 in exocrine digestive glands and gastrointestinal tissues of the rat. Am J Physiol 276:G219-226.

Gruvberger S, Ringner M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A, Ferno M, Peterson C, Meltzer PS. 2001. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. Cancer Res 61:5979-5984.

Gudmundsdottir K, Ashworth A. 2006. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. Oncogene 25:5864-5874.

Gullick WJ, Love SB, Wright C, Barnes DM, Gusterson B, Harris AL, Altman DG. 1991. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. Br J Cancer 63:434-438.

Hadzisejdic I, Mustac E, Jonjic N, Petkovic M, Grahovac B. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis. Mod Pathol 23:392-403.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 250:1684-1689.

Harris J HS, Henderson IC, Kinne DW, editor. 1991. Breast Diseases
2ed. Philadelphia PA: JB Lippincott Co.

Healey EA, Cook EF, Orav EJ, Schnitt SJ, Connolly JL, Harris JR. 1993. Contralateral breast cancer: clinical characteristics and impact on prognosis. J Clin Oncol 11:1545-1552.

Helmrich SP, Shapiro S, Rosenberg L, Kaufman DW, Slone D, Bain C, Miettinen OS, Stolley PD, Rosenshein NB, Knapp RC, Leavitt T, Jr., Schottenfeld D, Engle RL, Jr., Levy M. 1983. Risk factors for breast cancer. Am J Epidemiol 117:35-45.

Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Bush TL, Longcope C, Gordon GB, Comstock GW. 1994. A prospective study of endogenous hormones and breast cancer. Cancer Detect Prev 18:79-85.

Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. 1991. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. Cancer 68:2142-2149.

Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Janicke F, Sauter G, Simon R. 2007. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. Nat Genet 39:655-660.

Honrado E, Benitez J, Palacios J. 2005. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. Mod Pathol 18:1305-1320.

Hoos A, Stojadinovic A, Singh B, Dudas ME, Leung DH, Shaha AR, Shah JP, Brennan MF, Cordon-Cardo C, Ghossein R. 2002. Clinical significance of molecular expression profiles of Hurthle cell tumors of the thyroid gland analyzed via tissue microarrays. Am J Pathol 160:175-183.

Horn PL, Thompson WD. 1988. Risk of contralateral breast cancer. Associations with histologic, clinical, and therapeutic factors. Cancer 62:412-424.

Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. 1990. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. Int J Cancer 46:796-800.

Hughes KS, Schnaper LA, Berry D, Cirrincione C, McCormick B, Shank B, Wheeler J, Champion LA, Smith TJ, Smith BL, Shapiro C, Muss HB, Winer E, Hudis C, Wood W, Sugarbaker D, Henderson IC, Norton L. 2004. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women 70 years of age or older with early breast cancer. N Engl J Med 351:971-977.

Hullinger TG, McCauley LK, DeJoode ML, Somerman MJ. 1998. Effect of bone proteins on human prostate cancer cell lines in vitro. Prostate 36:14-22.

Ip M, Milholland RJ, Rosen F, Kim U. 1979. Mammary cancer: selective action of the estrogen receptor complex. Science 203:361-363.

Isaacs C, Stearns V, Hayes DF. 2001. New prognostic factors for breast cancer recurrence. Semin Oncol 28:53-67.

Iwamoto T, Bianchini G, Booser D, Qi Y, Coutant C, Shiang CY, Santarpia L, Matsuoka J, Hortobagyi GN, Symmans WF, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Hellerstedt B, Pippen J, Andre F, Simon R, Pusztai L. 2011. Gene pathways associated with prognosis and chemotherapy sensitivity in molecular subtypes of breast cancer. J Natl Cancer Inst 103:264-272.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 61:69-90.

Jensen ML, Kiaer H, Andersen J, Jensen V, Melsen F. 1997. Prognostic comparison of three classifications for medullary carcinomas of the breast. Histopathology 30:523-532.

Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkio S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jaaskelainen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J. 2006. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. N Engl J Med 354:809-820.

Johnson KC, Miller AB, Collishaw NE, Palmer JR, Hammond SK, Salmon AG, Cantor KP, Miller MD, Boyd NF, Millar J, Turcotte F. 2011. Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). Tob Control 20:e2.

Kaaks R. 1996. Nutrition, hormones, and breast cancer: is insulin the missing link? Cancer Causes Control 7:605-625.

Kaaks R, Lundin E, Rinaldi S, Manjer J, Biessy C, Soderberg S, Lenner P, Janzon L, Riboli E, Berglund G, Hallmans G. 2002. Prospective study of IGF-I, IGF-binding proteins, and breast cancer risk, in northern and southern Sweden. Cancer Causes Control 13:307-316.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW, Waldman FM. 1994. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 91:2156-2160.

Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, Koivula T, Helin HH, Isola JJ. 1991. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. Int J Cancer 49:650-655.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW. 1992. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 89:5321-5325.

Kampert JB, Whittemore AS, Paffenbarger RS, Jr. 1988. Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. Am J Epidemiol 128:962-979.

