

# **Expression von Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\gamma$ im BRCA1- und BRCA2-assoziierten Mammakarzinom**

**EINE HISTOLOGISCHE UND IMMUNOHISTOCHEMISCHE STUDIE ZUM  
ERBLICHEN BRUSTKREBS**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von: H el ene Marie Winzenried  
aus Lausanne, Schweiz  
2008

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Büttner
2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Kuhn

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.9.2008

Aus dem Pathologischen Institut der Universitätsklinik Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Büttner

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Druck: ABC Kopie und Druck, Am Hof 9, Bonn

à Grand-Maman



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>10</b>
2.1	PATIENTEN .....	10
2.1.1	Kollektiv.....	10
2.1.2	Diagnostische Kriterien .....	10
2.1.3	BRCA-Status .....	12
2.2	MATERIAL .....	13
2.3	METHODEN.....	14
2.3.1	Fixation und histologische Standardfärbungen .....	14
2.3.2	Immunohistochemie .....	14
2.3.3	Histologische Beurteilungskriterien und Scorewerte .....	15
2.3.4	Statistik .....	18
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>20</b>
3.1	GESCHLECHT .....	21
3.2	ALTER ZUM ZEITPUNKT DER DIAGNOSE.....	22
3.3	TUMORLOKALISATION (RECHTE MAMMA - LINKE MAMMA) .....	24
3.4	HISTOPATHOLOGISCHE MERKMALE.....	26
3.4.1	Histologischer Karzinomtyp .....	26
3.4.2	TNM-Stadium .....	28
3.4.3	Malignitätsgrad nach Bloom und Richardson.....	31
3.4.4	Van Nuys-Klassifikation bei duktales in situ Karzinomen .....	33
3.5	EXPRESSION VON HORMONREZEPTOREN IN DEN TUMORZELLEN .....	35
3.5.1	Oestrogenrezeptoren .....	35
3.5.2	Progesteronrezeptoren .....	37
3.6	HER2/NEU EXPRESSION.....	39
3.7	EXPRESSION VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DER AP-2 FAMILIE IN DEN TUMORZELLEN .....	41
3.7.1	AP-2 $\alpha$ -Expression.....	41
3.7.2	AP-2 $\gamma$ -Expression.....	43
3.7.3	Korrelation von Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie mit verschiedenen pathologischen Parametern .....	45
3.7.4	Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion.....	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
4.1	GESCHLECHT .....	69
4.2	ALTER ZUM ZEITPUNKT DER DIAGNOSE.....	70
4.3	TUMORLOKALISATION (RECHTE MAMMA - LINKE MAMMA) .....	71
4.4	HISTOPATHOLOGISCHE MERKMALE.....	72
4.4.1	Histologischer Karzinomtyp .....	72
4.4.2	TNM-Stadium .....	73
4.4.3	Malignitätsgrad nach Bloom und Richardson.....	74
4.4.4	Van Nuys für in situ Karzinome.....	75
4.5	EXPRESSION VON HORMONREZEPTOREN IN DEN TUMORZELLEN .....	75
4.6	HER2/NEU EXPRESSION.....	77
4.7	EXPRESSION VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DER AP-2 FAMILIE IN DEN TUMORZELLEN .....	79

4.7.1	Korrelation von Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie mit verschiedenen pathologischen Parametern .....	84
4.7.2	Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion.....	89
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>LEGENDE.....</b>	<b>99</b>
7.1	ABBILDUNGEN:.....	99
7.2	TABELLEN:.....	100
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>107</b>

# 1 Einleitung

Das invasive Mammakarzinom ist bei Frauen die häufigste Krebsart und stellt die zweite Todesursache durch maligne Krankheit nach dem Lungenkrebs dar. Es gibt jährlich in Europa ungefähr 320'000 neue Fälle (Dumitrescu RG und Cotarla I, 2005).

In der vorliegenden Studie befassen wir uns mit dem familiären und erblichen Brustkrebs. Familiärer Brustkrebs wird derjenige Krebs genannt, der angehäuft in einer Familie auftritt. Erblicher Brustkrebs ist derjenige, der sich häufig in jungem Alter manifestiert und mit einer hoch penetranten, autosomal dominanten Prädisposition für die Krankheit verbunden ist (van de Vijver MJ, 1999).

Zu den Genen, die mit einem hohen Risiko für Brustkrebs verbunden sind, zählt man BRCA1 und BRCA2. Eine genetische Prädisposition durch Mutation in einem der beiden Tumorsuppressor-Gene ist selten und betrifft nur 5-10% aller Mammakarzinome in der allgemeinen Population. Bei Frauen mit positiver Familiengeschichte kann dieser Prozentsatz jedoch stark erhöht sein (Ford D et al., 1998).

Frauen, die eine deletäre Mutation in den Genen BRCA1 oder BRCA2 tragen, haben ein beträchtlich erhöhtes Risiko für Brustkrebs (ungefähr 80%), welches knapp zehn Mal so hoch ist wie für Nichtmutationsträger (Dumitrescu RG und Cotarla I, 2005; Easton D, 1997). Die Keimbahnmutationen in den BRCA1- und BRCA2-Genen machen einen grossen Teil der hereditären Mammakarzinome aus. Diese Gene sind bei nicht hereditären Formen der Krankheit selten somatisch mutiert. Trotzdem bestehen Hinweise, dass ein Verlust von BRCA1 in die Pathogenese einer Untergruppe von nicht hereditärem Brustkrebs involviert ist (Wilson CA, 1999).

Aktuell ist die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit für einen Patienten, eine Keimbahnmutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen zu besitzen, auf klinischen Daten basiert. Darin sind Familiengeschichte, Alter bei Diagnose von Brustkrebs und Ethnizität inbegriffen. Die Familiengeschichte, vor allem mit einer Anhäufung von sowohl Mamma- als auch Ovarialkarzinom, wird als bester prädiktiver Wert angesehen. Die Dokumentierung distinkter Phänotypen (wie medullär, tubulär, lobulär) für hereditäre Mammakarzinome führte zum Vorschlag, dass jene in der Diagnostik Rückschlüsse auf eine zugrunde liegende Keimbahnmutation in einem der BRCA-Gene zulassen (Lakhani SR et al., 2002; Osin PP und Lakhani SR, 1999; Phillips KA, 2000). Verschiedene Studien (Breast Cancer Linkage Consortium, 1997; Marcus JN et al., 1996; Chappuis PO et al., 2000; Eerola H et al., 2005; Robson M et al., 1998; Lakhani SR et al., 2002; Foulkes WD et al., 2000) untersuchen die histologischen Merkmale von BRCA1- und BRCA2-assoziierten Tumoren im Vergleich zu nicht hereditären Mammakarzinomen. So diagnostiziert man bei BRCA1-Karzinomen häufiger einen medullären Histotyp.

Die zwei BRCA-Proteine befinden sich im Kern von normalen Zellen (Daniel DC, 2002). Es wurde gezeigt, dass in BRCA1- und BRCA2-defizienten Zellen eine Chromosominstabilität mit Anhäufung von chromosomalen Fehlern, DNA-Reparationsdefekten und Wachstumsarrest zu finden sind. Zum Beispiel kann BRCA1 für die Wachstumskontrolle der Zellen mit p53 interagieren, um die Transkription von Tumorsuppressorgen  $p21^{waf1/cip1}$  zu stimulieren. Dies hat einen Arrest des Zellzyklus zur Folge (Chai Y et al., 1999). Viele Forschungsgruppen haben sich mit der Regulierung von  $p21^{waf1}$  durch BRCA1 beschäftigt. Einige berichten über eine Hochregulation durch die Überexpression von BRCA1 (mit darauf folgendem Zellzyklusarrest), andere können nachweisen, dass ein Verlust von BRCA1 die Expression von  $p21^{waf1}$  aktivieren kann. Somit bleibt die genaue Funktion von BRCA1 in der Regulierung von  $p21^{waf1}$  noch unklar (Bertwistle D und Ashworth A, 1999).

BRCA1 und BRCA2 besitzen die Merkmale von Tumorsuppressorgen: die Vererbung in betroffenen Familien erfolgt nach einem autosomal dominanten Muster. Verlust von Heterozygotie (LOH) im relevanten Genlocus entsteht im Verlauf des Lebens, beide Allele des Genes sind nun pathologisch verändert, das Genprodukt ist defekt (Scully R, 2000). Ein funktionelles Fehlen der BRCA-Proteine in den Zellen kann zu einer reduzierten Fähigkeit zur DNA-Reparation führen, was die Tumorgenese favorisiert. Wenn p53 in solchen Zellen funktionell wäre, würden die p53-abhängigen Zellzyklusarrest und Apoptose durch  $p21^{waf1/cip1}$  folgen. So ist denkbar, dass der Verlust vom p53-Checkpoint (zum Beispiel durch Mutation von p53 oder durch Einfluss von anderen Faktoren) obligat für eine maligne Transformation in BRCA1- und BRCA2-mutierten Zellen sein könnte. Wenn der Verlust vom p53-Checkpoint tatsächlich eine Vorstufe in der Karzinogenese des BRCA-assoziierten Brustkrebses ist, die vom Verlust des BRCA-Gens durch LOH gefolgt wird, stellt sich die Frage, was die Inaktivierung von DNA-Checkpoints im Brust- und Ovarialkrebs determiniert, welche Gene direkt von BRCA-Proteinen reguliert werden und welche relevant für Tumorsuppression sind.

Um einen Schritt näher an eine mögliche Antwort auf diese Fragen zu kommen, untersuchten wir mit unserer Studie zwei Mitglieder der Familie der Transkriptionsfaktoren AP-2. Die Familie beinhaltet fünf Proteine, die AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Zhao F et al., 2001) und  $\epsilon$  (Feng W und Williams T, 2003; Wang HV et al., 2004) genannt werden und je von verschiedenen Genen kodiert werden. Die drei ersten Mitglieder der Familie, AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  wurden im Brustkrebs beschrieben. Die Ergebnisse der Studien sind jedoch kontrovers. Die genaue Rolle von AP-2-Proteinen im Brustkrebs bleibt noch unklar. Einerseits werden AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  mit der Kontrolle von Proliferation, Apoptose und Differenzierung in Mammaepithelzellen assoziiert, ein Defekt in diesen Prozessen kann womöglich zur Entwicklung eines Mammakarzinoms führen. Andererseits ist im Brustkrebs die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  mit der Expression von HER2/neu verbunden, AP-2 $\alpha$  alleine hingegen mit der Expression von Oestrogenrezeptoren; ein Marker für eine günstige Prognose.



Das Ziel dieser Studie ist es, die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  im Tumorgewebe von Patienten mit hereditären Mammakarzinomen immunohistochemisch zu untersuchen. Dabei gilt es, folgende Hypothesen zu überprüfen:

- Ein Verlust von AP-2 $\alpha/\gamma$  determiniert einen Schritt in der Karzinogenese des erblichen Brustkrebses.
- AP-2 $\alpha/\gamma$  sind Kofaktoren von BRCA1/2, möglicherweise in der Kontrolle des p21-abhängigen DNA-Checkpoints.

Um eine mögliche Bedeutung von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in der Karzinogenese des Brustkrebses, insbesondere des hereditären Brustkrebses, aufzuzeigen, soll das Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in Relation zu verschiedenen histopathologischen Merkmalen der BRCA-assoziierten Tumore dargestellt und mit BRCA negativen Kontrolltumoren verglichen werden. Dabei wäre zu klären, ob eine geringe AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\gamma$ -Expression in hormonrezeptornegativen, schlecht differenzierten BRCA1-Tumoren die vermutlich tumorsuppressive Rolle des Transkriptionsfaktors im Mammakarzinom bestätigt.

Unsere Untersuchungen bezüglich der AP-2 Transkriptionsfaktoren werden im Rahmen einer histopathologischen und immunhistologischen Studie eines Kollektivs von 270 Tumoren durchgeführt. Die Resultate unseres Kollektivs sollen mit denen anderer Studien verglichen werden und allfällige Übereinstimmungen oder Unterschiede zu bereits bekannten Tendenzen markieren.

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patienten

#### 2.1.1 Kollektiv

Für die vorliegende Studie wurden 270 Gewebeproben aus der Mamma, beziehungsweise aus Lymphknoten, Ovar, Vagina, Haut, Thoraxwand und Leber (Mammametastase) von insgesamt 251 Patienten (175 aus Köln, 76 aus Bonn) untersucht, wobei bei einigen Patienten mehrere Gewebeproben Verwendung fanden. Aus der Studie wurden Patienten mit ungenügenden oder fehlenden Informationen ausgeschlossen. Bei allen Patienten wurde zwischen 1981 und 2004 in den Universitätskliniken Köln und Bonn die Diagnose eines hereditären/familiären Mammakarzinoms gestellt. Im Anhang ist erläutert, aus welchen Instituten die Präparate stammen.

In der vorliegenden Studie verglichen wir drei Gruppen: BRCA1-positive, BRCA2-positive und BRCA negative Tumoren in Bezug auf Alter, Geschlecht, Tumorort, Tumorart, Histotyp, TNM-Stadium, Malignitätsgrad, van Nuys-Klassifikation, Hormonrezeptorstatus (Oestrogen-, Progesteronrezeptoren) und Her2/neu-Expression.

Von den 251 untersuchten Patienten sind 247 Frauen, vier sind Männer. Das Durchschnittsalter bei der Diagnose beträgt 48.9 Jahre, mit einer Spannweite von 24 bis 87 Jahren. Das Alter dieser Gruppen zur Zeit der Diagnose reicht von:

BRCA1: .....25 bis 64 Jahren.....arithmetisches Altersmittel: 39.2 Jahre  
 BRCA2: .....35 bis 77 Jahren.....arithmetisches Altersmittel: 46.5 Jahre  
 BRCA negativ: .....24 bis 84 Jahren .....arithmetisches Altersmittel: 49.4 Jahre

#### 2.1.2 Diagnostische Kriterien

Diagnose und Tumorbeschreibung der Mammakarzinome wurden von den Pathologen der Universitätsinstituten für Pathologie Köln und Bonn erstellt. Inhalt der Pathologiebefunde ist:

1. Histologischer Tumortyp:
  - Duktal invasives Karzinom
  - Duktales in situ Karzinom (DCIS)
  - Lobulär invasives Karzinom
  - Lobuläres in situ Karzinom (LCIS)
  - Medulläres Karzinom
  - Muzinöses Karzinom
2. Tumorgröße in Zentimeter
3. TNM-Stadium (Tabelle 1)

## 4. Malignitätsgrad

- Invasives Karzinom: Malignitätsgrad nach Bloom und Richardson (Tabelle 2)
- in situ Karzinom: van Nuys Klassifikation (Tabelle 3)

## 5. Rezeptorenstatus: Oestrogen- und Progesteronrezeptoren

## 6. Expression von HER2/neu (c-erbB2)

Auf die Pathologiebefunde unserer Patienten konnte zurückgegriffen werden, sie bilden die Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Mammakarzinom

<b>T1</b> Tumor 2cm oder kleiner im grössten Durchmesser	pT1mic	Mikroinvasion 0.1cm oder kleiner
	pT1a	>0.1cm aber nicht >0.5cm
	pT1b	>0.5cm aber nicht >1cm
	pT1c	>1cm aber nicht >2cm
<b>T2</b>		>2cm aber nicht >5cm
<b>T3</b>		>5cm
<b>T4</b> Tumor jeder Grösse mit direkter Ausbreitung	pT4a	Ausbreitung auf Thoraxwand
	pT4b	Ödem (inkl. "peau d'orange"), Ulzeration der Haut, oder Satellitknoten in der Haut derselben Brust
	pT4c	T4a + T4b
	pT4d	Entzündliches Karzinom
<b>N0</b>		keine Anzeichen für Lymphknotenbefall
<b>N1</b> Lymphknotenbefall	pN1a	Mikrometastasen (keine > 0.2 cm)
	pN1b	Metastase(n) in Lymphknoten, zumindest eine > 0.2 cm
	pN2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander verbacken oder in andere Strukturen fixiert
	pN3	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
<b>M0</b>		Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>		Fernmetastasen

Tabelle 2: Malignitätsgrad bei invasiven Karzinomen, modifiziert nach Bloom und Richardson

Merkmale	Kriterien	Scorewerte
Tubulusbildung	> 75%	1
	10-75%	2
	<10%	3
Kernpolymorphie	gering	1
	mittel	2
	stark	3
Mitoserate	In 10 HPF (Grenzwerte angepasst für verschiedene Gesichtsfeldgrössen)	1-3

Grad: G1 = Score 3-5

G2 = Score 6-7

G3 = Score 8-9

Tabelle 3: van Nuys (pathomorphologische) Klassifikation

Kerngrad	nicht hochgradig	nicht hochgradig	hochgradig
Nekrosen	ohne Komedonekrosen	mit Komedonekrosen	ohne / mit Komedonekrosen
Van Nuys Klassifikation	= van Nuys Score 1	= van Nuys Score 2	= van Nuys Score 3

In unserem Kollektiv erwiesen sich 234 Tumore als invasiv (davon acht Rezidivkarzinome), 26 waren in situ Karzinome. Die duktales in situ Karzinome (DCIS) und die lobulären in situ Karzinome (LCIS, lobuläre Neoplasie nach WHO 2003) werden in dieser Studie in eine Gruppe gelegt. Sie gelten als Epithelneoplasien. Es muss aber beachtet werden, dass eigentlich das DCIS und das LCIS biologisch unterschiedlich sind, da das LCIS keine obligate Präkanzerose ist. Zehn untersuchte Tumorgewebe waren Metastasen in Lymphknoten, Ovar, Vagina, Haut, Thoraxwand oder Leber.

Tabelle 4: Anzahl Gewebeprobe mit Tumorart

<b>Tumorart</b>	<b>Anzahl Gewebeprobe</b>
Invasives CA	234
in situ Karzinom	26
Metastasen	10
<b>Total</b>	<b>270</b>

Bei 208 Gewebeprobe wurde ein duktales, bei 42 ein lobuläres histologisches Muster diagnostiziert. Nur bei zehn Gewebeprobe beschrieb man ein medulläres, bei vier Gewebeprobe ein muzinöses Karzinom. Bei sechs Gewebeprobe fehlte der histologische Typ. Es handelt sich um Metastasen eines primären Mammakarzinoms.

Tabelle 5: Anzahl Gewebeprobe mit histologischem Typ

<b>Histotyp</b>	<b>Anzahl Gewebeprobe</b>
duktal	208
lobulär	42
medullär	10
muzinös	4
unbekannt	6
<b>Total</b>	<b>270</b>

### 2.1.3 BRCA-Status

In der Abteilung für molekulare Gynäko-Onkologie der Universitäts-Frauenklinik in Köln wurden 130 Patienten (143 Gewebeprobe) von den 251 auf BRCA1-pathologisch, BRCA1-Variante, BRCA2-pathologisch und BRCA2-Variante getestet. Bei den übrigen 121 Patienten (127 Gewebeprobe) wurde der BRCA-Status nicht analysiert (n.a.). Indikationen für den Test waren:

- Ein oder mehrere erst- oder zweitgradige Verwandte mit Mamma- oder Ovarialkarzinom
- Junges Alter bei Erstdiagnose
- Mammakarzinom beidseits
- Familienmitglieder mit multiplen Erstkarzinomen
- Männer mit Mammakarzinom

Tabelle 6: Anzahl Patienten mit BRCA-Status

<b>BRCA-Status</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Anzahl Gewebeprobe</b>
BRCA1 pathologisch	17	18
BRCA2 pathologisch	10	13
BRCA1 Variante (unklassifiziert)	6	112
BRCA2 Variante (unklassifiziert)	11	(BRCA negativ und BRCA1/2 Varianten)
BRCA negativ	86	
<b>Total</b>	<b>130</b>	<b>143</b>

Die identifizierten Sequenzvarianten von BRCA-Genen beinhalten bekannte deletäre Mutationen (proteintrunkierend), erkannte Polymorphismen (neutral in Bezug auf Krankheitsrisiko) und andere Varianten von ungewisser klinischer Relevanz. Im BRCA1-Gen machen diese unklassifizierten die Hälfte aller Varianten aus (ausgeschlossen Polymorphismen). Viele Sequenzvarianten in den Prädispositionsgenen sind von ungewisser klinischer Signifikanz. Die Klassifizierung von diesen Varianten in Hoch- oder Niedrigrisikokategorien ist ein echtes Problem in der klinischen Genetik und sollte auf klinischen Beobachtungen basieren, da jene direkt mit dem Krebsrisiko verbunden sind (Goldgar DE et al., 2004).

Die Analyse von BRCA1- und BRCA2-Genen führte zur Identifikation einer hohen Anzahl von Nukleotidvarianten, die als genetische Varianten von unklarer Signifikanz oder unklassifizierte Varianten (uv) bekannt sind. Ihre Pathogenität ist unklar, ihre klinische Relevanz ist unsicher. Ein Polymorphismus (neutrale Variante) ist eine nicht-krankheitsverursachende Veränderung, die in 1% der Allelen in der Population nachgewiesen wird. Genetische Varianten werden als "uv" bezeichnet, wenn unklar ist, ob sie einen funktionellen Einfluss auf das Protein haben. Die grosse Mehrzahl der uv's wird als Missense-Mutationen beschrieben. Eine Studie zeigte, dass uv-Patienten öfters andere Tumore als Mamma- oder Ovarialkarzinome und deren Verwandte weniger oft Tumore haben im Vergleich zu Patienten mit pathogener Mutation in einem der BRCA-Gene (Gomez-García EB et al., 2005). Weniger erkrankte Verwandte und weniger Tumore in Familien von uv-Patienten sollen ein Beweis dafür sein, dass wenn einige der uv's pathogen sind, sie weniger penetrant als echte pathogene Mutationen sind. Diese geringere Penetranz kann damit erklärt werden, dass diese uv's häufig Missense-Varianten sind und das Protein nicht trunkieren.

Für unsere Studie beschliessen wir, die Gruppen BRCA1-Varianten und die BRCA2-Varianten mit der Gruppe der BRCA negativen Patienten zusammenzulegen, da angenommen wird, dass diese Genmutationen keinen relevanten Einfluss auf die Entwicklung der Krankheit haben.

## 2.2 Material

Im Rahmen dieser Studie wurde mit polyklonalen Antikörpern der Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$ , beziehungsweise AP-2 $\gamma$  in den Kernen der Krebszellen von insgesamt 270 Präparaten immunhistochemisch dargestellt. Verwendung fand paraffineingebettetes Material von Tumorextirpationen, Nachresektaten, Amputaten, Stanzbiopsien aus Mamma, axillärem Gewebe und weiteren Metastasen, wie Leber und Scheide.

Es wurden 270 Gewebeproben (540 Schnittpräparate) von insgesamt 251 Patienten mikroskopisch untersucht. Pro Patient gingen in der Regel zwei Präparate in die Auswertung ein (eine AP-2 $\alpha$ -Färbung und eine AP-2 $\gamma$ -Färbung), wobei bei 19 Patienten mehrere Präparate aufgrund von multifokalen oder rezidivierenden Karzinomen ausgewertet wurden. Zusätzlich wurde jeweils eine HE-Färbung desselben Paraffinblockes untersucht.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Fixation und histologische Standardfärbungen

Das Gewebe wird in 10%igem gepuffertem Formaldehyd fixiert. Die 2-3µm dicken Schnitte werden routinemässig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

### 2.3.2 Immunohistochemie

Der Avidin-Biotin-Methode liegt die hohe Bindungsaffinität von Avidin, (welches durch Streptavidin ersetzt werden kann), einem Hühnereiweiss-Glykoprotein, zum Vitamin Biotin zugrunde. Histochemisch wird die Peroxidase in dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen (Denk H, 1989).

Zur Vorbereitung der immunohistochemischen Färbung müssen die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert werden. Dies geschieht, indem man sie erst zehn Minuten in Xylol und dann zehn Minuten in 100%igem Ethanol, danach in absteigender Alkoholreihe bis Tris-Puffer wäscht. Tris-Puffer: Die Stammlösung besteht aus 60,57g Tris Merck 8382, 500ml Aqua dest. und 430ml 1N HCl. Für die Gebrauchslösung werden 900ml 0,9% NaCl mit 100ml der Stammlösung gemischt.

Danach werden die Präparate drei mal zehn Minuten in vorgewärmtem Citratpuffer von pH 6,0 in der Mikrowelle bei 600 Watt hitzebehandelt, um das Epitop zu demaskieren. Citratpuffer: Die Stammlösung A besteht aus 10,505g Citronensäure/500ml, M1.00244.0500. Die Stammlösung B besteht aus 29,41g tri-Natriumcitratdihydrat/1000ml, M1.06448.1000. Für die Gebrauchslösung werden 18ml der Stammlösung A und 82ml der Stammlösung B mit 1000ml Aqua dest. gemischt. Der Antikörper wird nun in einer Verdünnung von 1:250 in Antibody-Diluent, Firma Dako, über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschliessend wird der Antikörper über den Färbeautomaten, Tech-Mate 500 Firma Dako, mit dem Detektionskit Streptavidin/Peroxidase, Firma Dako K 5003, detektiert. Mit Aqua dest. werden die Schnitte abgespült und es schliesst sich die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun an; durch Spülen mit Leitungswasser werden die Kerne gebläut. Zum Schluss erfolgt die Eindeckung der Schnitte mit Aquatex, einem wasserlöslichen Eindeckmittel.

Die Familie der Transkriptionsfaktoren AP-2 beinhaltet fünf Proteine, die AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (Zhao F et al., 2001) und  $\epsilon$  (Feng W und Williams T, 2003; Wang HV et al., 2004) genannt und je von verschiedenen Genen kodiert werden. Diese Transkriptionsfaktoren homo- oder heterodimerisieren via helix-span-helix Motiven und transaktivieren ihre Zielgene, indem sie GC-reiche Konsensus-Sequenzen in den respektiven Promotoren binden (Williams T und Tjian R, 1991a und 1991b). Aktuell sind AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  am besten charakterisiert. Während der Embryogenese werden alle drei Gene in Geweben exprimiert, die komplexe morphologische Änderungen durchgehen, vor allem in Neuralleiste, Neuralrohr, Nieren, Augen, Gesicht und Gliedmassen (Mitchell PJ et al., 1991;

Moser M et al., 1995). Die drei ersten Mitglieder der Familie, AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  wurden im Brustkrebs beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden für den Nachweis von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in den Brustkrebszellen durch Immunhistochemie folgende polyklonale Antikörper verwendet:

- **AP-2 Rabbit Polyclonal Antibody, Active Motif:** Catalog NO.39001, Clone Name: N/A. Dieser Antikörper ist spezifisch gegen die Aminosäureresiduen 120-134 des menschlichen AP-2 gerichtet. Er erkennt sowohl AP-2 $\alpha$  A (50kDa) als auch AP-2 $\alpha$  B (40kDa). Vorbehandlung: Hitzedemaskierung. Verdünnung 1:250, bei 4°C über Nacht.
- **AP-2 $\gamma$  (H-77): sc-8977, Santa Cruz Biotechnology, Inc.:** AP-2 $\gamma$  (H-77) ist ein polyklonaler Antikörper vom Hasen, der gegen die Aminosäuren 145-221 (interne Region des menschlichen AP-2 $\gamma$ ) gerichtet ist. Er reagiert mit AP-2 $\gamma$  von Maus, Ratte und Mensch, nicht cross-reaktiv mit AP-2 $\alpha$  oder AP-2 $\beta$ . Vorbehandlung: Hitzedemaskierung. Verdünnung 1:250, bei 4°C über Nacht.

Da AP-2 ein Transkriptionsfaktor ist, handelt es sich um eine Kernfärbung. Diese Färbung ist somit spezifisch. Eine zytoplasmatische Reaktion wird nicht gewertet.

### 2.3.3 Histologische Beurteilungskriterien und Scorewerte

Frühere Studien (Gee JM et al., 1999; Pellikainen J et al., 2002) über die Expression von AP-2 in Brustkrebszellen benutzten folgendes Bewertungsschema: Alle Tumore mit detektierbarer Kernfärbung wurden als positiv bewertet. Hochpositiv waren diejenigen Tumore, die 80% oder mehr AP-2-positive Zellen besaßen. Schwach positiv waren diejenigen Tumore, bei denen weniger als 80% der Zellen AP-2-positiv waren.

Für die vorliegende Studie entscheiden wir uns für ein sensibleres Bewertungssystem mit vier Stufen. Die angefärbten Areale werden ohne Hintergrund mit erkennbarer interner Kontrolle (Normalgewebe) ausgewertet und semiquantitativ mittels des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (IRS) errechnet. Anhand dieses Scores wird für jeden Tumor der immunhistochemische Status für AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  erhoben. So werden dem Prozentanteil und der Intensität der Färbung entsprechende Werte zugeordnet. Dabei wird ausschliesslich auf die Kernfärbung geachtet. Eine zytoplasmatische Reaktion wird separat notiert.

Tabelle 7: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele W und Stegner HE, 1987)

Anteil positiver Zellkerne		Färbeintensität	
keine positiven Kerne	= 0 Punkte	keine Färbung	= 0 Punkte
< 10% positive Kerne	= 1 Punkt	schwache Färbeintensität	= 1 Punkt
10-50%	= 2 Punkte	mässige Färbeintensität	= 2 Punkte
51-80%	= 3 Punkte	starke Färbeintensität	= 3 Punkte
> 80%	= 4 Punkte		

Die Anzahl Punkte für den Prozentanteil der positiven Zellkerne wird mit der Anzahl Punkte für die Intensität multipliziert, zusammen ergeben sie den Remmele-Score. Seine Reichweite beträgt 0-12. Klassifiziert wird folgenderweise:

Werte von 0-2:.....gilt als negativer immunhistochemischer Status.

Werte von 3-6:.....schwache Expression

Werte von 7-9:.....mässige Expression

Werte von 10-12:.....starke Expression

Es wurde festgestellt, dass die AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\gamma$ -Proteine eine unterschiedliche Verteilung in den Endknospen der Brustdrüse von Mäusen aufweisen (Zhang J et al., 2003). Hier wird AP-2 $\alpha$  in den dukталen Epithelzellen häufiger als in den Myoepithelzellen exprimiert, AP-2 $\gamma$  hingegen zeigt allgemein eine schwächere Expression, ist aber in beiden Zelltypen in gleichen Mengen vorhanden. Die unterschiedliche Verteilung von AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\gamma$ -Proteinen in den Endknospen zeigt, dass sie eine distinkte Rolle auf das Wachstum und die Morphogenese des dukталen Netzes der Brustdrüse spielen könnten. Friedrichs N et al. (2005) weisen auf eine distinkte räumliche Verteilung von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in nicht neoplastischem Brustepithel beim Menschen hin, wo AP-2 $\alpha$  in der inneren Drüsenzellschicht, AP-2 $\gamma$  in der äusseren myoepithelialen Zellschicht exprimiert wird.

In der vorliegenden Studie dienen als negative Kontrolle für die Färbung von AP-2 die Stromazellen desselben Schnittpräparates. Sie exprimieren keines der AP-2-Proteine. Als positive Kontrolle für die Färbung von AP-2 dienen die physiologischen Drüsenläppchen auf demselben Schnittpräparat. Dort wird AP-2 $\alpha$  in den Epithelialzellen und AP-2 $\gamma$  in den Myoepithelialzellen stark exprimiert.

Abbildung 1 (E1917.04): AP-2 $\alpha$  Färbung in Epithelialzellen eines physiologischen Brustdrüsenläppchens (a) und Aussparung der Myoepithelialzellen (b). 20-fache Vergrösserung.

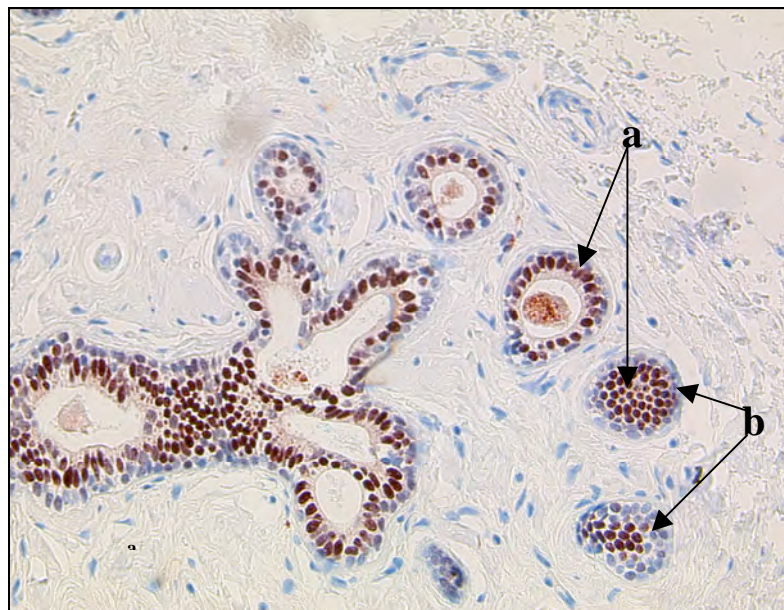




Abbildung 2 (E1917.04): AP-2 $\gamma$  Färbung in Myoepithelialzellen eines physiologischen Brustdrüsenläppchens (a) und Aussparung der Epithelialzellen (b). 40-fache Vergrößerung.

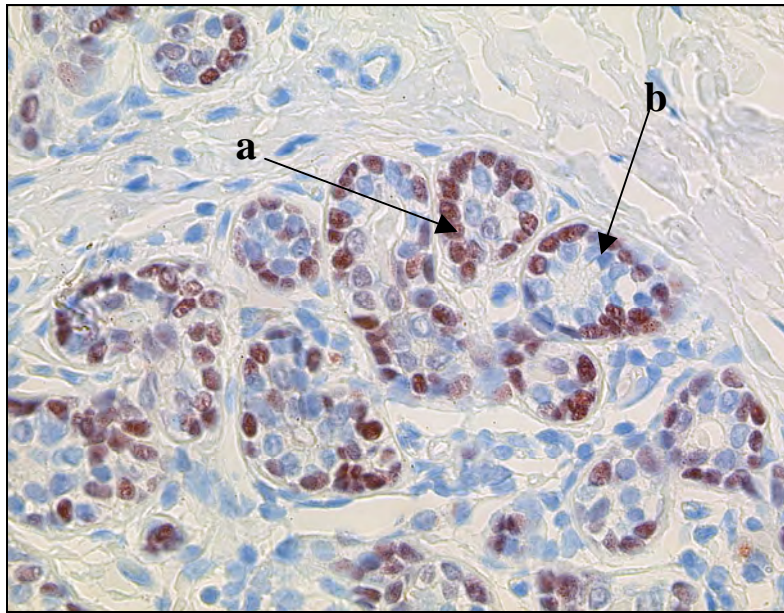
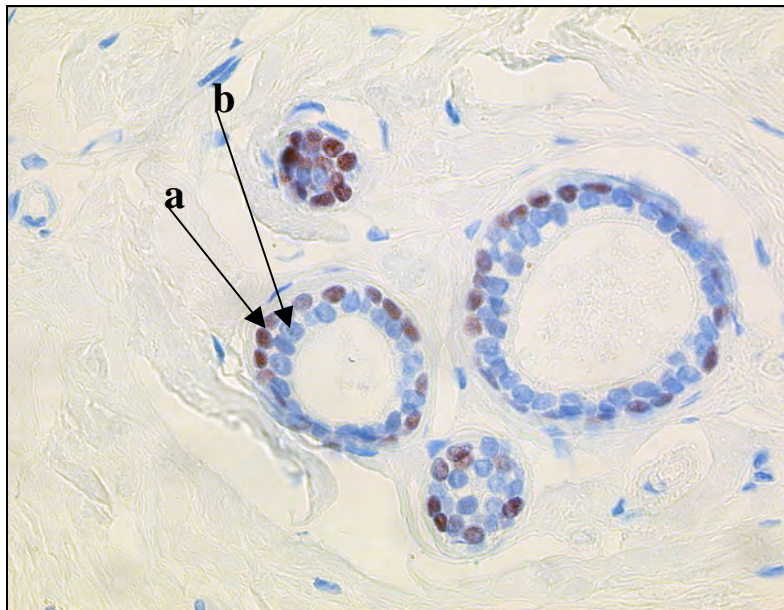


Abbildung 3 (E15789.00): AP-2 $\gamma$  Färbung in Myoepithelialzellen eines physiologischen Brustdrüsenläppchens (a) und Aussparung der Epithelialzellen (b). 40-fache Vergrößerung.