Kanda T, Otter M, Wahl GM. 2001. Mitotic segregation of viral and cellular acentric extrachromosomal molecules by chromosome tethering. J Cell Sci 114:49-58.

Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ, Berthois Y. 1987. Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. Cancer Res 47:4355-4360.

Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, Valero V, Gianni L, Eiermann W, Howell A, Costa SD, Beuzeboc P, Untch M, Blohmer JU, Sinn HP, Sittek R, Souchon R, Tulusan AH, Volm T, Senn HJ. 2003. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. J Clin Oncol 21:2600-2608.

Kelemen PR, Yaremko ML, Kim AH, Montag A, Michelassi F, Westbrook CA. 1994. Loss of heterozygosity in 8p is associated with microinvasion in colorectal carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 11:195-198.

Kelsey JL, Gammon MD, John EM. 1993. Reproductive factors and breast cancer. Epidemiol Rev 15:36-47.

Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. J Natl Cancer Inst 94:606-616.

Key TJ. 1999. Serum oestradiol and breast cancer risk. Endocr Relat Cancer 6:175-180.

Key TJ, Pike MC. 1988. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol 24:29-43.

Knudson AG, Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A 68:820-823.

Komaki K, Sakamoto G, Sugano H, Morimoto T, Monden Y. 1988. Mucinous carcinoma of the breast in Japan. A prognostic analysis based on morphologic features. Cancer 61:989-996.

Kurose K, Hoshaw-Woodard S, Adeyinka A, Lemeshow S, Watson PH, Eng C. 2001. Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. Hum Mol Genet 10:1907-1913.

Kvale G, Heuch I. 1988. Menstrual factors and breast cancer risk. Cancer 62:1625-1631.

La Vecchia C, Altieri A, Franceschi S, Tavani A. 2001. Oral contraceptives and cancer: an update. Drug Saf 24:741-754.
Largo C, Alvarez S, Saez B, Blesa D, Martin-Subero JI, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA, Dopazo J, Siebert R, Calasanz MJ, Cigudosa JC. 2006. Identification of overexpressed genes in frequently gained/amplified chromosome regions in multiple myeloma. Haematologica 91:184-191.
Larson PS, de las Morenas A, Cupples LA, Huang K, Rosenberg CL. 1998. Genetically abnormal clones in histologically normal breast tissue. Am J Pathol 152:1591-1598.
Le Gal M, Ollivier L, Asselain B, Meunier M, Laurent M, Vielh P, Neuenschwander S. 1992. Mammographic features of 455 invasive lobular carcinomas. Radiology 185:705-708.
Lee AK, Loda M, Mackarem G, Bosari S, DeLellis RA, Heatley GJ, Hughes K. 1997. Lymph node negative invasive breast carcinoma 1 centimeter or less in size (T1a,bNOMO): clinicopathologic features and outcome. Cancer 79:761-771.
Lee SA, Ross RK, Pike MC. 2005. An overview of menopausal oestrogen-progestin hormone therapy and breast cancer risk. Br J Cancer 92:2049-2058.
Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ, Hutter RV. 1995. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). Cancer 76:2266-2274.
Lesser ML, Rosen PP, Kinne DW. 1982. Multicentricity and bilaterality in invasive breast carcinoma. Surgery 91:234-240.
Levan G, Mandahl N, Bregula U, Klein G, Levan A. 1976. Double minute chromosomes are not centromeric regions of the host chromosomes. Hereditas 83:83-90.
Lewis JD, Payton LA, Whitford JG, Byrne JA, Smith DI, Yang L, Bright RK. 2007. Induction of tumorigenesis and metastasis by the murine orthologue of tumor protein D52. Mol Cancer Res 5:133-144.
Lewis JD, Sullivan LA, Byrne JA, de Riese W, Bright RK. 2009. Memory and cellular immunity induced by a DNA vaccine encoding self antigen TPD52 administered with soluble GM-CSF. Cancer Immunol Immunother 58:1337-1349.
Li CI, Anderson BO, Porter P, Holt SK, Daling JR, Moe RE. 2000a. Changing incidence rate of invasive lobular breast carcinoma among older women. Cancer 88:2561-2569.
Li CI, Weiss NS, Stanford JL, Daling JR. 2000b. Hormone replacement therapy in relation to risk of lobular and ductal breast carcinoma in middle-aged women. Cancer 88:2570-2577.
Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S. 2007. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: identification of genetic indicators that predict patient outcome. Cancer Sci 98:392-400.
Low SH, Li X, Miura M, Kudo N, Quinones B, Weimbs T. 2003. Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. Dev Cell 4:753-759.
M Clarke RC, S Darby, C Davies, V Evans, J Godwin, R Gray, P McGale, R Peto, and Y Wang. 2005. EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Lancet 2005; 365(9472):1687-1717.
Machado I, Lopez-Guerrero JA, Calabuig-Farinas S, Hardy JR, Scotlandi K, Picci P, Byrne JA, Llombart-Bosch A. 2011. Clinical significance of tumor protein D52 immu-