### 2.3.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wird das Statistikprogramm SPSS 11.0 for Mac® OS X benutzt. Alle Daten wurden zunächst in einer Excel-Tabelle gesammelt und danach ins SPSS-Programm kopiert, um dann weiter verarbeitet zu werden. In der vorliegenden Studie wird zum Vergleich von Alter bei Diagnose und von AP-2-Scoren der nonparametrische Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon-Test) benutzt. Die Assoziation zwischen BRCA-Status und histopathologischen Parametern wird mit Kontingenztafeln und  $\chi^2$ -Tests untersucht. Diese statistischen Verfahren werden hier genauer beschrieben.

**U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney:** In dieser Arbeit findet für den Vergleich von zwei Zentralwerten der so genannte U-Test Verwendung. So können wir zum Beispiel den Unterschied vom Altersdurchschnitt zwischen zwei BRCA-Gruppen untersuchen: BRCA1  $\Leftrightarrow$  BRCA2, BRCA1  $\Leftrightarrow$  BRCA negativ, BRCA2  $\Leftrightarrow$  BRCA negativ. Die Ergebnisse sind in Tabellen dargestellt, die auf der rechten Seite das Signifikanzniveau für den Unterschied zwischen den jeweiligen zwei Gruppen zeigen. Ähnlich wird für den Vergleich von familiärem (BRCA-getesteten) und sporadischem (BRCA nicht getesteten) Mammakarzinom vorgegangen.

Der Wilcoxon-Test setzt stetige Verteilungsfunktionen sowie zumindest annähernd gleiche Verteilungsformen der zwei unabhängigen Merkmale  $X_1$  und  $X_2$  voraus, wobei sich die Varianzen unterscheiden dürfen. Bei dem Test werden die Unterschiede der mittleren Ränge bzw. die Rangsummen, die die Beobachtungswerte von  $X_1$  und  $X_2$  in der gemeinsamen Verteilung annehmen, analysiert. Das Verfahren kann somit als Test einer rang-biserialen Korrelation angesehen werden. Die Nullhypothese, dass die Zentralwerte gleich sind, wird auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha < 0.05$  verworfen und der Unterschied ist somit signifikant.

**Kontingenztafeln (Kreuztafeln):** Mit statistischen Methoden kann überprüft werden, ob Zusammenhänge (Korrelationen) zwischen den verschiedenen Variablen (Merkmalen) bestehen. Es werden dabei Fragen gestellt wie: "Existiert ein Zusammenhang?", "Gibt es Hinweise, dass der Zusammenhang zufällig ist?" oder "Wie stark ist der Zusammenhang?". Für die Darstellung von Korrelationen werden für unsere Studie sogenannte Kontingenztafeln (Kreuztafeln) erstellt. Sie ermitteln den Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen und entsprechen also einer zweidimensionalen Häufigkeitstabelle.

**Chi-Square Test ( $\chi^2$ -Test):** Der  $\chi^2$ -Test gibt Auskunft über die Signifikanz der Korrelation. Der Wert "Pearson  $\chi^2$ " beantwortet die Frage "Sind die Werte in der Tabelle zufällig verteilt?". Wenn Pearson  $\chi^2$  kleiner als 0.05 ist, ist die Verteilung in der Kontingenztafel nicht zufällig, es besteht also eine Korrelation zwischen den zwei Variablen.

**Zusammenhangsmasse (Korrelationskoeffizienten):** Der Korrelationskoeffizient "Goodman und Kruskal's Gamma" beschreibt, wie stark die zwei Merkmale korrelieren. Gamma ist unabhängig von Grösse und Form der Kontingenztabelle sowie unabhängig vom Auftreten von Bindungen.

Tabelle 8: Zusammenhangsmasse (Korrelationskoeffizienten)

<b>Gamma</b>	<b>Korrelation zwischen zwei Merkmalen (X und Y)</b>
$\cong 0$	kein Zusammenhang
$0 < \gamma < 1$	positiver Zusammenhang (X steigt wenn Y steigt)
$-1 < \gamma < 0$	negativer Zusammenhang (X steigt wenn Y sinkt)

Mit den Kontingenztabelle können wir zum Beispiel das Malignitätsgrad einer BRCA-Gruppe mit demjenigen der zwei anderen vergleichen: BRCA1  $\Leftrightarrow$  nicht-BRCA1 (BRCA2 + BRCA negativ), BRCA2  $\Leftrightarrow$  nicht-BRCA2 (BRCA1 + BRCA negativ), BRCA negativ  $\Leftrightarrow$  nicht-BRCA negativ (BRCA1 + BRCA 2). Auf der rechten Seite der Tabelle stehen die zwei Korrelationsmasse (Pearson  $\chi^2$  und Gamma) mit deren Signifikanzniveau, entsprechend für den Unterschied zwischen den zwei untersuchten Gruppen. Wir haben hier diese Methode gewählt, weil die Gruppen klein sind und die statistische Interpretation der Kontingenztabelle eine genügende Anzahl Fälle in jeder Zelle voraussetzt. Deshalb wird auf eine Untersuchung zwischen den einzelnen Gruppen (BRCA1  $\Leftrightarrow$  BRCA2, BRCA1  $\Leftrightarrow$  BRCA negativ, BRCA2  $\Leftrightarrow$  BRCA negativ) wie beim Wilcoxon-Test verzichtet.

### 3 Ergebnisse

In diesem Kapitel beschreiben wir die Häufigkeitsverteilung von verschiedenen histopathologischen Daten der Patienten, bei denen der BRCA-Test durchgeführt wurde. Zusätzlich ist in den Tabellen zum Vergleich die Häufigkeitsverteilung der übrigen Patienten aufgezeichnet, die den BRCA-Test nicht erhalten haben.

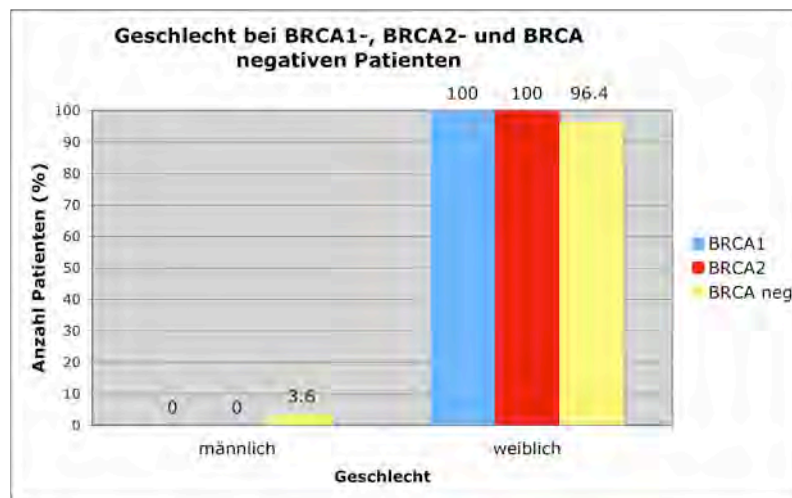
Dann teilen wir diese Gruppe (BRCA-getestet) in drei Gruppen. Die erste Gruppe umfasst alle BRCA1-Patienten, die zweite Gruppe alle BRCA2-Patienten und als dritte Gruppe bezeichnen wir alle Patienten, die als BRCA negativ diagnostiziert wurden also keine der zwei BRCA-Mutationen besitzen. Es wird auf die Tatsache aufmerksam gemacht, dass die Gruppen 1 (BRCA1) und 2 (BRCA2) kleine Gruppen sind ( $n=18$  bzw.  $n=13$ ).

Ebenfalls wird eine Korrelationsanalyse durchgeführt, welche zeigen soll, ob zwischen der Expression des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$ , beziehungsweise AP-2 $\gamma$  und verschiedenen anderen Merkmalen ein Zusammenhang besteht oder nicht.

### 3.1 Geschlecht

Unser Gesamtkollektiv beinhaltet vier Männer, die restlichen 247 untersuchten Patienten sind Frauen. Beim Vergleich der drei Gruppen (BRCA1, BRCA2 und BRCA negativ) in Bezug auf das Geschlecht der Patienten fällt auf, dass unser männliches Kollektiv BRCA negativ ist. Alle BRCA1-Patienten sowie alle BRCA2-Patienten (100%) sind Frauen. In diesen Gruppen finden wir keine Männer mit Mammakarzinom.

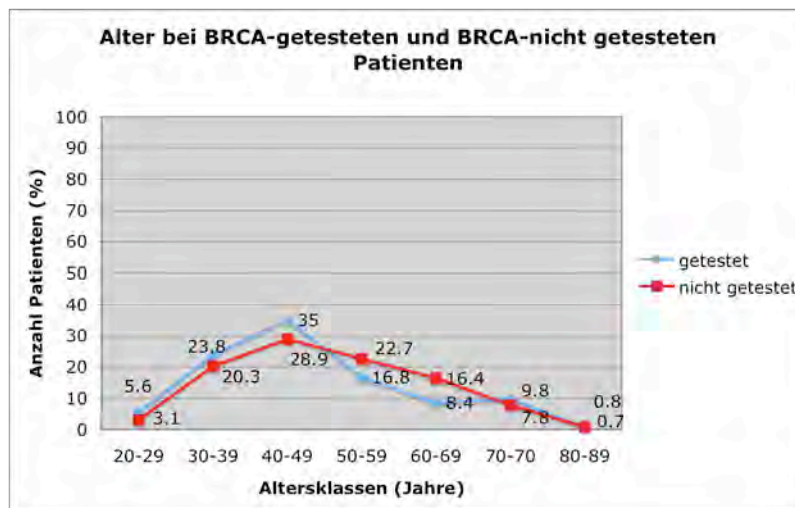
Abbildung 4: Geschlecht bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



### 3.2 Alter zum Zeitpunkt der Diagnose

Wir wollen zuerst sehen, wie alt die Patienten unseres Kollektivs bei der Diagnose des Tumors waren, dies unabhängig ihres BRCA-Status. Für diese Auswertung werden sieben Altersklassen gebildet. Abbildung 5 lässt einen Altersgipfel in der Altersgruppe 40-49 Jahre erkennen. Bei den BRCA-Getesteten finden wir acht Patienten (5.6%) zwischen 20 und 30 Jahre alt, 34 Patienten (23.8%) sind zwischen 30 und 40 Jahre alt. Am meisten BRCA-getestete Patienten, nämlich 50 (35%) sind zwischen 40 und 49 Jahre alt. Danach findet man nur noch 24 Patienten (16.8%) zwischen 50 und 60 Lebensjahren, zwölf Patienten (8.4%) zwischen 60 und 70 Jahren und 14 Patienten (9.8%) sind älter als 70 Jahre. Einzig ein Patient ist über 80 Jahre alt zum Zeitpunkt der Diagnose (0.7%). Die Kurve zeigt ausserdem eine grössere Verteilung der BRCA-getesteten Patienten in der jüngeren Hälfte unserer Alterseinteilung. 92 Patienten sind jünger als 49 Jahre, das sind 64.4% aller Patienten unseres untersuchten Kollektivs. Die übrigen 51 Patienten (35.6%) sind also 50-jährig und mehr.

Abbildung 5: Alter bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten



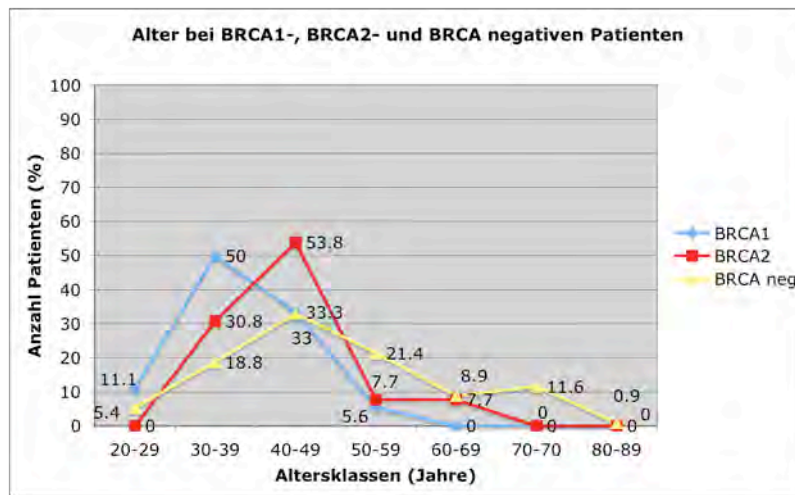
Der Altersgipfel bei den nicht getesteten Patienten liegt in derselben Altersgruppe (40-49 Jahre). Im Vergleich sind jedoch nur 66 Patienten (52.3%) jünger und 61 Patienten (47.7%) älter als 49 Jahre. Die BRCA nicht getesteten Patienten scheinen also tendenziell älter bei der Erstdiagnose zu sein. Der Unterschied zwischen den beiden Altersdurchschnitten ist jedoch nicht signifikant.

Tabelle 9: Alter bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten (Wilcoxon)

BRCA	N	Altersmittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
getestet	143	47.85	-2.23	0.136
nicht getestet	127	50.08		

Nun vergleichen wir das Alter von BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten. Der Altersgipfel ist nicht bei allen drei Gruppen in derselben Alterssparte. Man bemerkt eine Verschiebung dieses Gipfels nach rechts in den zwei letzten Gruppen (BRCA2 und BRCA negativ), das heisst die Patienten sind älter beim Zeitpunkt der Diagnose. In der ersten Gruppe (BRCA1) liegt der Gipfel in der Altersgruppe 30-39 Jahre. Neun Patienten (50%) sind zwischen 30 und 40 jährig. 33.3% der BRCA1-Patienten also sechs Patienten sind zwischen 40 und 50 Jahre alt. Zwei Patienten (11.1%) sind zwischen 20 und 29 Jahre alt, nur ein Patient (5.6%) ist älter als 50 Jahre. In den zwei anderen Gruppen liegt der Gipfel in der Altersgruppe 40-49 Jahre. Der Gipfel in der BRCA2-Gruppe ist steiler, 53.8% der Patienten sind zwischen 40 und 49 Jahre alt. In der BRCA negativen Gruppe sind 33% aller Patienten in dieser Altersgruppe. Ein zweiter kleinerer Gipfel befindet sich in der Altersgruppe der 70-79-jährigen, darin findet man 11.6% der Patienten.

Abbildung 6: Alter bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Beim Vergleich des Altersdurchschnitts sieht man, dass die BRCA1-Patienten signifikant jünger sind als die BRCA negativen Patienten. Im Durchschnitt sind die BRCA1-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose 39 Jahre alt, die BRCA negativen Patienten hingegen sind im Durchschnitt etwa zehn Jahre älter. Weiter fällt auf, dass die Patienten mit BRCA2-Mutation etwa sieben Jahre älter sind als die Patienten mit BRCA1-Mutation, aber nur etwa drei Jahre jünger als die Patienten ohne BRCA1- oder BRCA2-Mutation. Dieser Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant.

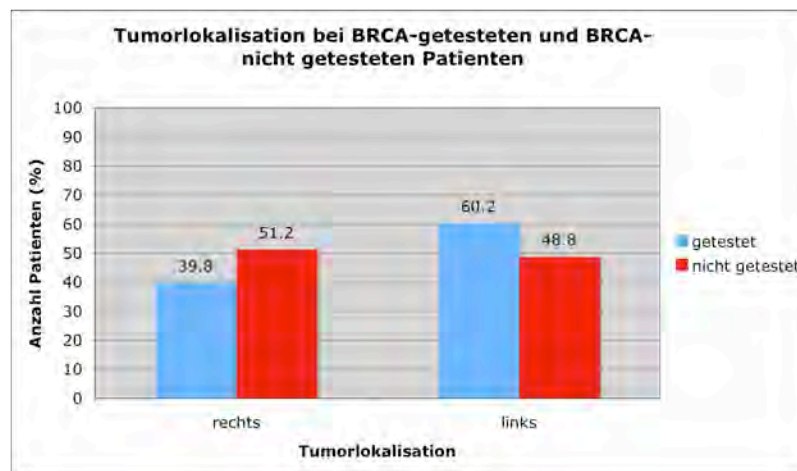
Tabelle 10: Alter bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon)

BRCA-Status	N	Altersmittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
BRCA1	18	39.22	-7.24	0.068
BRCA2	13	46.46		
BRCA1	18	39.22	-10.17	0.002
BRCA negativ	112	49.39		
BRCA2	13	46.46	-2.93	0.346
BRCA negativ	112	49.39		

### 3.3 Tumorlokalisierung (rechte Mamma - linke Mamma)

Wir untersuchen zuerst in unserer BRCA-getesteten Gruppe, in welcher Brust der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose festgestellt wurde. Bei 80 Patienten (60.2%) befindet sich der Tumor auf der linken Seite. Bei 53 Patienten (39.8%) ist der Tumor rechts lokalisiert. Die linke Brust scheint also häufiger betroffen zu sein als die rechte Brust. Bei den nicht getesteten Patienten fällt auf, dass das Karzinom etwa gleich häufig in der rechten wie in der linken Brust auftritt (51.2% rechts, 48.8% links).

Abbildung 7: Tumorlokalisierung bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten



Der Unterschied der Tumorlokalisierung zwischen den zwei Gruppen ist statistisch nicht signifikant.