nostaining in a large series of Ewing's sarcoma family of tumors. Pediatr Dev Pathol 14:255-256.
Maier WP, Rosemond GP, Goldman LI, Kaplan GF, Tyson RR. 1977. A ten year study of medullary carcinoma of the breast. Surg Gynecol Obstet 144:695-698.
Malek RL, Irby RB, Guo QM, Lee K, Wong S, He M, Tsai J, Frank B, Liu ET, Quackenbush J, Jove R, Yeatman TJ, Lee NH. 2002. Identification of Src transformation fingerprint in human colon cancer. Oncogene 21:7256-7265.
Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. 1994. Prognostic factors in early breast carcinoma. Cancer 74:381-400.
Martin LJ, Boyd NF. 2008. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. Breast Cancer Res 10:201.
Martinez V, Azzopardi JG. 1979. Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. Histopathology 3:467-488.
Masala G, Assedi M, Bendinelli B, Ermini I, Sieri S, Grioni S, Sacerdote C, Ricceri F, Panico S, Mattiello A, Tumino R, Giurdanella MC, Berrino F, Saieva C, Palli D. 2012. Fruit and vegetables consumption and breast cancer risk: the EPIC Italy study. Breast Cancer Res Treat.
Matkovic B, Juretic A, Separovic V, Novosel I, Separovic R, Gamulin M, Kruslin B. 2008. Immunohistochemical analysis of ER, PR, HER-2, CK 5/6, p63 and EGFR antigen expression in medullary breast cancer. Tumori 94:838-844.
McDivitt RW, Boyce W, Gersell D. 1982. Tubular carcinoma of the breast. Clinical and pathological observations concerning 135 cases. Am J Surg Pathol 6:401-411.
McGuire WL, Clark GM. 1992. Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. N Engl J Med 326:1756-1761.
Melchor L, Alvarez S, Honrado E, Palacios J, Barroso A, Diez O, Osorio A, Benitez J. 2005. The accumulation of specific amplifications characterizes two different genomic pathways of evolution of familial breast tumors. Clin Cancer Res 11:8577-8584.
Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science 266:66-71.
Mirshahidi S, Kramer VG, Whitney JB, Essono S, Lee S, Dranoff G, Anderson KS, Ruprecht RM. 2009. Overlapping synthetic peptides encoding TPD52 as breast cancer vaccine in mice: prolonged survival. Vaccine 27:1825-1833.
Moinfar F, Man YG, Arnould L, Bratthauer GL, Ratschek M, Tavassoli FA. 2000. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. Cancer Res 60:2562-2566.
Moore OS, Jr., Foote FW, Jr. 1949. The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. Cancer 2:635-642.
Narayanan R, Edwards DP, Weigel NL. 2005. Human progesterone receptor displays cell cycle-dependent changes in transcriptional activity. Mol Cell Biol 25:2885-2898.
Narod SA, Foulkes WD. 2004. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer 4:665-676.
Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, Hood L, Lin B. 2002. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 99:11890-11895.
Nguyen Huu NS, Ryder WD, Zeps N, Flasza M, Chiu M, Hanby AM, Poulsom R, Clarke RB, Baron M. 2008. Tumour-promoting activity of altered WWP1 expression in breast cancer and its utility as a prognostic indicator. J Pathol 216:93-102.

Niu N, Qin Y, Fridley BL, Hou J, Kalari KR, Zhu M, Wu TY, Jenkins GD, Batzler A, Wang L. 2010. Radiation pharmacogenomics: a genome-wide association approach to identify radiation response biomarkers using human lymphoblastoid cell lines. Genome Res 20:1482-1492.

Nixon AJ, Schnitt SJ, Gelman R, Gage I, Bornstein B, Hetelekidis S, Recht A, Silver B, Harris JR, Connolly JL. 1996. Relationship of tumor grade to other pathologic features and to treatment outcome of patients with early stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy. Cancer 78:1426-1431.

Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jager P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G. 2001. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. J Pathol 194:349-357.

Norris HJ, Taylor HB. 1965. Prognosis of Mucinous (Gelatinous) Carcinoma of the Breast. Cancer 18:879-885.

Nourse CR, Mattei MG, Gunning P, Byrne JA. 1998. Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. Biochim Biophys Acta 1443:155-168.

O'Connor IF, Shembekar MV, Shousha S. 1998. Breast carcinoma developing in patients on hormone replacement therapy: a histological and immunohistological study. J Clin Pathol 51:935-938.

O'Higgins N, Linos DA, Blichert-Toft M, Cataliotti L, de Wolf C, Rochard F, Rutgers EJ, Roberts P, Mattheiem W, da Silva MA, Holmberg L, Schulz KD, Smola MG, Mansel RE. 1998. European guidelines for quality assurance in the surgical management of mammographically detected lesions. Eur J Surg Oncol 24:96-98.

Oberman HA, Fidler WJ, Jr. 1979. Tubular carcinoma of the breast. Am J Surg Pathol 3:387-395.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J 19:3159-3167.

Osborne CK. 1998. Steroid hormone receptors in breast cancer management. Breast Cancer Res Treat 51:227-238.