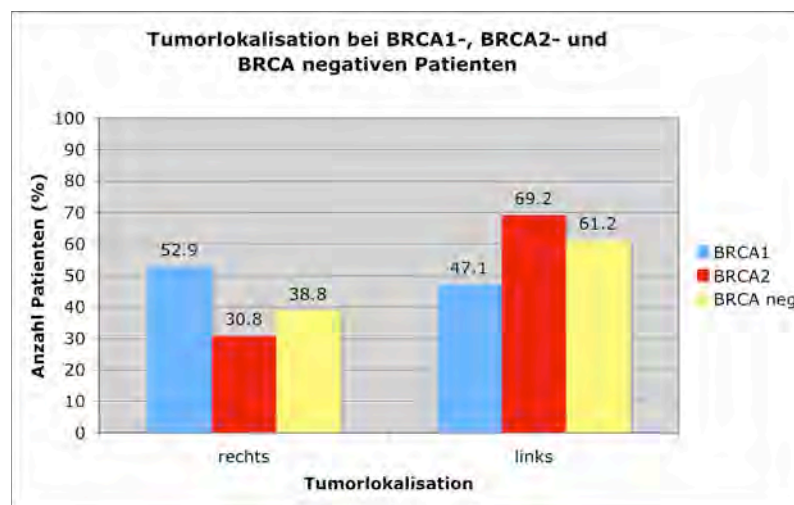
Tabelle 11: Tumorlokalisierung bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA	rechts	links	Pearson $\chi^2$	Gamma
nicht getestet	62	59	3.317 (p=0.069)	0.227 (p=0.067)
getestet	53	80		



Bei der Aufteilung der Patienten nach BRCA-Status zeigt die Untersuchung der Abbildung 8, dass bei BRCA2- und BRCA negativen Patienten das Mammakarzinom mehrheitlich die linke Mamma betrifft. Bei der Gruppe 2 (BRCA2) befinden sich 69.2% der Tumore in der linken und nur 30.8% in der rechten Brust. Bei der Gruppe 3 (BRCA negativ) finden wir 61.2% der Tumore in der linken, 38.8% in der rechten Brust. In der BRCA1-Gruppe hingegen ist die rechte Brust mit 52.9% etwas häufiger betroffen als die linke (47.1%); neun Patienten einwickelten einen Tumor in der rechten, acht in der linken Brust.

Abbildung 8: Tumorlokalisation bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Die Unterschiede der Tumorlokalisation zwischen den drei Gruppen sind statistisch nicht signifikant. Es ist Zufall, ob die linke oder die rechte Brust vom Mammakarzinom betroffen wird.

Tabelle 12: Tumorlokalisation bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test)

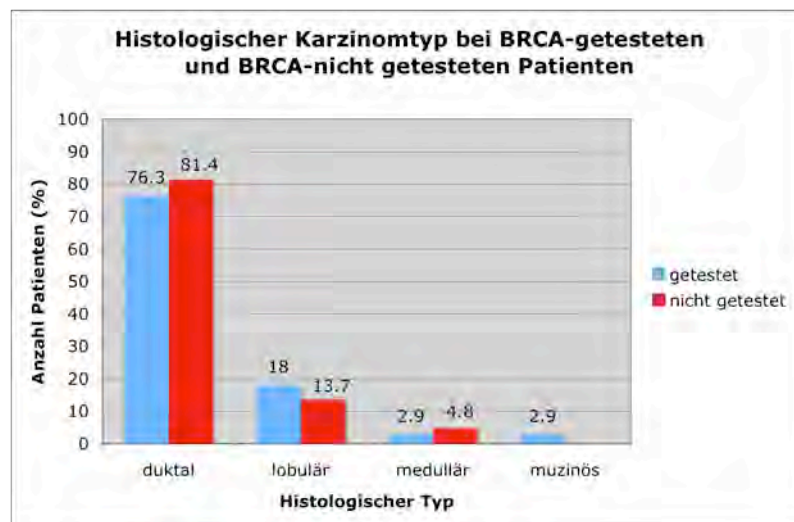
BRCA-Status	rechts	links	Pearson $\chi^2$	Gamma
BRCA1	9	8	1.394 (p=0.238)	0.296 (p=0.257)
BRCA2 + neg	44	72		
BRCA2	4	9	0.496 (p=0.481)	0.217 (p=0.465)
BRCA1 + neg	49	71		
BRCAneg	40	63	0.196 (p=0.658)	0.093 (p=0.661)
BRCA1 + 2	13	17		

### 3.4 Histopathologische Merkmale

#### 3.4.1 Histologischer Karzinomtyp

Wir haben die verschiedenen histologischen Typen der Karzinome unserer BRCA-getesteten Gruppe gezählt und veranschaulicht die Zahlen an Hand folgender Abbildung. Als Erstes erkennt man, dass das duktales Karzinom, bzw. das in situ Karzinom mit duktalem histologischem Muster (DCIS) weitaus am häufigsten vorkommt. Bei 106 Patienten unseres BRCA-getesteten Kollektivs (76.3%) zeigen die Präparate ein Karzinom oder ein in situ Karzinom vom duktalem Typ, bei 25 Präparaten (18%) diagnostizierte man einen lobulären Typ. Weiter sieht man, dass der medulläre Typ unter den Getesteten bei vier Patienten (2.9%) auftritt. Ein muzinöses Karzinom zeigen vier Präparate (2.9%). Das Kollektiv der BRCA nicht getesteten Patienten zeigt keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu der getesteten Gruppe.

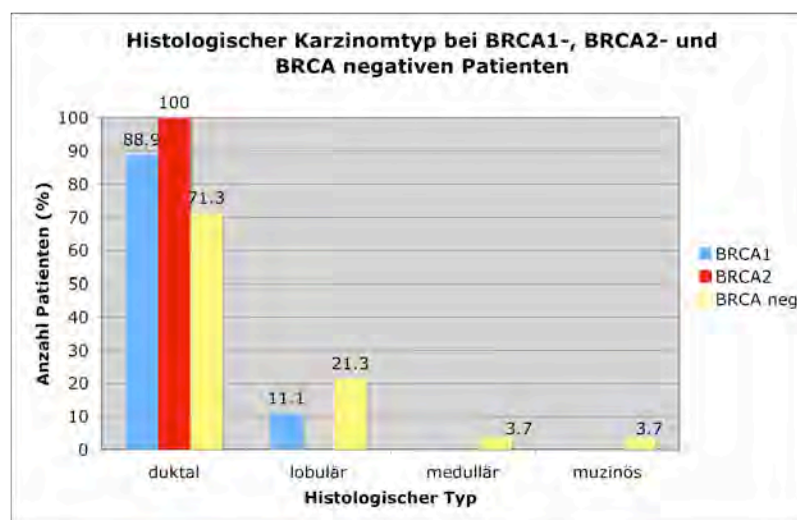
Abbildung 9: Histologischer Typ bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten



Nun teilen wir die BRCA-getestete Gruppe in BRCA1-, BRCA2- und BRCA negative Karzinome auf. Das histologisch duktales Karzinom ist weitaus am häufigsten in allen drei Gruppen, wobei in der BRCA negativen Gruppe die anderen histologischen Typen auch vorkommen. Das hängt damit zusammen, dass diese Gruppe mehr Patienten beinhaltet (n=112). Interessant ist jedoch, dass wir weder in der BRCA1- noch in der BRCA2-Gruppe den medullären Typ vorfinden. In allen medullären Karzinomen findet man ein intaktes BRCA-Gen.

Der duktales Histotyp kommt bei 16 BRCA1-Tumoren (88.9%) vor, nur zwei Tumore (11.1%) sind vom lobulären Typ. Andere Histotypen kommen in dieser Gruppe nicht vor. Alle BRCA2-Tumore (100%) haben duktales Merkmale. Alle BRCA2-Tumore (100%) haben duktales Merkmale.

Abbildung 10: Histologischer Typ bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten

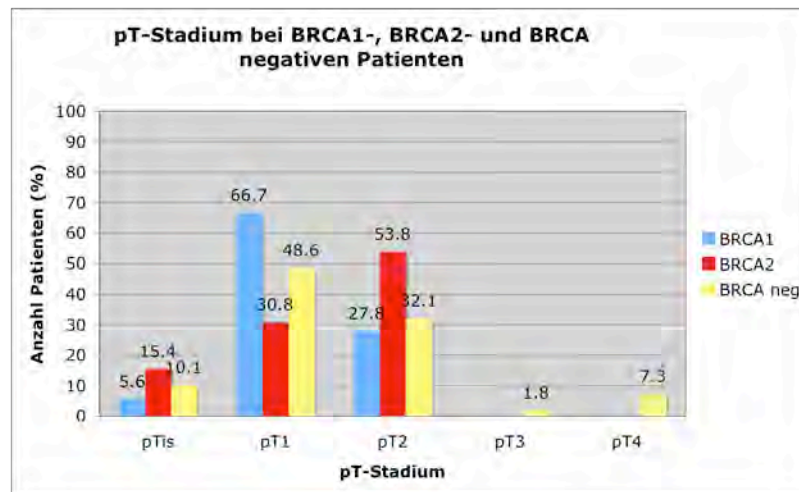


### 3.4.2 TNM-Stadium

**pT-Stadium:** Bei dieser Untersuchung stellen wir die verschiedenen BRCA-Gruppen einander gegenüber. Wenn wir nun nach dem TNM-Stadium die Grösse der Tumore vergleichen (pT-Stadium), stellen wir fest, dass in der BRCA2-Gruppe die Hälfte aller Tumore erst im Stadium pT2 diagnostiziert wurden, hingegen in der BRCA1-Gruppe nur fünf Tumore (27.8%) ein Stadium pT2 zeigten. Die Mehrzahl der BRCA1-Patienten (zwölf Patienten, also 66.7%) wurden schon früher entdeckt, nämlich im Stadium pT1, wie auch in der BRCA negativen Gruppe (48.6% im pT1-, 32.1% im pT2-Stadium). Höhere pT-Stadien findet man nur in der letzteren Gruppe. Wie schon oben erwähnt, ist diese Gruppe die Grösste (n=112), die Wahrscheinlichkeit einer breiteren Verteilung ist also höher.

Grösser als pT2 (pT3 und pT4) ist in der Gruppe der BRCA1-Patienten kein Tumor. Einzig ein Tumor (5.6%) wurde in dieser Gruppe als in situ Karzinom eingestuft.

Abbildung 11: pT-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Das T-Stadium von Karzinomen widerspiegelt die Grösse des Tumors. Wir vergleichen die Durchschnittsgrössen der Tumoren unserer drei Gruppen (in Zentimetern). Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

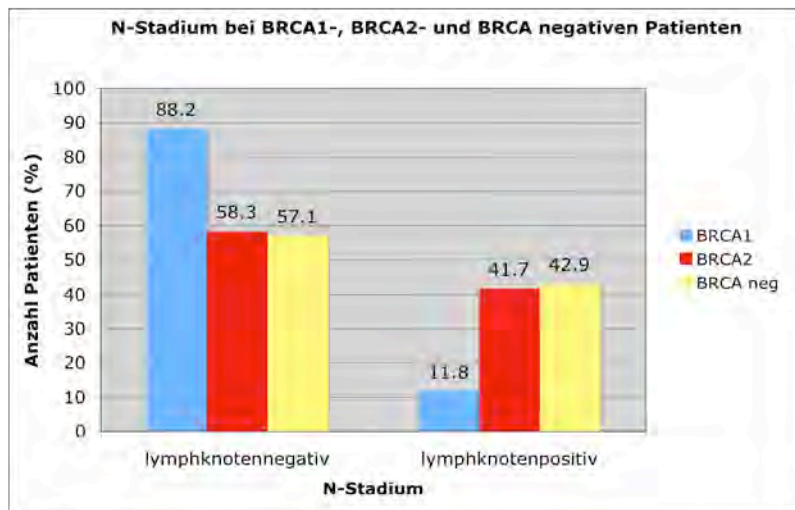
Tabelle 13: Tumorgösse bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon)

BRCA-Status	N	Grössenmittelwert (cm)	Mittelwertsunterschied	Sig.
BRCA1	14	2.021	-0.334	0.569
BRCA2	9	2.356		
BRCA1	14	2.021	0.032	0.525
BRCA negativ	89	1.99		
BRCA2	9	2.356	0.366	0.202
BRCA negativ	89	1.99		

**N-Stadium:** Beim Vergleich der weiteren Stadien in der TNM-Klassifikation kann man aus Abbildung 12 erkennen, dass in der BRCA1-Gruppe nur zwei Patienten (11.8% aller BRCA1-Patienten) eine Lymphknoteninfiltration zeigen. So sind beim grössten Teil der Patienten der BRCA1-Gruppe, nämlich bei 15 Patienten (88.2%) die resezierten Lymphknoten tumorfrei.

In den zwei anderen Gruppen (BRCA2 und BRCA negativ) ist der Häufigkeitsunterschied nicht so gross. In beiden Gruppen sind ungefähr 58% der Fälle lymphknotennegativ und etwa 42% lymphknotenpositiv.

Abbildung 12: N-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



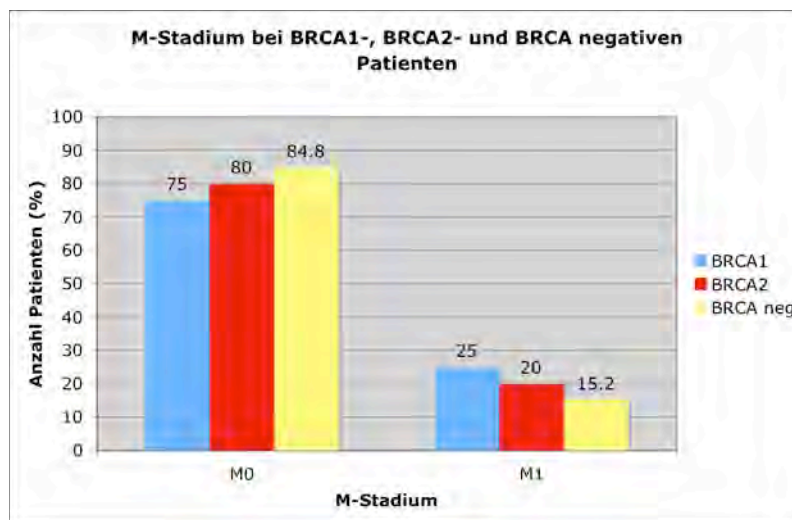
Die Verteilung in der Kreuztabelle ist gemäss Pearson  $\chi^2$  knapp nicht signifikant. Laut Gamma besteht jedoch eine positive Korrelation zwischen dem N-Stadium und dem BRCA-Status.

Tabelle 14: N-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test)

N-Stadium	BRCA1	BRCA2	BRCAneg	Pearson $\chi^2$	Gamma
LK negativ	15	7	56	5.963 (p=0.051)	0.422 (p=0.028)
LK positiv	2	5	42		

**M-Stadium:** Fernmetastasen treten in den drei Gruppen unterschiedlich häufig auf. So hat ein Viertel der BRCA1-Patienten Metastasen, das heisst bei einem Patienten von vier hat das Mammakarzinom andere Organe infiltriert. Von den restlichen 14 Patienten dieser Gruppe ist das M-Stadium nicht bekannt (n=18). In der zweiten Gruppe mit den BRCA2-Patienten zeigt ein Fünftel der Fälle Metastasen, das heisst bei einem von fünf Patienten waren andere Organe vom Krebs befallen, bei den restlichen acht Patienten der BRCA2-Gruppe fehlt der Pathologiebefund (n=13). In der letzten Gruppe mit den BRCA negativen Patienten finden wir am wenigsten Metastasen. Bei nur 15.2 % der Patienten wurden Fernmetastasen entdeckt (fünf Patienten von 28 mit bekanntem M-Stadium, n=112).

Abbildung 13: M-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten

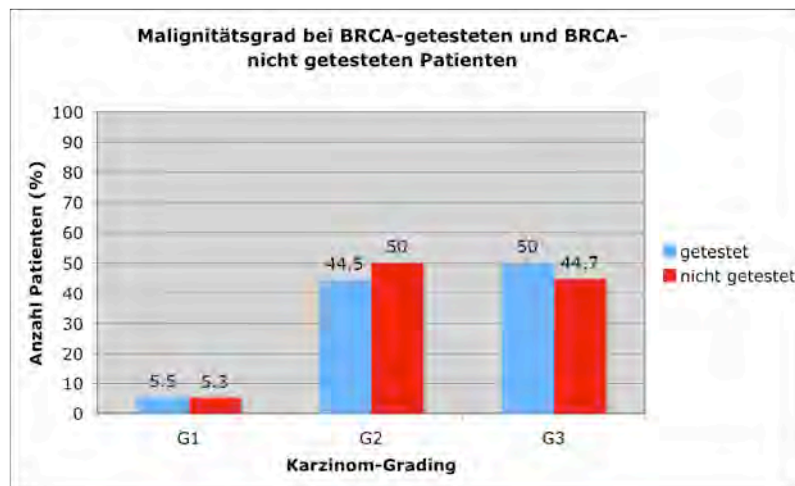


Diese Unterschiede können statistisch nicht bewertet werden. Die Anzahl Patienten, bei denen die Daten zum M-Stadium fehlen, ist zu gross. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass in solchen Fällen zum Zeitpunkt der Diagnose keine Metastasen vorlagen. So wäre in den Gruppen die Anzahl metastasennegativer Patienten tatsächlich viel höher.

### 3.4.3 Malignitätsgrad nach Bloom und Richardson

Wie steht es mit dem Malignitätsgrad der Karzinome von BRCA-getesteten Patienten im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe? Abbildung 14 zeigt ein gehäuftes Vorkommen der Karzinome in den höheren zwei Malignitätsgraden (G2 und G3). Bei 57 BRCA-getesteten Patienten (44.5% der Fälle) zeigen die histologischen Schnitte ein G2-Karzinom. Bei den BRCA-ungetesteten Patienten sind es 50%. Bei 64 BRCA-getesteten Patienten (50% der Fälle) wurde ein maligneres Karzinom diagnostiziert, also ein G3-Karzinom, bei den Ungetesteten sind es hingegen nur 44.7%. Als G1-Karzinom werden bei den BRCA-getesteten Patienten nur sieben Tumoren (5.5%) bewertet.

Abbildung 14: Malignitätsgrad bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten



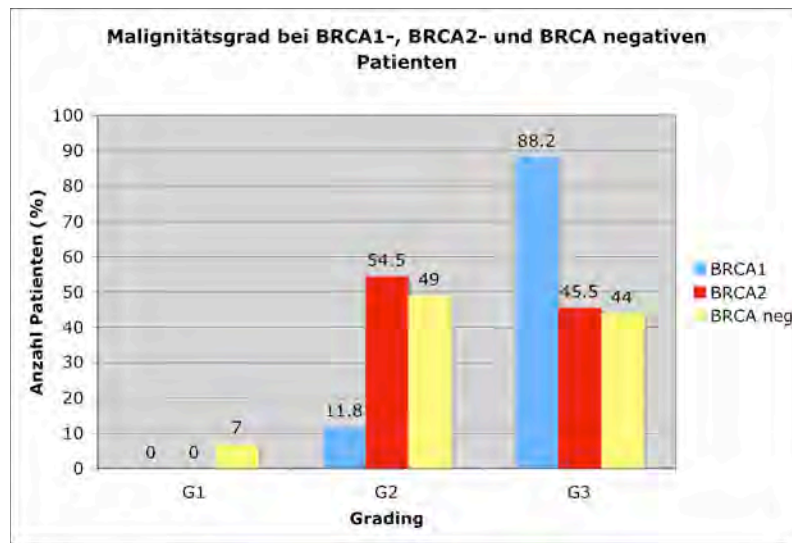
Beim Vergleich des Malignitätsgrades zwischen den BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 15: Malignitätsgrad bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA	G1	G2	G3	Pearson $\chi^2$	Gamma
nicht getestet	6	57	51	0.739 (p=0.691)	0.088 (p=0.460)
getestet	7	57	64		

BRCA1-Karzinome scheinen sich klar von den anderen zwei BRCA-Gruppen abzugrenzen. In der BRCA1-Gruppe ist sehr vielen Tumoren der höchste Malignitätsgrad zugeteilt worden. 88.2% dieser Patienten, das sind insgesamt 15 Patienten, haben einen G3-Tumor und nur 11.8% haben einen besser differenzierten Tumor (nur zwei BRCA1-Patienten). G1-Tumore findet man in dieser Stichprobe gar nicht. In der BRCA2-Gruppe und BRCA negativen Gruppe hingegen ist der Häufigkeitsunterschied zwischen G2 und G3 nicht so gross. 54.5% der BRCA2-Patienten haben einen G2-Tumor, 45.5% haben einen G3-Tumor. In der BRCA negativen Gruppe haben 49% der Patienten einen G2-Tumor und 44% einen G3-Tumor. In dieser Gruppe findet man auch gut differenzierte Tumore (G1).

Abbildung 15: Malignitätsgrad bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Der  $\chi^2$ -Test zeigt, dass eine stark positive Korrelation zwischen BRCA1-Mutation und geringem Malignitätsgrad besteht. Er zeigt auch, dass es eine negative Korrelation zwischen Wildtyp-BRCA und geringem Malignitätsgrad gibt, BRCA negative Patienten haben signifikant häufiger besser differenzierte Tumoren, im Vergleich zu BRCA1- und BRCA2-Patienten. BRCA2-Tumore scheinen sich in Bezug auf das Malignitätsgrad nicht von den anderen zwei Gruppen zu unterscheiden. Die Abbildung 15 zeigt jedoch, dass sich BRCA2-Tumore tendenziell eher wie BRCA negative Tumore verhalten.

Tabelle 16: Malignitätsgrad bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test)

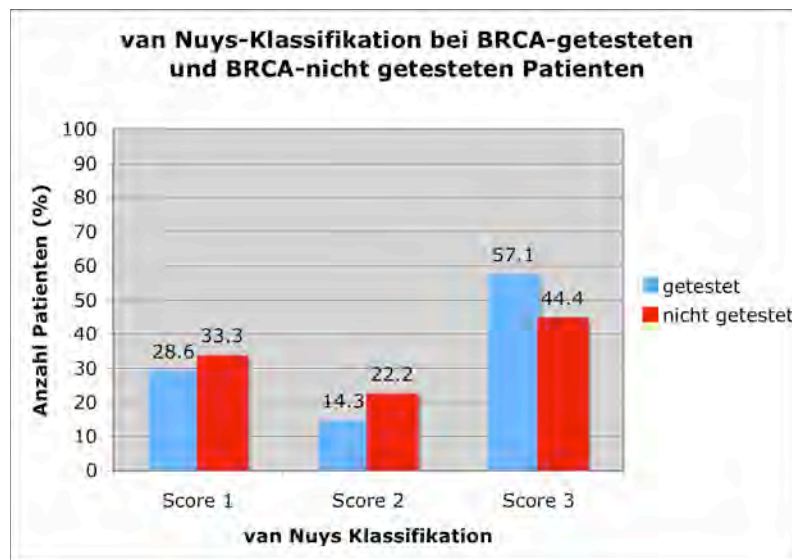
BRCA-Status	G1	G2	G3	Pearson $\chi^2$	Gamma
BRCA1	0	2	15	11.530 (p=0.003)	0.812 (p=0.000)
BRCA2 + neg	7	55	49		
BRCA2	0	6	5	0.979 (p=0.631)	-0.032 (p=0.909)
BRCA1 + neg	7	51	59	7.301 (p=0.026)	-0.539 (p=0.004)
BRCAneg	7	49	44		
BRCA1 + 2	0	8	20		



### 3.4.4 Van Nuys-Klassifikation bei duktalem in situ Karzinomen

Die Einteilung aller DCIS unseres BRCA-getesteten Kollektivs in van Nuys-Gruppen 1 bis 3 (Tabelle 3) zeigt, dass die meisten in situ Karzinome einen van Nuys-Score 3 besitzen. Bei den BRCA-getesteten Patienten zählt man vier hochgradige in situ Karzinome (57.1%) und gibt ihnen einen van Nuys-Score 3. In der BRCA nicht getesteten Patientengruppe sind es nur 44.4% der Tumore. Zwei BRCA-getestete in situ Karzinome (28.6%) haben einen van Nuys-Score 1, in der nicht getesteten Gruppe sind es 33.3%. Einen van Nuys-Score 2 besitzt nur ein BRCA-getesteter Tumor (14.3% aller DCIS der getesteten Gruppe versus 22.2% in der nicht getesteten Gruppe).

Abbildung 16: van Nuys-Score bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten



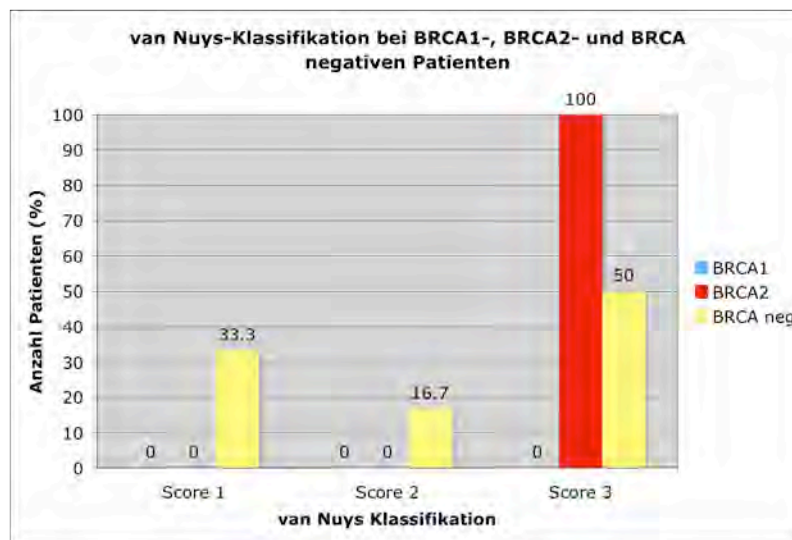
Die Abbildung zeigt, dass die BRCA-getesteten Tumore tendenziell eher als hochgradig (van Nuys-Score 3) eingestuft werden. Bei solchen kleinen Fallzahlen (nur 16 DCIS mit bekannter van Nuys-Klassifikation) können jedoch keine Aussagen gemacht werden. Ausserdem zeigt der statistische Vergleich der van Nuys-Klassifikation, dass es zwischen der getesteten und der ungetesteten Gruppe keine signifikanten Unterschiede gibt.

Tabelle 17: van Nuys-Score bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA	van Nuys 1	van Nuys 2	van Nuys 3	Pearson $\chi^2$	Gamma
nicht getestet	3	2	4	0.288 (p=0.866)	0.179 (p=0.676)
getestet	2	1	4		

Bei der Aufteilung des BRCA-getesteten Kollektivs in die drei verschiedenen BRCA-Gruppen fällt auf, dass es unter den Patienten der BRCA1-Gruppe nur ein einziges duktales in situ Karzinom gibt. Dessen van Nuys-Score ist unbekannt. In der BRCA2-Gruppe gibt es zwei DCIS. Eines davon besitzt einen van Nuys-Score 3 (100%), beim anderen ist der van Nuys-Score unbekannt. In der Gruppe der BRCA negativen Patienten hingegen beobachtet man, dass sich die in situ Karzinome mehr in die drei van Nuys-Gruppen verteilen. 33.3% der in situ Karzinome werden als nicht hochgradig ohne Komedonekrose (Nuys-Score 1) klassifiziert, 16.7% haben einen van Nuys-Score 2, und 50% werden als hochgradig in situ Karzinome eingeteilt (van Nuys-Score 3).

Abbildung 17: van Nuys-Score bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Ein statistischer Vergleich mit dem  $\chi^2$ -Test kann nicht durchgeführt werden, da es im Kollektiv zu wenig in situ Karzinome vom duktalem Typ gibt (n=1 für BRCA1, n=2 für BRCA2).

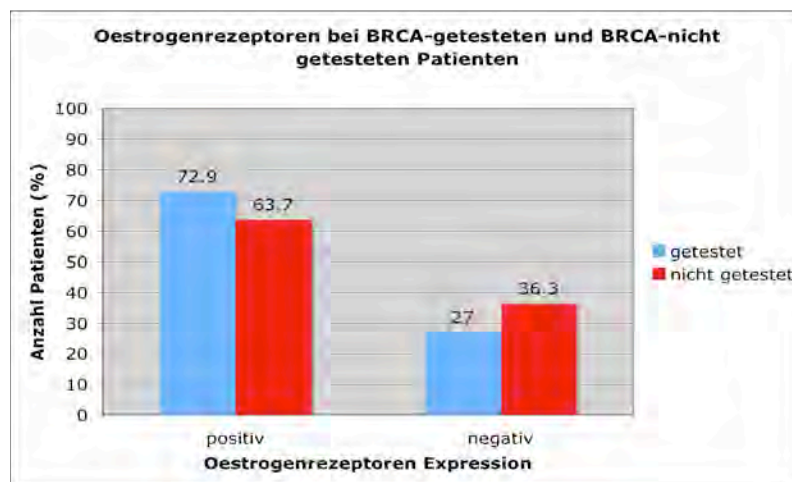
### 3.5 Expression von Hormonrezeptoren in den Tumorzellen

In unserer BRCA-getesteten Gruppe exprimieren die meisten Tumore die Hormonrezeptoren, sowohl die Oestrogen- wie auch die Progesteronrezeptoren. Wir werden danach dieses Grundkollektiv nach BRCA-Status in weitere drei Gruppen aufteilen, um zu verstehen, wie die Expression der Hormonrezeptoren mit der Mutation des BRCA-Genes variiert. Die Bewertung der Expression der Hormonrezeptoren wird mit dem IRS-Score nach Remmele und Stegner gemacht (Tabelle 7). In der vorliegenden Studie gelten als hormonrezeptornegativ alle Tumore mit einem IRS von 0-2, als positiv alle Tumore mit einem IRS von 3-12. Die Differenzierung zwischen schwacher, mittelmässiger und starker Expression kann wegen fehlender Information (IRS nicht immer angegeben) in den Pathologiebefunden hier nicht gemacht werden.

#### 3.5.1 Oestrogenrezeptoren

Nach einer Einteilung der Tumore unseres BRCA-getesteten Kollektivs in ER-positiv und ER-negativ, erstellen wir Abbildung 18 die uns zeigt, dass in einer grossen Mehrheit der Tumore die Rezeptoren nachgewiesen werden können. 89 BRCA-getestete Tumore (72.9%) sind ER-positiv, hingegen nur 33 Tumore (27%) exprimieren keine Oestrogenrezeptoren. Bei der nicht getesteten Gruppe gibt es etwas weniger (63.7%) ER-positive und etwas mehr (36.3%) ER-negative Tumore.

Abbildung 18: Oestrogenrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten



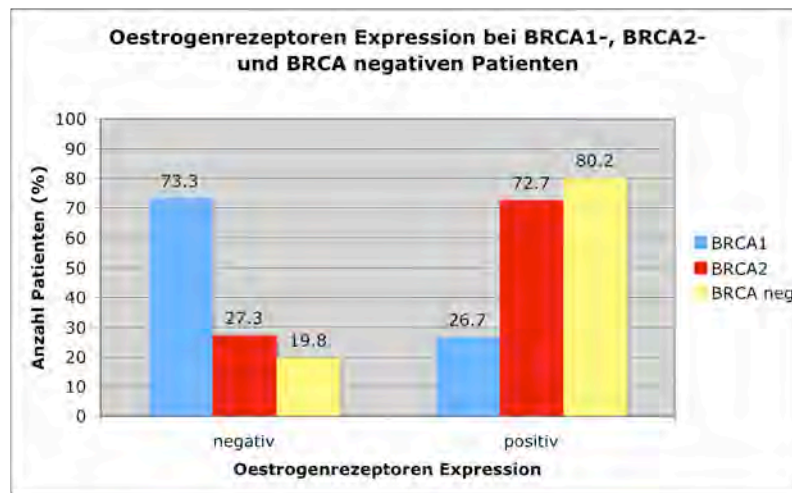
Statistisch gesehen unterscheiden sich die zwei Gruppen bezüglich der Oestrogenrezeptoren Expression nicht signifikant.

Tabelle 18: Oestrogenrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA	ER-negativ	ER-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
nicht getestet	41	72	2.319 (p=0.128)	0.211 (p=0.127)
getestet	33	89		

BRCA negative Tumoren besitzen in den meisten Fällen Oestrogenrezeptoren. Hingegen sind BRCA1-Tumore eher ER-negativ, besitzen also keine Oestrogenrezeptoren. Die BRCA2-Gruppe ist der BRCA negativen Gruppe ähnlich. Auch sie zeigt eine Verteilung mit mehr ER-positiven Tumoren als ER-negativen Tumoren. In der Gruppe der BRCA1-Patienten hat man elf ER-negative Tumore diagnostiziert (73.3%). Vier der übrigen Patienten haben ein ER-positives Karzinom (26.7%). Bei den übrigen Patienten dieser Gruppe ist der Oestrogenrezeptoren-Status nicht bekannt (drei Patienten, n=18). In der BRCA2- und der BRCA negativen Gruppe gibt es 72.7% beziehungsweise 80.2% Tumore, die Oestrogenrezeptoren exprimieren.

Abbildung 19: Oestrogenrezeptoren bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Deutlich zu erkennen ist, dass die Karzinome mit BRCA1-Mutation signifikant seltener Oestrogenrezeptoren exprimieren als die Karzinome mit BRCA2-Mutation oder ohne BRCA-Mutation. Die Expression von Oestrogenrezeptoren korreliert umgekehrt mit der BRCA1-Mutation. Die BRCA2-Tumore hingegen grenzen sich nicht klar von BRCA1- und BRCA negativen Tumoren ab, obwohl die Häufigkeitsgrafik oben suggeriert, dass sie wie die BRCA negativen Tumore häufiger Oestrogenrezeptoren besitzen. Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Wildtyp-BRCA und der Expression von Oestrogenrezeptoren. Diese Tumore sind signifikant häufiger ER-positiv im Vergleich zu BRCA1/2-assoziierten Tumoren.

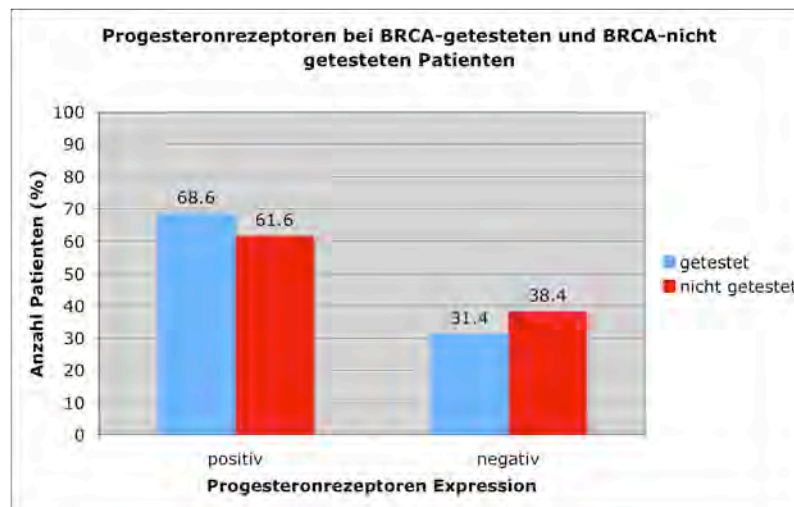
Tabelle 19: Oestrogenrezeptoren bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA-Status	ER-positiv	ER-negativ	Pearson $\chi^2$	Gamma
BRCA1	4	11	18.567 (p=0.000)	-0.828 (p=0.001)
BRCA2 + neg	85	22		
BRCA2	8	3	0.000 (p=0.986)	-0.006 (p=0.969)
BRCA1 + neg	81	30	12.024 (p=0.001)	0.651 (p=0.003)
BRCA neg	77	19		
BRCA1 + 2	12	14		

### 3.5.2 Progesteronrezeptoren

Die Verteilung in Abbildung 20 für den Progesteronrezeptoren-Status sieht ähnlich aus, wie in der Abbildung 18 für Oestrogenrezeptoren. Auch hier sind die meisten BRCA-getesteten Tumore PR-positiv (die Tumorzellen exprimieren den Progesteronrezeptor). In der BRCA-getesteten Gruppe konnte in 83 Tumoren (68.6%) Progesteronrezeptoren gefunden werden. Nur 38 Tumore hingegen erweisen sich als PR-negativ (31.4% aller untersuchten Gewebstücke).