Paffenbarger RS, Jr., Kampert JB, Chang HG. 1980. Characteristics that predict risk of breast cancer before and after the menopause. Am J Epidemiol 112:258-268.

Page DL, Dixon JM, Anderson TJ, Lee D, Stewart HJ. 1983. Invasive cribriform carcinoma of the breast. Histopathology 7:525-536.

Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, Schlessinger J, Lippman ME, King CR. 1990. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. J Clin Oncol 8:103-112.

Park SK, Yoo KY, Lee SJ, Kim SU, Ahn SH, Noh DY, Choe KJ, Strickland PT, Hirvonen A, Kang D. 2000. Alcohol consumption, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. Pharmacogenetics 10:301-309.

Park SY, Kolonel LN, Henderson BE, Wilkens LR. 2011. Dietary Fat and Breast Cancer in Postmenopausal Women According to Ethnicity and Hormone Receptor Status: The Multiethnic Cohort Study. Cancer Prev Res (Phila).

Parker RG, Grimm P, Enstrom JE. 1989. Contralateral breast cancers following treatment for initial breast cancers in women. Am J Clin Oncol 12:213-216.

Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AH, Lees AW, Jamil N, Hanson J, Jenkins H, Krause BE, McBlain WA, et al. 1991. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. Cancer Res 51:556-567.

Payton LA, Lewis JD, Byrne JA, Bright RK. 2008. Vaccination with metastasis-related tumor associated antigen TPD52 and CpG/ODN induces protective tumor immunity. Cancer Immunol Immunother 57:799-811.

Pedersen L, Zedeler K, Holck S, Schiodt T, Mouridsen HT. 1995. Medullary carcinoma of the breast. Prevalence and prognostic importance of classical risk factors in breast cancer. Eur J Cancer 31A:2289-2295.

Peiro G, Bornstein BA, Connolly JL, Gelman R, Hetelekidis S, Nixon AJ, Recht A, Silver B, Harris JR, Schnitt SJ. 2000. The influence of infiltrating lobular carcinoma on the outcome of patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. Breast Cancer Res Treat 59:49-54.

Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO. 1995. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. Histopathology 27:219-226.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 406:747-752.

Peters GN, Wolff M, Haagensen CD. 1981. Tubular carcinoma of the breast. Clinical pathologic correlations based on 100 cases. Ann Surg 193:138-149.

Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR. 1999. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. J Natl Cancer Inst 91:943-949.

Peto R. 2006. Highlights from the 2005/6 EBCTCG worldwide overview of every women in all the trials in early breast cancer. 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium 2006; Abstract book # 40.

Pettersson K, Gustafsson JA. 2001. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. Annu Rev Physiol 63:165-192.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD. 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 353:1659-1672.

Pike MC, Spicer DV, Dahmoush L, Press MF. 1993. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. Epidemiol Rev 15:17-35.

Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. 2002. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 99:12963-12968.

Ponder BAJD, N.E.; Easton, D.F.; Pharoah, P.D.P. 2000. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. Br J Cancer 83:1301-1308.

Prall OW, Rogan EM, Musgrove EA, Watts CK, Sutherland RL. 1998a. c-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry. Mol Cell Biol 18:4499-4508.

Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL. 1998b. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol 65:169-174.

Proux-Gillardeaux V, Galli T, Callebaut I, Mikhailik A, Calothy G, Marx M. 2003. D53 is a novel endosomal SNARE-binding protein that enhances interaction of syntaxin 1 with the synaptobrevin 2 complex in vitro. Biochem J 370:213-221.

Rachez C, Freedman LP. 2001. Mediator complexes and transcription. Curr Opin Cell Biol 13:274-280.

Rahman N, Scott RH. 2007. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. Hum Mol Genet 16 Spec No 1:R60-66.

Rapin V, Contesso G, Mouriesse H, Bertin F, Lacombe MJ, Piekarski JD, Travagli JP, Gadenne C, Friedman S. 1988. Medullary breast carcinoma. A reevaluation of 95 cases of breast cancer with inflammatory stroma. Cancer 61:2503-2510.

Rasmussen BB, Rose C, Thorpe SM, Andersen KW, Hou-Jensen K. 1985. Argyrophilic cells in 202 human mucinous breast carcinomas. Relation to histopathologic and clinical factors. Am J Clin Pathol 84:737-740.

Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Pugh RP, Carter RD, Rivkin SE, Borst JR, Belt RJ, et al. 1992. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol 10:1284-1291.

Recht A, Edge SB, Solin LJ, Robinson DS, Estabrook A, Fine RE, Fleming GF, Formenti S, Hudis C, Kirshner JJ, Krause DA, Kuske RR, Langer AS, Sledge GW, Jr., Whelan TJ, Pfister DG. 2001. Postmastectomy radiotherapy: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 19:1539-1569.

Reinfuss M, Stelmach A, Mitus J, Rys J, Duda K. 1995. Typical medullary carcinoma of the breast: a clinical and pathological analysis of 52 cases. J Surg Oncol 60:89-94.

Reis-Filho JS, Drury S, Lambros MB, Marchio C, Johnson N, Natrajan R, Salter J, Levey P, Fletcher O, Peto J, Ashworth A, Dowsett M. 2008. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? Nat Genet 40:809-810; author reply 810-802.

Reis-Filho JS, Weigelt B, Fumagalli D, Sotiriou C. 2010. Molecular profiling: moving away from tumor philately. Sci Transl Med 2:47ps43.

Reyal F, van Vliet MH, Armstrong NJ, Horlings HM, de Visser KE, Kok M, Teschendorff AE, Mook S, van 't Veer L, Caldas C, Salmon RJ, van de Vijver MJ, Wessels LF. 2008. A comprehensive analysis of prognostic signatures reveals the high predictive capacity of the proliferation, immune response and RNA splicing modules in breast cancer. Breast Cancer Res 10:R93.

Richardson WW. 1956. Medullary carcinoma of the breast; a distinctive tumour type with a relatively good prognosis following radical mastectomy. Br J Cancer 10:415-423.

Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Mike V. 1977. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. Cancer 40:1365-1385.

Ried T, Knutzen R, Steinbeck R, Blegen H, Schrock E, Heselmeyer K, du Manoir S, Auer G. 1996. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. Genes Chromosomes Cancer 15:234-245.

Riede UN,Werner M, Schäfer HE. 2004. Allgemeine und spezielle Pathologie 5. Auflage: Georg Thieme Verlag.

Robert Koch-Institut die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV, editor. 2010. Krebs in Deutschland 2005 – 2006. Häufigkeiten und Trends, 7 Auflage. Berlin.

Rodriguez V, Chen Y, Elkahloun A, Dutra A, Pak E, Chandrasekharappa S. 2007. Chromosome 8 BAC array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 46:694-707.

Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 234:364-368.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. 2005. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 353:1673-1684.

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. 1993. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. J Clin Oncol 11:2090-2100.

Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. 1989. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. J Clin Oncol 7:1239-1251.

Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, Jr., Weathers E, DePalo A. 1981. Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. Ann Surg 193:15-25.

Rosenberg CR, Pasternack BS, Shore RE, Koenig KL, Toniolo PG. 1994. Premenopausal estradiol levels and the risk of breast cancer: a new method of controlling for day of the menstrual cycle. Am J Epidemiol 140:518-525.

Roses DF, Bell DA, Flotte TJ, Taylor R, Ratech H, Dubin N. 1982. Pathologic predictors of recurrence in stage 1 (TINOMO) breast cancer. Am J Clin Pathol 78:817-820.

Ross DT, Perou CM. 2001. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. Dis Markers 17:99-109.

Rubin MA, Varambally S, Beroukhim R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, Hofer MD, Storz-Schweizer M, Kuefer R, Fletcher JA, Hsi BL, Byrne JA, Pienta KJ, Collins C, Sellers WR, Chinnaiyan AM. 2004. Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. Cancer Res 64:3814-3822.

Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G. 2006. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. Int J Cancer 118:2190-2194.

Rummukainen JK, Salminen T, Lundin J, Joensuu H, Isola JJ. 2001. Amplification of c-myc oncogene by chromogenic and fluorescence in situ hybridization in archival breast cancer tissue array samples. Lab Invest 81:1545-1551.

Russo J, Russo IH. 2004. Genotoxicity of steroidal estrogens. Trends Endocrinol Metab 15:211-214.

Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstrom PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R. 2005. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. Cancer Res 65:2554-2559.

Sapino A, Righi L, Cassoni P, Papotti M, Gugliotta P, Bussolati G. 2001. Expression of apocrine differentiation markers in neuroendocrine breast carcinomas of aged women. Mod Pathol 14:768-776.

Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, Durand JC, Fourquet A, Pouillart P. 1996. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clini-

copathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. Cancer 77:113-120.
Scopsi L, Andreola S, Pilotti S, Bufalino R, Baldini MT, Testori A, Rilke F. 1994. Mucinous carcinoma of the breast. A clinicopathologic, histochemical, and immunocytochemical study with special reference to neuroendocrine differentiation. Am J Surg Pathol 18:702-711.
Scopsi L, Andreola S, Saccozzi R, Pilotti S, Boracchi P, Rosa P, Conti AR, Manzari A, Huttner WB, Rilke F. 1991. Argyrophilic carcinoma of the male breast. A neuroendocrine tumor containing predominantly chromogranin B (secretogranin I). Am J Surg Pathol 15:1063-1071.
Secreto G, Zumoff B. 1994. Abnormal production of androgens in women with breast cancer. Anticancer Res 14:2113-2117.
Shafiq J, Delaney G, Barton MB. 2007. An evidence-based estimation of local control and survival benefit of radiotherapy for breast cancer. Radiother Oncol 84:11-17.
Shah NR, Borenstein J, Dubois RW. 2005. Postmenopausal hormone therapy and breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Menopause 12:668-678.
Shehata M, Bieche I, Boutros R, Weidenhofer J, Fanayan S, Spalding L, Zeps N, Byth K, Bright RK, Lidereau R, Byrne JA. 2008. Nonredundant functions for tumor protein D52-like proteins support specific targeting of TPD52. Clin Cancer Res 14:5050-5060.
Shenkier T, Weir L, Levine M, Olivotto I, Whelan T, Reyno L. 2004. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 15. Treatment for women with stage III or locally advanced breast cancer. CMAJ 170:983-994.
Silverstein MJ, Lewinsky BS, Waisman JR, Gierson ED, Colburn WJ, Senofsky GM, Gamagami P. 1994. Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? Cancer 73:1673-1677.
Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. 2002. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. J Clin Oncol 20:3628-3636.
Skotheim RI, Autio R, Lind GE, Kraggerud SM, Andrews PW, Monni O, Kallioniemi O, Lothe RA. 2006. Novel genomic aberrations in testicular germ cell tumors by array-CGH, and associated gene expression changes. Cell Oncol 28:315-326.
Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. 1987. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235:177-182.
Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 244:707-712.
Slamon DJ, Romond EH, Perez EA. 2006. Advances in adjuvant therapy for breast cancer. Clin Adv Hematol Oncol 4:suppl 1, 4-9; discussion suppl 10; quiz 12 p following suppl 10.
Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, Miller AB, Potter JD, Speizer FE, Willett WC, Wolk A, Hunter DJ. 1998. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. JAMA 279:535-540.
Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A, Symmans WF, Pusztai L, Nolden LK, Horlings H, Berns K, Hung MC, van de Vijver MJ, Valero V, Gray JW, Bernards R, Mills GB, Hennessy

BT. 2008. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. Cancer Res 68:6084-6091.
Stevenson JC, Hodis HN, Pickar JH, Lobo RA. 2011. HRT and breast cancer risk: a realistic perspective. Climacteric 14:633-636.
Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tuchler H. 1993. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. Ann Surg 218:13-21.
Storlazzi CT, Lonoce A, Guastadisegni MC, Trombetta D, D'Addabbo P, Daniele G, L'Abbate A, Macchia G, Surace C, Kok K, Ullmann R, Purgato S, Palumbo O, Carella M, Ambros PF, Rocchi M. 2010. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: Origin and structure. Genome Res.
Sunderland MC, Osborne CK. 1991. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. J Clin Oncol 9:1283-1297.
Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. 1989. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. J Clin Oncol 7:1120-1128.
Tavassoli F.A. DP, editor. 2003. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs Lyon: IARC Press.
Teixeira MR, Pandis N, Heim S. 2002. Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. Genes Chromosomes Cancer 33:1-16.
Thomas DD, Frey CL, Messenger SW, August BK, Groblewski GE. 2010a. A role for tumor protein TPD52 phosphorylation in endo-membrane trafficking during cytokinesis. Biochem Biophys Res Commun 402:583-587.
Thomas DD, Kaspar KM, Taft WB, Weng N, Rodenkirch LA, Groblewski GE. 2002. Identification of annexin VI as a Ca2+-sensitive CRHSP-28-binding protein in pancreatic acinar cells. J Biol Chem 277:35496-35502.
Thomas DD, Martin CL, Weng N, Byrne JA, Groblewski GE. 2010b. Tumor protein D52 expression and Ca2+-dependent phosphorylation modulates lysosomal membrane protein trafficking to the plasma membrane. Am J Physiol Cell Physiol 298:C725-739.
Thomas DD, Taft WB, Kaspar KM, Groblewski GE. 2001. CRHSP-28 regulates Ca(2+)-stimulated secretion in permeabilized acinar cells. J Biol Chem 276:28866-28872.
Thomas DD, Weng N, Groblewski GE. 2004. Secretagogue-induced translocation of CRHSP-28 within an early apical endosomal compartment in acinar cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287:G253-263.
Thomas HV, Key TJ, Allen DS, Moore JW, Dowsett M, Fentiman IS, Wang DY. 1997. A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer risk in premenopausal women on the island of Guernsey. Br J Cancer 75:1075-1079.
Tiacci E, Orvietani PL, Bigerna B, Pucciarini A, Corthals GL, Pettirossi V, Martelli MP, Liso A, Benedetti R, Pacini R, Bolli N, Pileri S, Pulford K, Gambacorta M, Carbone A, Pasquarello C, Scherl A, Robertson H, Sciurpi MT, Alunni-Bistocchi G, Binaglia L, Byrne JA, Falini B. 2005. Tumor protein D52 (TPD52): a novel B-cell/plasma-cell molecule with unique expression pattern and Ca(2+)-dependent association with annexin VI. Blood 105:2812-2820.
Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. 1998. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. Genes Chromosomes Cancer 21:177-184.
Toikkanen S, Kujari H. 1989. Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long-term follow-up. Hum Pathol 20:758-764.

Toikkanen S, Pylkkanen L, Joensuu H. 1997. Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. Br J Cancer 76:1234-1240.

Tomita S, Zhang Z, Nakano M, Ibusuki M, Kawazoe T, Yamamoto Y, Iwase H. 2009. Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients. Cancer Sci 100:1012-1017.

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. 2001. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. Am J Pathol 159:2249-2256.

Travis RC, Key TJ. 2003. Oestrogen exposure and breast cancer risk. Breast Cancer Res 5:239-247.