Abbildung 20: Progesteronrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten



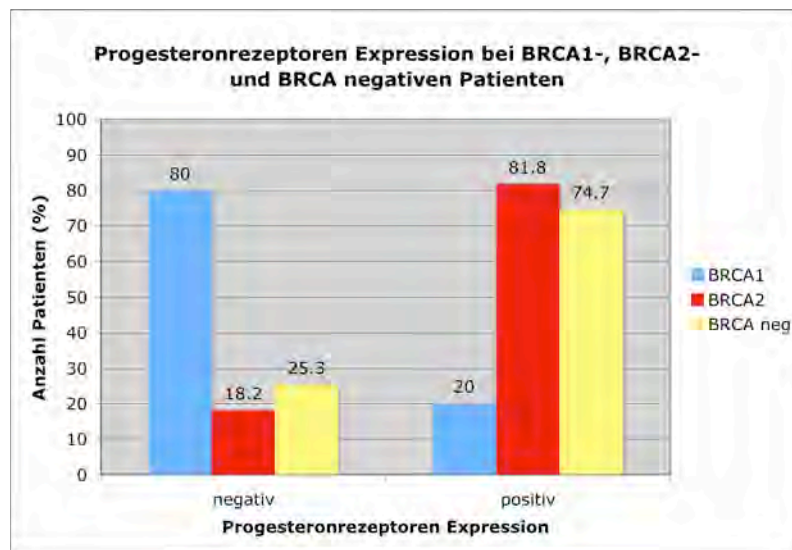
Statistisch gesehen unterscheiden sich die zwei Gruppen bezüglich der Expression von Progesteronrezeptoren nicht signifikant.

Tabelle 20: Progesteronrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA	PR-negativ	PR-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
nicht getestet	43	69	1.252 (p=0.263)	0.153 (p=0.263)
getestet	38	83		

Der Vergleich der verschiedenen BRCA-Gruppen untereinander zeigt, wie bei den Oestrogenrezeptoren, eine hohe Expressionsrate von Progesteronrezeptoren in der BRCA2- und BRCA negativen Gruppe. In der Gruppe der BRCA2-Patienten sind 81.8% der Tumore, in der Gruppe der BRCA negativen Patienten 74.7% der Tumore PR-positiv. Hingegen nur 20% der BRCA1-Tumore sind PR-positiv; das sind drei Patienten. In derselben Gruppe findet man also zwölf PR-negative Tumore (80%), bei den restlichen Patienten (drei Patienten, n=18) war der Progesteronrezeptoren-Status in den Pathologiebefunden nicht vermerkt.

Abbildung 21: Progesteronrezeptoren bei BRCA1, BRCA2 und BRCA negativen Patienten



Auch hier ist zu erkennen, dass die Karzinome mit BRCA1-Mutation signifikant seltener Progesteronrezeptoren exprimieren als die Karzinome mit BRCA2-Mutation oder ohne BRCA-Mutation. Wie auch bei den Oestrogenrezeptoren verhält sich die BRCA2-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen, obwohl sie laut Häufigkeitsgrafik häufiger Progesteronrezeptoren zu besitzen scheint, und somit der BRCA negativen Gruppe ähnlicher ist. BRCA negative Patienten sind signifikant häufiger PR-positiv im Vergleich zu BRCA1- und BRCA2-Patienten.

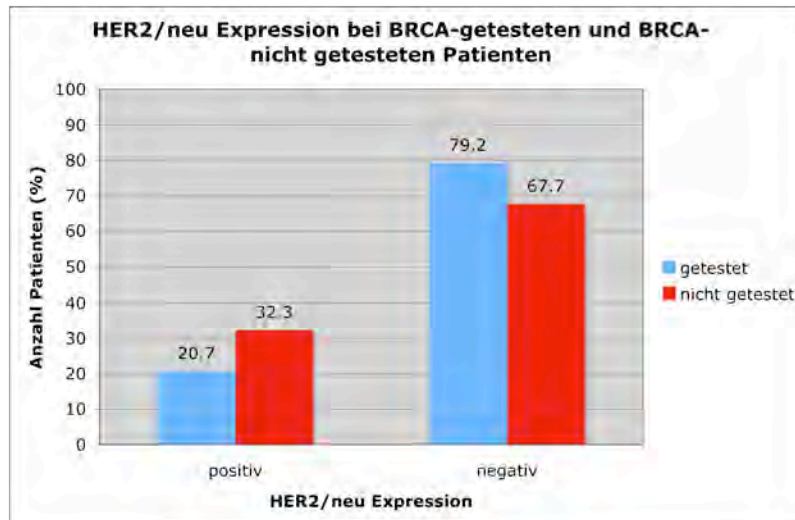
Tabelle 21: Progesteronrezeptoren bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA-Status	PR-positiv	PR-negativ	Pearson $\chi^2$	Gamma
BRCA1	3	12	18.770 (p=0.000)	-0.850 (p=0.001)
BRCA2 + neg	80	26		
BRCA2	9	2	0.982 (p=0.322)	0.373 (p=0.264)
BRCA1 + neg	74	36		
BRCAneg	71	24	7.742 (p=0.005)	0.551 (p=0.012)
BRCA1 + 2	12	14		

### 3.6 HER2/neu Expression

Bei den BRCA-getesteten Patienten finden wir in nur 53 Pathologiebefunden Hinweise zum HER2/neu-Status des untersuchten Gewebes. Bei den anderen 90 Gewebstücken wurde die Untersuchung sehr wahrscheinlich nicht durchgeführt. Auf eine Einteilung der Expression in schwach, mittel und stark muss verzichtet werden, die Tumoren nennen wir hier entweder HER2/neu-positiv (exprimieren HER2/neu) oder HER2/neu-negativ (exprimieren HER2/neu nicht oder nur schwach). 42 der 53 untersuchten BRCA-getesteten Patienten (79.2%) zeigen keine spezifische Färbung für HER2/neu, was bedeutet, dass der Tumor dieses Protein nicht produziert. Die restlichen elf Patienten (20.7%) haben Tumoren, die HER2/neu exprimieren. Bei den BRCA nicht getesteten Patienten sind etwas mehr Tumore HER2/neu positiv (32.3%).

Abbildung 22: HER2/neu Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten



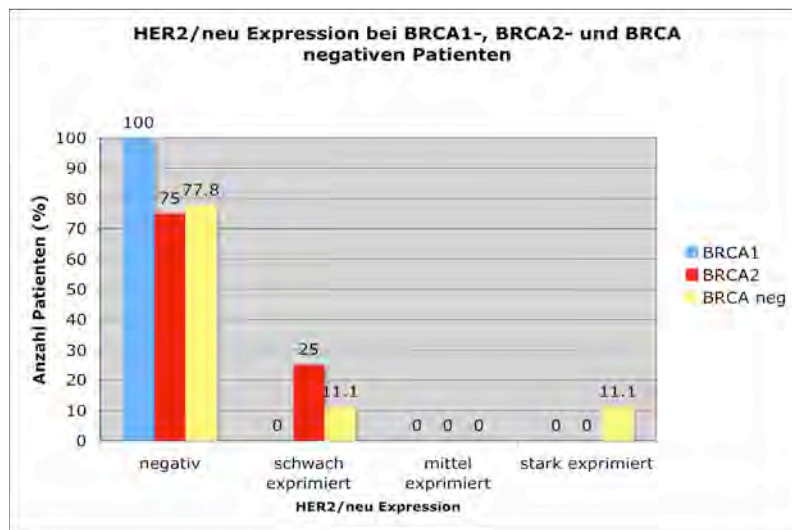
Die Expression von HER2/neu bei getesteten und nicht getesteten Patienten zeigt im statistischen Vergleich keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 22: HER2/neu Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA	HER2/neu-negativ	HER2/neu-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
nicht getestet	42	20	1.920 (p=0.166)	-0.290 (p=0.158)
getestet	42	11		

Wir kennen bei nur vier der 18 BRCA1-Patienten den HER2/neu-Status des Karzinoms. Alle vier Tumoren sind HER2/neu-negativ. Das heisst, dass keiner dieser Tumoren das Protein exprimiert. In der BRCA2-Gruppe (n=13) exprimiert einer der vier HER2/neu-getesteten Tumoren (25%) das Protein. In der grösseren Gruppe der BRCA negativen Patienten sind 22.5% der Tumoren HER2/neu-positiv, bei 77.8% konnte keine spezifische Färbung beobachtet werden (45 HER2/neu-getestete Tumore, n=112). Im Allgemeinen kann man erkennen, dass die Mehrzahl der Tumoren HER2/neu-negativ ist, unabhängig vom BRCA-Status.

Abbildung 23: HER2/neu Expression bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Man erhält beim Vergleich der Expression von HER2/neu keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Bei einer so kleinen Anzahl Patienten mit bekanntem HER2/neu-Status kann keine sinnvolle statistische Bewertung durchgeführt werden.

Tabelle 23: HER2/neu Expression bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test)

BRCA-Status	HER2/neu-positiv	HER2/neu-negativ	Pearson $\chi^2$	Gamma
BRCA1	0	4	1.133 (p=0.287)	-1.000 (p=0.052)
BRCA2 + neg	11	38		
BRCA2	1	3	0.047 (p=0.828)	0.130 (p=0.838)
BRCA1 + neg	10	39		
BRCAneg	10	35	0.390 (p=0.532)	0.333 (p=0.471)
BRCA1 + 2	1	7		

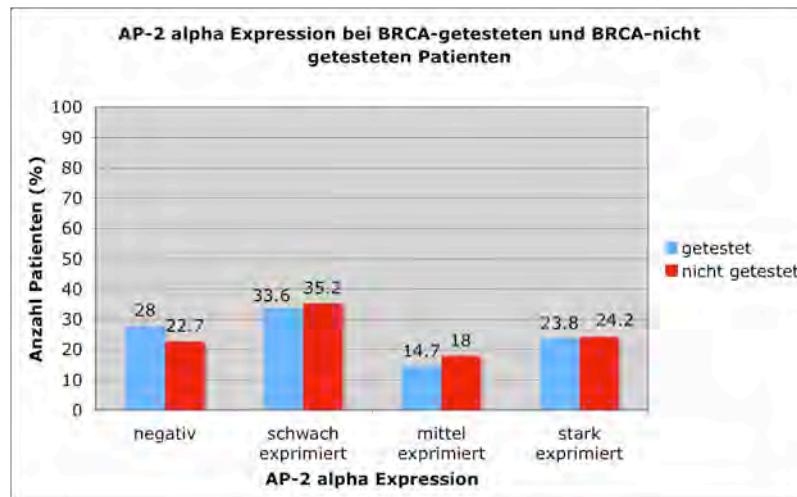


## 3.7 Expression von Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie in den Tumorzellen

### 3.7.1 AP-2 $\alpha$ -Expression

Wir haben in jedem Gewebstück nach AP-2 $\alpha$  gesucht und jedem Tumor einen entsprechenden Remmele-Score zugeteilt (Tabelle 7). Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Expression zeigt Abbildung 24: Die meisten Tumoren unserer BRCA-getesteten Gruppe exprimieren AP-2 $\alpha$  nur schwach, das sind 48 Schnittpräparate (33.6%). 40 Präparate (28%) lassen sich nicht spezifisch auf AP-2 $\alpha$  färben. 21 BRCA-getestete Patienten (14.7%) haben einen Tumor mit mittelstarker AP-2 $\alpha$ -Expression. Bei 34 Patienten (23.8%) findet man Tumorzellen mit starker Expression von AP-2 $\alpha$ . Aus diesen Zahlen lässt sich sagen, dass etwas mehr als die Hälfte aller BRCA-getesteten Patienten (61.6%) an Tumoren erkrankten, die AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach exprimieren. In der nicht getesteten Gruppe ist die Verteilung ähnlich.

Abbildung 24: AP-2 $\alpha$  Expression bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten



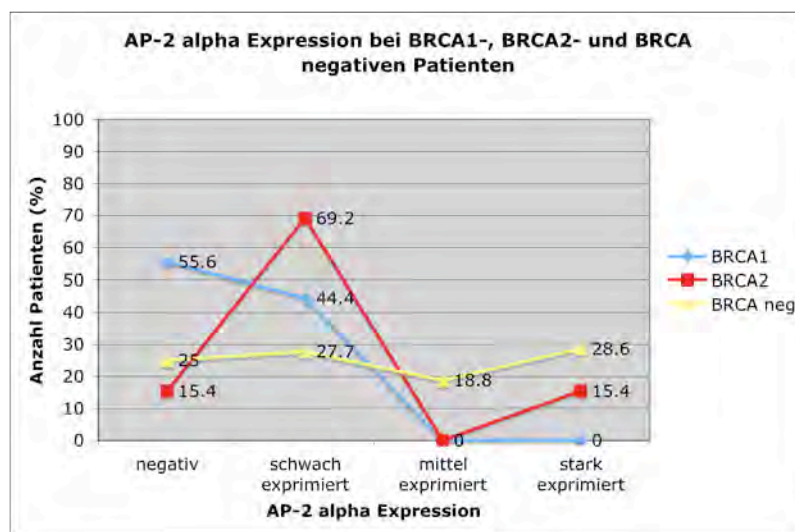
Es ergibt sich beim statistischen Vergleich der AP-2 $\alpha$ -Expression bei der BRCA-getesteten und der ungetesteten Gruppe keine Signifikanz.

Tabelle 24: AP-2 $\alpha$ -Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten (Wilcoxon)

BRCA	N	AP-2 $\alpha$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
getestet	143	5.83	-0.61	0.203
nicht getestet	127	6.45		

Wir wollen nun sehen, ob die AP-2 $\alpha$ -Expression abhängig vom BRCA-Status ist. Bei den BRCA1-Karzinomen ist in den meisten Tumorzellen AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach exprimiert. Man findet in dieser Gruppe zehn Patienten mit AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren, das sind 55.6% aller Patienten dieser Gruppe. Die anderen acht Patienten (44.4%) haben einen Tumor, der AP-2 $\alpha$  nur schwach exprimiert. Es gibt keine Tumoren, die AP-2 $\alpha$  mittel oder stark exprimieren. Bei den meisten Patienten der BRCA2-Gruppe (69.2%) findet man einen Tumor mit schwacher AP-2 $\alpha$ -Expression. Nur 15.4% haben einen AP-2 $\alpha$ -negativen Tumor und die restlichen 15.4% haben einen Tumor mit starker AP-2 $\alpha$ -Expression. In der BRCA negativen Gruppe ist die Verteilung sehr homogen. Es gibt ähnlich viele Tumoren in jeder Expressionsgruppe.

Abbildung 25: AP-2 $\alpha$ -Expression bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Wir vergleichen die Durchschnittswerte des IRS (Tabelle 7) der drei Gruppen. Es ergeben sich dabei signifikante Unterschiede zwischen der BRCA1- und der BRCA2-Gruppe sowie zwischen der BRCA1- und der BRCA negativen Gruppe. Die Karzinome mit BRCA1-Mutation besitzen signifikant niedrigere Scores im Vergleich zu den Karzinomen mit BRCA2-Mutation oder ohne BRCA-Mutation. Die BRCA2-Karzinome unterscheiden sich hingegen nicht signifikant von BRCA negativen Karzinomen, sie scheinen sich in Bezug auf die AP-2 $\alpha$ -Expression ähnlich zu verhalten wie die BRCA negativen Karzinome.

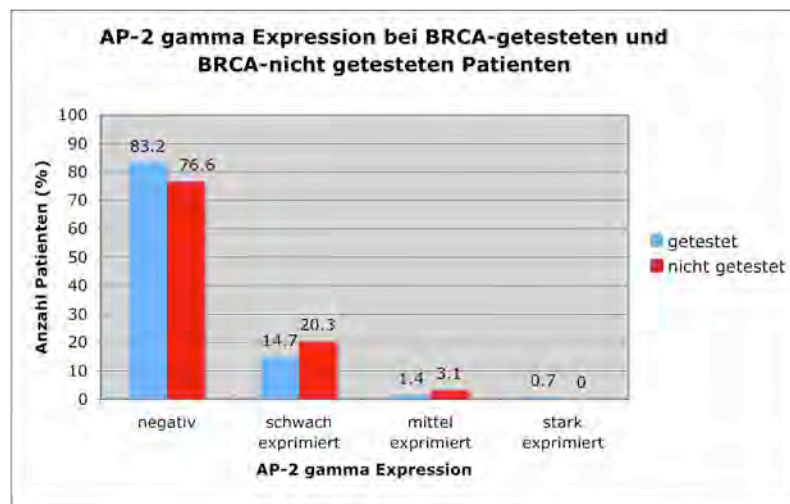
Tabelle 25: AP-2 $\alpha$ -Expression bei BRCA1, BRCA2 und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon)

BRCA Status	N	AP-2 $\alpha$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
BRCA1	18	1.89		
BRCA2	13	5.08	-3.19	0.005
BRCA1	18	1.89		
BRCAneg	112	6.55	-4.66	0.000
BRCA2	13	5.08		
BRCAneg	112	6.55	-1.48	0.350

### 3.7.2 AP-2 $\gamma$ -Expression

Die folgende Abbildung zeigt, dass im Allgemeinen die Tumorzellen weniger AP-2 $\gamma$  exprimieren als AP-2 $\alpha$ . In den meisten Gewebstücken kann kein AP-2 $\gamma$ -Protein nachgewiesen werden. 119 BRCA-getestete Tumoren (83.2%) gelten als AP-2 $\gamma$ -negativ. Eine schwache AP-2 $\gamma$ -Expression zeigt sich in 21 Tumoren (14.7%). In die Gruppe der mittelmässigen Expression werden zwei Tumoren (1.4%) eingeteilt und nur ein Tumor (0.7%) produziert AP-2 $\gamma$  stark. Die BRCA ungetesteten Patienten erkrankten an Karzinomen, die sich ähnlich bezüglich der AP-2 $\gamma$ -Expression verhalten wie die Karzinome der BRCA-getesteten Patienten.