Truong PT, Olivotto IA, Whelan TJ, Levine M. 2004. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 16. Locoregional post-mastectomy radiotherapy. CMAJ 170:1263-1273.

Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Yamamoto H, Miyajima N, Toyoshima K, Yamamoto T, Yokota J, et al. 1989. Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int-2 and c-erbB-2/ear-1. Cancer Res 49:3104-3108.

Turner N, Tutt A, Ashworth A. 2004. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. Nat Rev Cancer 4:814-819.

Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. Mol Cell Biol 16:5276-5287.

Ummanni R, Teller S, Junker H, Zimmermann U, Venz S, Scharf C, Giebel J, Walther R. 2008. Altered expression of tumor protein D52 regulates apoptosis and migration of prostate cancer cells. FEBS J 275:5703-5713.

Vainio HBF, editor. 2002. International Agency for Research on Cancer (2002). IARC Handbooks of Cancer Prevention Vol.6: Weight Control and Physical Activity. . Lyon: IARC Press.

Van de Steene J, Soete G, Storme G. 2000. Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: the missing link. Radiother Oncol 55:263-272.

Van de Steene J, Vinh-Hung V, Cutuli B, Storme G. 2004. Adjuvant radiotherapy for breast cancer: effects of longer follow-up. Radiother Oncol 72:35-43.

van de Vijver M, van de Bersselaar R, Devilee P, Cornelisse C, Peterse J, Nusse R. 1987. Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammmary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. Mol Cell Biol 7:2019-2023.

van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, Nusse R. 1988. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. N Engl J Med 319:1239-1245.

Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ. 1987. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. Lancet 2:69-72.

Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. 2002. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. N Engl J Med 347:1227-1232.

Vincent-Salomon A, Raynal V, Lucchesi C, Gruel N, Delattre O. 2008. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? Nat Genet 40:809; author reply 810-802.

Vinh-Hung V, Verschraegen C. 2004. Breast-conserving surgery with or without radiotherapy: pooled-analysis for risks of ipsilateral breast tumor recurrence and mortality. J Natl Cancer Inst 96:115-121.

Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. The multistep nature of cancer. Trends Genet 9:138-141.

Wald NJ, Murphy P, Major P, Parkes C, Townsend J, Frost C. 1995. UKCCCR multicentre randomised controlled trial of one and two view mammography in breast cancer screening. BMJ 311:1189-1193.

Walker K, Bratton DJ, Frost C. 2011. Premenopausal endogenous oestrogen levels and breast cancer risk: a meta-analysis. Br J Cancer 105:1451-1457.

Wang R, Xu J, Saramaki O, Visakorpi T, Sutherland WM, Zhou J, Sen B, Lim SD, Mabjeesh N, Amin M, Dong JT, Petros JA, Nelson PS, Marshall FF, Zhau HE, Chung LW. 2004. PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. Cancer Res 64:1589-1594.

Wargotz ES, Silverberg SG. 1988. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with appraisal of current diagnostic criteria. Hum Pathol 19:1340-1346.

Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, Harlow SP, O'Connell M. 2000. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma: a multicenter study. Cancer 88:1099-1107.

Wells CA, McGregor IL, Makunura CN, Yeomans P, Davies JD. 1995. Apocrine adenosis: a precursor of aggressive breast cancer? J Clin Pathol 48:737-742.

Whelan T DS, Taylor C, McGale P, Ewertz M. 2007. Overviews of randomized trials of radiotherapy in early breast cancer.: 43rd Annual Meeting ASCO 2007, ASCO Annual Meeting Educational Book.

Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schutz F, Goldstein DR, Piccart M, Delorenzi M. 2008. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. Breast Cancer Res 10:R65.

Wohlfahrt J, Melbye M. 2001. Age at any birth is associated with breast cancer risk. Epidemiology 12:68-73.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 378:789-792.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al. 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science 265:2088-2090.

Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, Gaudet M, Schmidt MK, Broeks A, Cox A, Fasching PA, Hein R, Spurdle AB, Blows F, Driver K, Flesch-Janys D, Heinz J, Sinn P, Vrieling A, Heikkinen T, Aittomaki K, Heikkila P, Blomqvist C, Lissowska J, Peplonska B, Chanock S, Figueroa J, Brinton L, Hall P, Czene K, Humphreys K, Darabi H, Liu J, Van 't Veer LJ, van Leeuwen FE, Andrulis IL, Glendon G, Knight JA, Mulligan AM, O'Malley FP, Weerasooriya N, John EM, Beckmann MW, Hartmann A, Weihbrecht SB, Wachter DL, Jud SM, Loehberg CR, Baglietto L, English DR, Giles GG, McLean CA, Severi G, Lambrechts D, Vandorpe T, Weltens C, Paridaens R, Smeets A, Neven P, Wildiers H, Wang X, Olson JE, Cafourek V, Fredericksen Z, Kosel M, Vachon C, Cramp HE, Connley D, Cross SS,