Abbildung 26: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten



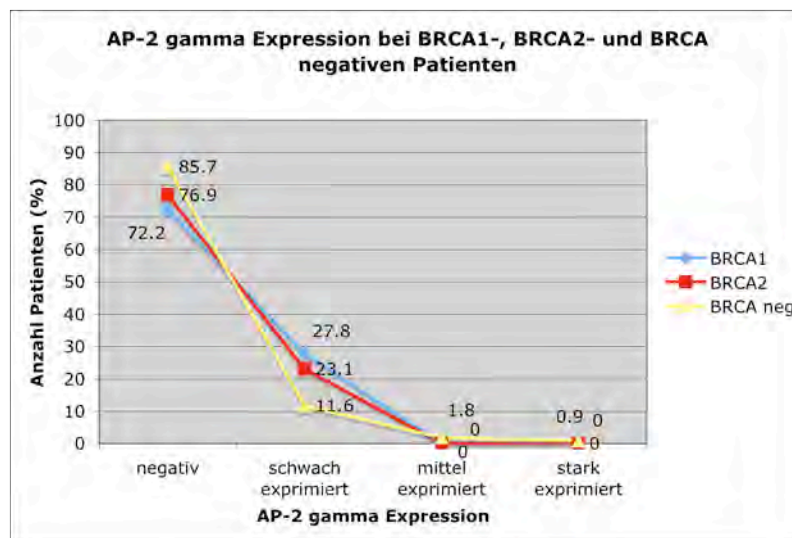
Wie bei AP-2 $\alpha$  zeigt der Vergleich der AP-2 $\gamma$ -Expression zwischen der BRCA-getesteten und der ungetesteten Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 26: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten (Wilcoxon)

BRCA	N	AP-2 $\gamma$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
getestet	143	1.22	-0.26	0.245
nicht getestet	127	1.48		

Wie schon gezeigt, exprimieren alle Tumoren, unabhängig vom BRCA-Status, AP-2 $\gamma$  gar nicht oder nur schwach. Man beschreibt bei 13 BRCA1-Patienten (72%) AP-2 $\gamma$ -negative Tumoren. Der Rest der 18 BRCA1-Patienten (fünf Patienten, 27.8%) haben Tumoren, die AP-2 $\gamma$  nur schwach exprimieren. In den zwei anderen Gruppen (BRCA2- und BRCA negative Mammakarzinome) exprimiert auch die Mehrheit der Tumoren das Protein nicht. Verglichen mit der BRCA1-Gruppe gibt es etwas mehr Tumoren, die den Transkriptionsfaktor nicht exprimieren (76.9% bei BRCA2-, 85.7% bei BRCA negativen Patienten) und etwas mehr Tumoren, die den Transkriptionsfaktor schwach exprimieren (23.1% bei BRCA2-, 11.6% bei BRCA negativen Patienten). Man findet aber in der BRCA negativen Gruppe Patienten mit mittelstark oder stark AP-2 $\gamma$  exprimierenden Tumoren. Ein Grund für diese Verteilung könnte sein, dass diese Gruppe mehr Patienten beinhaltet.

Abbildung 27: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten



Die Unterschiede zwischen den Durchschnittswerten des IRS (Tabelle 7) erweisen sich mit dem Wilcoxon-Test bei allen drei Gruppen als nicht signifikant.

Tabelle 27: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA1, BRCA2 und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon)

BRCA-Status	N	AP-2 $\gamma$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
BRCA1	18	1.5	-0.04	0.588
BRCA2	13	1.54		
BRCA1	18	1.5	0.37	0.349
BRCAneg	112	1.13		
BRCA2	13	1.54	0.40	0.083
BRCAneg	112	1.13		

### 3.7.3 Korrelation von Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie mit verschiedenen pathologischen Parametern

In den folgenden Kapiteln wollen wir die Expression der Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in Relation mit dem BRCA-Status, pT-Stadium, Malignitätsgrad, dem Hormonrezeptorenstatus und der Expression von HER2/neu bei unserem Kollektiv von BRCA-getesteten Patienten setzen. Ziel ist es zu sehen, ob die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  mit diesen Merkmalen beim familiären Mammakarzinom einen Zusammenhang hat. Wir werden auch untersuchen, ob die Expression dieser Transkriptionsfaktoren mit dem histologischen Karzinomtyp korreliert.

**BRCA-Status:** Zunächst soll analysiert werden, ob eine Korrelation zwischen der Expression von AP-2 $\alpha$  und dem BRCA-Status beim familiären Brustkrebs existiert. Wir erstellen dazu eine Kreuztabelle. Es zeigt sich eine Verteilung, die gemäss Pearson  $\chi^2$  nicht zufällig ist. Die Gruppen BRCA1 und BRCA2 beinhalten jedoch sehr wenig Fälle (n=18 bzw. n=13). Eine Interpretation der Ergebnisse wird daher trotz signifikantem Pearson  $\chi^2$  schwierig. Tendenziell exprimieren BRCA negative Tumore im Kollektiv den Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$  stärker als BRCA1- oder BRCA2-assoziierte Tumoren. BRCA1-assoziierte Tumore hingegen exprimieren AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach und keiner der BRCA1-Tumore exprimiert AP-2 $\alpha$  mittelmässig oder stark. Nur zwei BRCA2-assoziierte Mammakarzinome exprimieren AP-2 $\alpha$  stark, bei den BRCA negativen Tumoren sind es 32, wobei diese Gruppe viel mehr Patienten hat (n=112).

Tabelle 28: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit BRCA-Status ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\alpha$ -Expression	BRCA1	BRCA2	BRCAneg	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	10	2	28	24.264 (p=0.000)	0.515 (p=0.000)
schwach exprimiert	8	9	31		
mittel exprimiert	0	0	21		
stark exprimiert	0	2	32		

Auch bei der Expression von AP-2 $\gamma$  können mittels  $\chi^2$ -Test keine Aussagen über eine allfällige Korrelation mit dem BRCA-Status getroffen werden. Ausserdem zeigt Pearson  $\chi^2$ , dass die Verteilung der Zahlen in der Kreuztabelle zufällig ist. Es ist wahrscheinlich, dass zwischen den beiden Variablen keine Korrelation besteht.

Tabelle 29: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit BRCA-Status ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\gamma$ -Expression	BRCA1	BRCA2	BRCAneg	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	13	10	96	4.685 (p=0.585)	-0.310 (p=0.197)
schwach exprimiert	5	3	13		
mittel exprimiert	0	0	2		
stark exprimiert	0	0	1		

**pT-Stadium:** Die folgende Kreuztabelle zeigt eine Verteilung, die laut Pearson  $\chi^2$  nicht zufällig ist. Wir beobachten in unserem Kollektiv von BRCA-getesteten Patienten eine Anhäufung von mittelmässiger und starker AP-2 $\alpha$ -Expression in den niedrigen pT-Stadien der Karzinome (in situ Karzinome und pT1). Während es acht AP-2 $\alpha$ -stark exprimierende in situ Karzinome und 15 AP-2 $\alpha$ -stark exprimierende pT1-Karzinome gibt, können wir in unserem Kollektiv kein pT3-Karzinom finden, das AP-2 $\alpha$  so stark exprimiert. Lediglich zwei pT4-Karzinome exprimieren AP-2 $\alpha$  stark. Unter den fortgeschrittenen Karzinomen (pT3 und pT4) exprimieren die meisten AP-2 $\alpha$  nur schwach oder gar nicht. Leider gibt es für eine statistisch begründete Aussage über eine Korrelation zu wenig pT3- und pT4-Karzinome, sodass hier genannte Beobachtungen trotz signifikantem Pearson  $\chi^2$  nur als eine Tendenz angesehen werden müssen. Fortgeschrittene Tumore exprimieren tendenziell selten den Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$ .

Tabelle 30: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit pT-Stadium ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\alpha$ -Expression	is	pT1	pT2	pT3	pT4	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	0	22	13	0	4	22.396 (p=0.033)	-0,267 (p=0.012)
schwach exprimiert	2	21	19	2	2		
mittel exprimiert	4	11	6	0	0		
stark exprimiert	8	15	9	0	2		

Wie erwähnt, ist die Expression von AP-2 $\alpha$  tendenziell abhängig vom Stadium des Tumors. Tabelle 31 zeigt uns, dass dies für die Expression von AP-2 $\gamma$  nicht der Fall ist. Da es zu wenig pT3- und pT4-Karzinome gibt, ist die statistische Bewertung der Ergebnisse kaum möglich. Wir können jedoch annehmen, dass die Expression von AP-2 $\gamma$  und das Tumorstadium nicht zusammenhängen.

Tabelle 31: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit pT-Stadium ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\gamma$ -Expression	is	pT1	pT2	pT3	pT4	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	12	58	37	2	8	3.025 (p=0.933)	0.006 (p=0.974)
schwach exprimiert	2	10	9	0	0		
mittel exprimiert	0	1	1	0	0		
stark exprimiert	0	0	0	0	0		

Abbildung 28 (E9865.94): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 12 bei einem duktalem in situ Karzinom (DCIS), von Nuys-Score 3, BRCA negativ. Intraduktale Proliferation (a). 5-fache Vergrößerung.

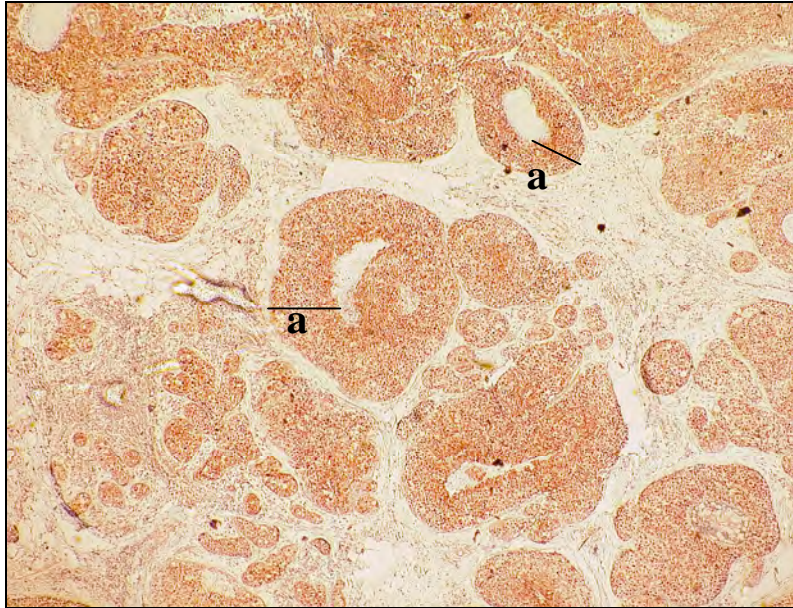


Abbildung 29 (Detail E9865.94): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 12 bei einem duktalem in situ Karzinom (DCIS), von Nuys-Score 3, BRCA negativ. Intraduktale Proliferation (a). 20-fache Vergrößerung.

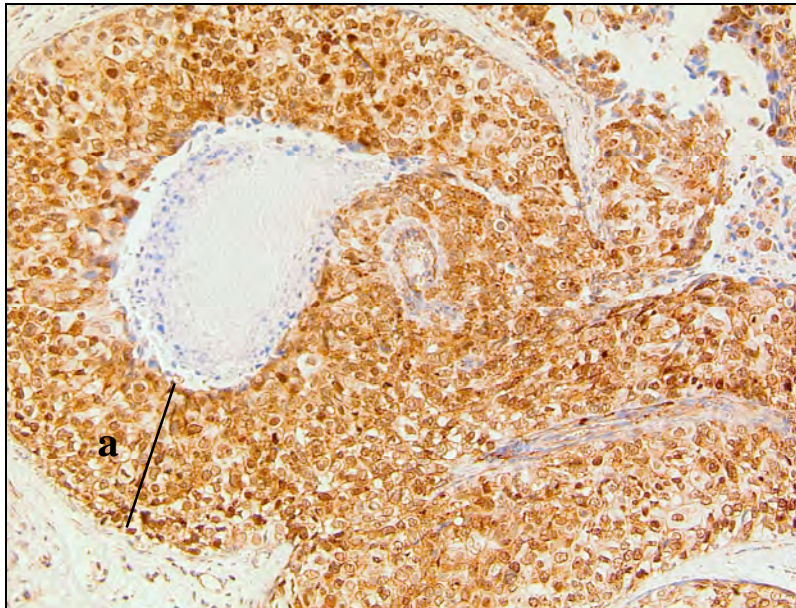
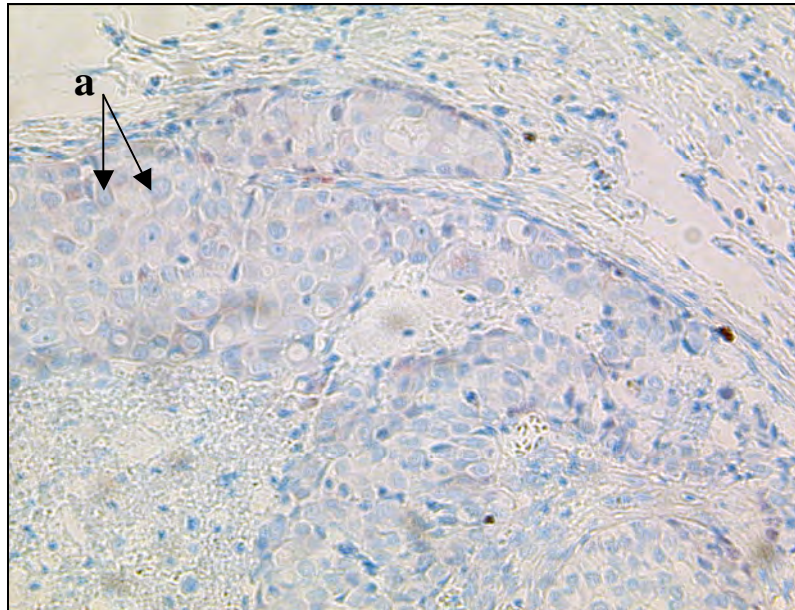


Abbildung 30 (E9865.94): AP-2 $\gamma$  Färbung IRS 0 bei einem duktalem in situ Karzinom (DCIS), van Nuys-Score 3, BRCA negativ. Ungefärbte Zellkerne (a). 40-fache Vergrößerung.



**Malignitätsgrad nach Richardson und Bloom:** Tabelle 32 zeigt die Relation von AP-2 $\alpha$ -Expression und Malignitätsgrad nach Richardson und Bloom. Tendenziell sieht man, dass die meisten Tumoren hochgradig maligne sind (G2 und G3) und AP-2 $\alpha$  nicht oder schwach exprimieren. Statistisch gesehen ist jedoch die Verteilung in dieser Tabelle zufällig. AP-2 $\alpha$  korreliert in unserem Kollektiv nicht mit dem Karzinomgrad.

Tabelle 32: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression und Malignitätsgrad ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\alpha$ -Expression	G1	G2	G3	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	0	20	19	6.890 (p=0.331)	-0.054 (p=0.671)
schwach exprimiert	2	21	23		
mittel exprimiert	2	5	10		
stark exprimiert	3	11	12		



Abbildung 31 (A34139.01): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 9 bei einem gut differenzierten duktalem Karzinom (a), pT1bNOMx, G1, ER+/PR+, BRCA negativ. Mit physiologischen Drüsenläppchen (b). 5-fache Vergrößerung.



Abbildung 32 (E18184.98): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 0 bei einem mittelmässig differenzierten duktalem Karzinom, pT2N1biiiMx, G2, ER+/PR+, BRCA2 assoziiert. Ungefärbte Zellkerne (a) und zytoplasmatische Färbung. 5-fache Vergrößerung.

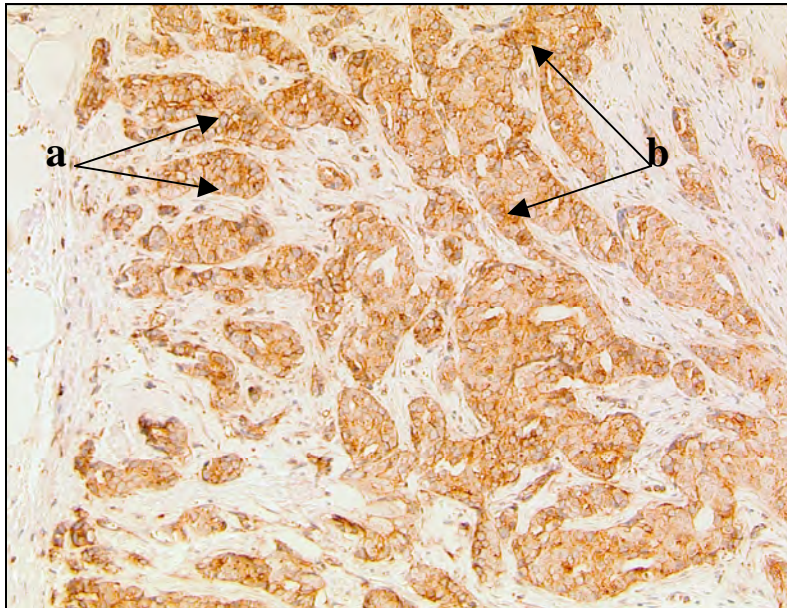
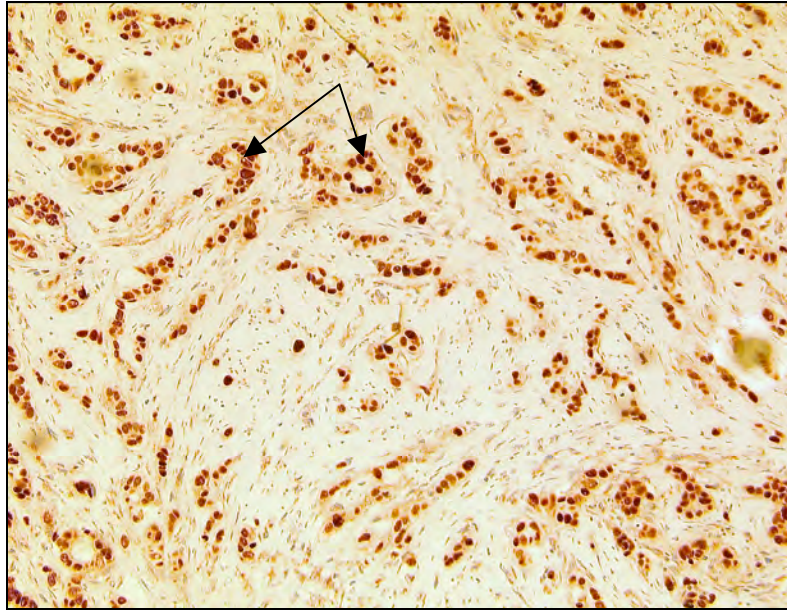


Abbildung 33 (E15166.99): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 12 bei einem schlecht differenzierten duktalem Karzinom, pT4bN1Mx, G3, ER+/PR+, BRCA nicht analysiert. 5-fache Vergrößerung.