Balasubramanian SP, Reed MW, Dork T, Bremer M, Meyer A, Karstens JH, Ay A, Park-Simon TW, Hillemanns P, Arias Perez JI, Menendez Rodriguez P, Zamora P, Benitez J, Ko YD, Fischer HP, Hamann U, Pesch B, Bruning T, Justenhoven C, Brauch H, Eccles DM, Tapper WJ, Gerty SM, Sawyer EJ, Tomlinson IP, Jones A, Kerin M, Miller N, McInerney N, Anton-Culver H, Ziogas A, Shen CY, Hsiung CN, Wu PE, Yang SL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Haiman CA, Henderson BE, Le Marchand L, Kolonel LN, Lindblom A, Margolin S, Jakubowska A, Lubinski J, Huzarski T, Byrski T, Gorski B, Gronwald J, Hooning MJ, Hollestelle A, van den Ouweland AM, Jager A, Kriege M, Tilanus-Linthorst MM, Collee M, Wang-Gohrke S, Pylkas K, Jukkola-Vuorinen A, Mononen K, Grip M, Hirvikoski P, Winqvist R, Mannermaa A, Kosma VM, Kauppinen J, Kataja V, Auvinen P, Soini Y, Sironen R, Bojesen SE, Orsted DD, Kaur-Knudsen D, Flyger H, Nordestgaard BG, Holland H, Chenevix-Trench G, Manoukian S, Barile M, Radice P, Hankinson SE, Hunter DJ, Tamimi R, Sangrajrang S, Brennan P, McKay J, Odefrey F, Gaborieau V, Devilee P, Huijts PE, Tollenaar RA, Seynaeve C, Dite GS, Apicella C, Hopper JL, Hammet F, Tsimiklis H, Smith LD, Southey MC, Humphreys MK, Easton D, Pharoah P, Sherman ME, Garcia-Closas M. 2011. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. J Natl Cancer Inst 103:250-263.

Yildirim-Assaf S, Coumbos A, Hopfenmuller W, Foss HD, Stein H, Kuhn W. 2007. The prognostic significance of determining DNA content in breast cancer by DNA image cytometry: the role of high grade aneuploidy in node negative breast cancer. J Clin Pathol 60:649-655.

Yu L, Shi QG, Qian XL, Li SH, Wang HT, Wang LL, Zhou JG. 2010. [PC-1 enhances c-myc gene expression in prostate cancer cells]. Yi Chuan 32:348-352.

Zhang D, He D, Xue Y, Wang R, Wu K, Xie H, Zeng J, Wang X, Zhau HE, Chung LW, Chang LS, Li L. 2011. PrLZ protects prostate cancer cells from apoptosis induced by androgen deprivation via the activation of Stat3/Bcl-2 pathway. Cancer Res 71:2193-2202.

Zhou P, Recht A. 2004. Young age and outcome for women with early-stage invasive breast carcinoma. Cancer 101:1264-1274.

Zhu H, Lam DC, Han KC, Tin VP, Suen WS, Wang E, Lam WK, Cai WW, Chung LP, Wong MP. 2007. High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumour genes in lung cancer cell lines. Cancer Lett 245:303-314.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Breast Prognosis TMA.....31
Tabelle 2: TPD52-Amplifikation und klinisch-pathologische Parameter invasiver Mammakarzinome 42
Tabelle 3: Korrelation von TPD52-Amplifikation mit anderen molekularen Parametern.....43
Tabelle 4: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens in Mammakarzinomen bezügliche des T Stadiums, Nodal Status, Gradings und des TPD52-Amplifikationsstatus 46

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der TPD52-Kopiezahl in 315 Mammakarzinomen mit TPD52-Gains und -Amplifikationen gemäß den vordefinierten Kriterien 40
Abbildung 2: Beispiele von Mammakarzinomen mit (a) und ohne (b) TPD52-Amplifikation: Die roten Signale geben die Kopiezahl von Chromosom 8 an, die grünen Signale zeigen die Kopiezahl des TPD52-Gens. FISH-Analyse, 630fache Vergrößerung. ((a)Slide F, Block A, Feld 7d; (b) Slide A, Block A, Feld 2i) 41
Abbildung 3: Anteil der Mamakarzinome, bei denen mindestens eines der Gene HER2, cMYC oder MDM2 amplifiziert ist, bei gleichzeitigem Vorhandensein von TPD52-Amplifikation oder Gains 44
Abbildung 4: Zusammenhang zwischen Ki67 Färbeindex und TPD52-Zugewinnen in Mammakarzinomen 44
Abbildung 5: Einfluss der TPD52 Amplifikation auf das Überleben der Patientinnen.....45

9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med. Guido Sauter, PD Dr. rer. nat. Ronald Simon, Dr. rer. nat. Frederik Holst, Dipl. Biol. Antje Krohn, Dipl. Ing. Lia Burkhardt und Dr. rer. nat Pierre Tennstedt für die Betreuung und Hilfsbereitschaft während meiner Doktorarbeit bedanken. Ich bin bei allen Fragen und Anliegen auf offene Ohren gestoßen. Diese Arbeit möchte ich meiner Familie widmen.

10 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: …….