Welches Verhältnis besteht zwischen Malignitätsgrad und AP-2 $\gamma$ -Expression? In unserem BRCA-getesteten Kollektiv zeigen die Krebszellen in einer grossen Mehrzahl der Fälle keine oder nur eine schwache Färbung für AP-2 $\gamma$ . AP-2 $\gamma$  wird im familiären Mammakarzinom nur selten exprimiert. Dabei fällt auf, dass auch die meisten dieser Karzinome einen hohen Malignitätsgrad haben (G2 und G3). Nur in zwei Fällen kann eine mittelmässige Färbung nachgewiesen werden. Diese zwei Karzinome sind als G3-Tumoren eingestuft. Es gibt 14 G3-Tumoren, die AP-2 $\gamma$  schwach exprimieren, nur zwei G1-Tumoren und drei G2-Tumoren exprimieren AP-2 $\gamma$  gleich stark. Der  $\chi^2$ -Test suggeriert, dass in unserem Kollektiv die Expression von AP-2 $\gamma$  einen positiven Zusammenhang mit dem Karzinomgrad hat. Wir müssen jedoch darauf aufmerksam machen, dass AP-2 $\gamma$  in den Mammakarzinomen unseres Kollektivs kaum exprimiert wird (nur zwei Fälle mit mittelmässiger AP-2 $\gamma$ -Färbung, kein einziger Fall mit starker AP-2 $\gamma$ -Färbung). Deshalb ist es trotz signifikantem Pearson  $\chi^2$  schwierig, die Ergebnisse statistisch zu interpretieren. Tendenziell ist die Differenzierung schlechter, je stärker AP-2 $\gamma$  in den Krebszellen exprimiert wird.

Tabelle 33: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit Malignitätsgrad ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\gamma$ -Expression	G1	G2	G3	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	5	54	48	10.081 (p=0.039)	0.472 (p=0.032)
schwach exprimiert	2	3	14		
mittel exprimiert	0	0	2		
stark exprimiert	0	0	0		

Abbildung 34 (A34139.01): AP-2 $\gamma$  Färbung IRS 3 bei einem gut differenzierten duktalem Karzinom (a), pT1bN0Mx, G1, ER+/PR+, BRCA negativ. Mit physiologischem Drüsenläppchen (b). 20-fache Vergrößerung.

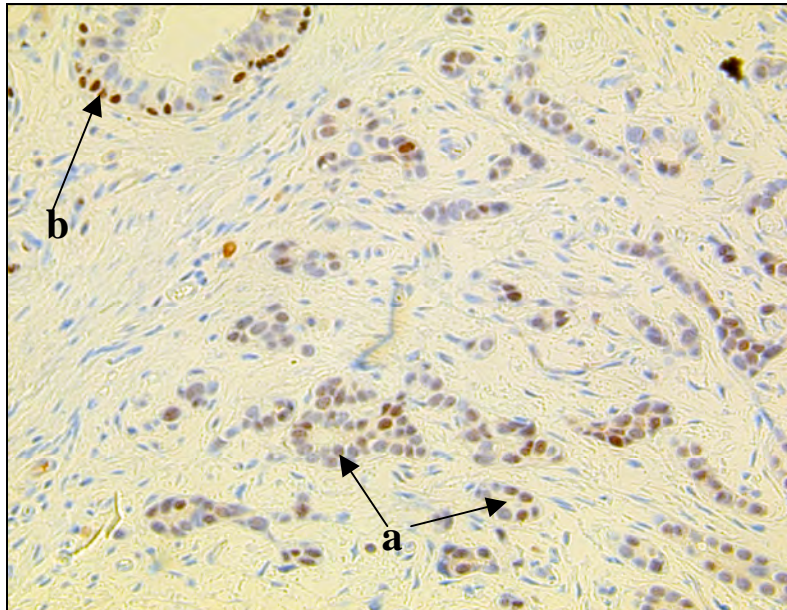
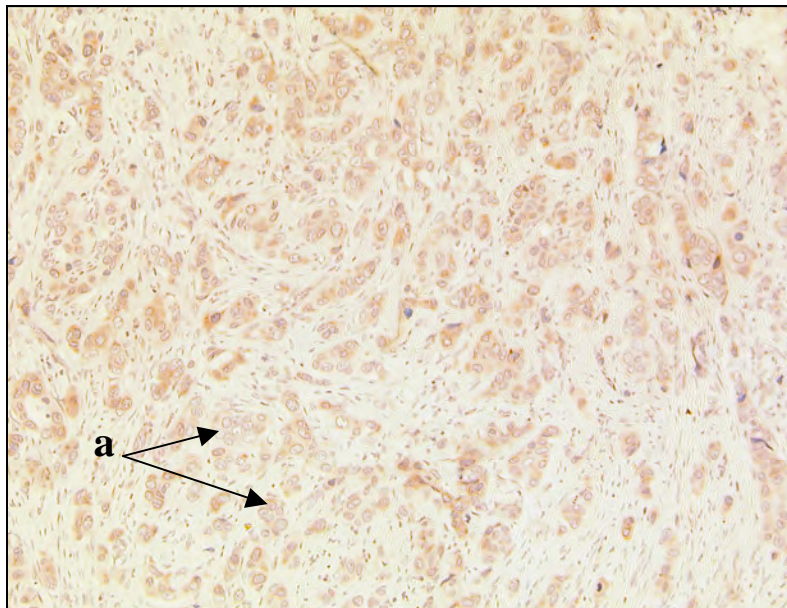


Abbildung 35 (E15166.99): AP-2 $\gamma$  Färbung IRS 0 bei einem schlecht differenzierten duktalem Karzinom, pT4bN1Mx, G3, ER+/PR+, BRCA nicht analysiert. Ungefärbte Zellkerne (a). 5-fache Vergrößerung.



**Oestrogenrezeptoren Expression:** Es soll nun untersucht werden, ob die Expression von AP-2 $\alpha$  einen Zusammenhang mit der Expression von Oestrogenrezeptoren im familiären Brustkrebs hat. In unserem Kollektiv von BRCA-getesteten Patienten konnte ein positiver Zusammenhang nachgewiesen werden. Die meisten Tumoren, welche Oestrogenrezeptoren besitzen, exprimieren den Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$ . 22 oestrogenrezeptorpositive Tumoren exprimieren AP-2 $\alpha$  stark, bei den ER-negativen Tumoren sind es hingegen nur drei. In 15 Fällen sind die Oestrogenrezeptoren zusammen mit einer mittelmässigen Expression von AP-2 $\alpha$  vorhanden, bei den ER-negativen Tumoren zeigen nur zwei Schnittpräparate eine solche Färbung. Die meisten ER-negativen Tumoren exprimieren AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach. Diese Beobachtung erweist sich als statistisch signifikant.

Tabelle 34: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit Oestrogenrezeptoren Expression ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\alpha$ -Expression	ER-negativ	ER-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	14	21	8.233 (p=0.041)	0.433 (p=0.003)
schwach exprimiert	14	31		
mittel exprimiert	2	15		
stark exprimiert	3	22		

Wie auch mit AP-2 $\alpha$ , wird nach einem Zusammenhang von AP-2 $\gamma$  mit der Anwesenheit von Oestrogenrezeptoren in den Krebszellen gesucht. Die statistische Berechnung mit dem  $\chi^2$ -Test ergibt keine signifikante Korrelation dieser zwei Merkmale. Die Expression von AP-2 $\gamma$  und Oestrogenrezeptoren ist in unserem Kollektiv unabhängig.

Tabelle 35: Korrelation AP-2 $\gamma$ -Expression mit Oestrogenrezeptoren ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\gamma$ -Expression	ER-negativ	ER-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	25	77	2.146 (p=0.342)	-0.343 (p=0.194)
schwach exprimiert	7	11		
mittel exprimiert	1	1		
stark exprimiert	0	0		

**Progesteronrezeptoren Expression:** Wie schon gezeigt, korrelieren im familiären Brustkrebs die Expression von AP-2 $\alpha$  und die Expression von Oestrogenrezeptoren. Auch die statistische Untersuchung von AP-2 $\alpha$ -Expression und Progesteronrezeptoren-Status zeigt eine hoch signifikante positive Korrelation. 22 PR-positive versus drei PR-negative Tumoren exprimieren AP-2 $\alpha$  stark. Nur zwei Tumoren, die keine Progesteronrezeptoren besitzen, färben sich mittelmässig für AP-2 $\alpha$ , bei den Tumoren mit Progesteronrezeptoren sind es 15. Die meisten PR-negativen Tumoren exprimieren den Transkriptionsfaktor nicht oder nur schwach. Somit exprimieren oestrogenrezeptor- wie auch progesteronrezeptorpositive familiäre Mammakarzinome den Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$  eher stark.

Tabelle 36: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit Progesteronrezeptoren Expression ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\alpha$ -Expression	PR-negativ	PR-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	14	21	9.405 (p=0.024)	0.395 (p=0.003)
schwach exprimiert	14	31		
mittel exprimiert	2	15		
stark exprimiert	3	22		

Wie die Expression von AP-2 $\gamma$  und Oestrogenrezeptoren, scheinen die Expression von AP-2 $\gamma$  und Progesteronrezeptoren voneinander unabhängig zu sein. Viele Zellen der Tabelle 37 sind jedoch leer, sodass eine statistische Bewertung dieser Beobachtung schwierig ist.

Tabelle 37: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit Progesteronrezeptoren Expression ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\gamma$ -Expression	PR-negativ	PR-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	30	72	3.038 (p=0.219)	-0.249 (p=0.334)
schwach exprimiert	8	9		
mittel exprimiert	0	2		
stark exprimiert	0	0		

**HER2/neu Expression:** Wir wollen ferner untersuchen, ob beim familiären Mammakarzinom die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  von der Expression von HER2/neu abhängig ist. In unserem BRCA-getesteten Kollektiv gibt es zwischen dem AP-2 $\alpha$ -Protein und dem HER2/neu-Protein keine Korrelation. Zwischen dem AP-2 $\gamma$ -Protein und dem HER2/neu-Protein ist Pearson  $\chi^2$  signifikant und suggeriert, dass die Verteilung in der Tabelle nicht zufällig ist. Gamma ist aber nicht signifikant, es gibt also keine Korrelation zwischen den zwei Variablen. Ausserdem ist das Kollektiv zu klein, um statistisch belegte Rückschlüsse ziehen zu können. Es ist möglich, dass HER2/neu-negative Tumoren seltener AP-2 $\gamma$  exprimieren als HER2/neu-positive Tumoren. Wir können aber nur von einer Tendenz sprechen.

Tabelle 38 Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit HER2/neu Expression ( $\chi^2$ -Test)

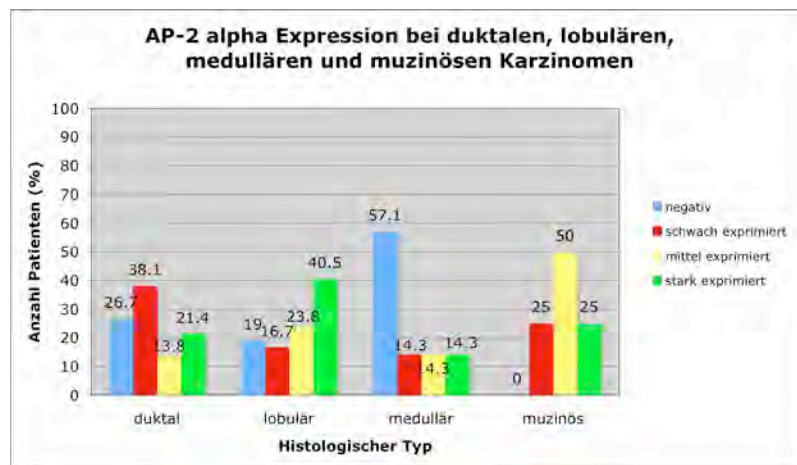
AP-2 $\alpha$ -Expression	HER2/neu-negativ	HER2/neu-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	11	1	5.250 (p=0.154)	0.394 (p=0.119)
schwach exprimiert	14	4		
mittel exprimiert	10	1		
stark exprimiert	7	0		

Tabelle 39: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit HER2/neu Expression ( $\chi^2$ -Test)

AP-2 $\gamma$ -Expression	HER2/neu-negativ	HER2/neu-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	39	7	7.796 (p=0.020)	0.767 (p=0.067)
schwach exprimiert	3	3		
mittel exprimiert	0	1		
stark exprimiert	0	0		

**Histologischer Karzinomtyp:** Wir unterteilen unser Gesamtkollektiv in vier Gruppen. Gruppe 1 beinhaltet die duktaalen Karzinome (n=208). Gruppe 2 beinhaltet die lobulären Karzinome (n=42). Die restlichen 14 Karzinome zeigen ein anderes histologisches Bild, zehn davon zeigen medulläre Merkmale, vier sind vom muzinösen Typ. Wir vergleichen die Expression von AP-2 $\alpha$  in diesen vier verschiedenen Karzinomtypen. Die folgende Abbildung zeigt auffallend, dass die duktaalen Karzinome der ersten Gruppe AP-2 $\alpha$  weniger stark exprimieren als die lobulären Karzinome der zweiten Gruppe. In nur 21.4% der Fälle kann eine starke Färbung nachgewiesen werden versus 40.5% in der lobulären Gruppe. In 13.8% der duktaalen versus 23.8% der lobulären Fälle ist AP-2 $\alpha$  mittelmässig exprimiert. Entsprechend gibt es in der ersten Gruppe mehr Karzinome, die AP-2 $\alpha$  nicht (26.7%) oder nur schwach (38.1%) exprimieren, im Vergleich zur zweiten Gruppe (19% und 16.7%). Wir beobachten eine vorwiegend negative AP-2 $\alpha$ -Färbung in den medullären Karzinomen der dritten Gruppe, in der Hälfte der Fälle wird AP-2 $\alpha$  nicht exprimiert. In der Gruppe der muzinösen Karzinome zählt man hingegen eine grössere Anzahl AP-2 $\alpha$ -positive Tumoren. Es muss jedoch erwähnt werden, dass zu dieser Gruppe nur vier Fälle zählen, was den Vergleich mit den anderen Gruppen schwer möglich macht, der Unterschied ist möglicherweise zufällig.

Abbildung 36: AP-2 $\alpha$  bei duktaalen, lobulären, medullären und muzinösen Karzinomen



Eine statistische Bewertung der Ergebnisse ist nur für die zwei ersten Gruppen sinnvoll. Der beobachtete Unterschied zwischen duktaalen und lobulären Karzinomen, was die Expression von AP-2 $\alpha$  betrifft, ist signifikant. Die Karzinome mit lobulärem histologischem Bild exprimieren häufiger AP-2 $\alpha$  in den Krebszellen als die Karzinome mit duktaalem Bild.

Tabelle 40: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit histologischem Karzinomtyp (Wilcoxon)

Histologischer Typ	N	AP-2 $\alpha$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
duktal	208	5.8	-2.1	0.004
lobulär	42	7.9		

Abbildung 37 (E18184.98): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 0 bei einem mittelmässig differenzierten duktalem Karzinom, pT2NbiiiMx, G2, ER+/PR+, BRCA2 assoziiert. Ungefärbte Zellkerne (a) und zytoplasmatische Färbung (b). 20-fache Vergrößerung.

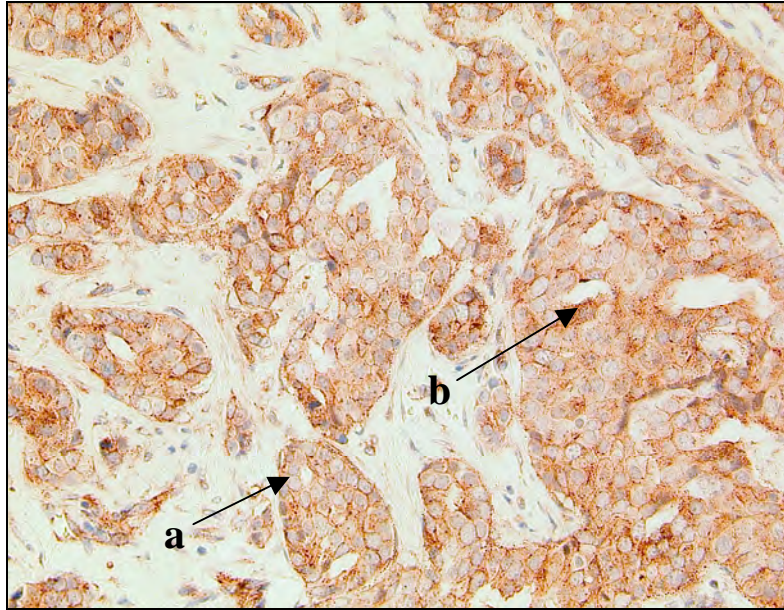


Abbildung 38 (E14978.93): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 12 bei einem lobulären Karzinom (a), pT1cN1biMO, Gx, ER+/PR+, BRCA negativ. Mit Anteilen von lobulärem in situ Karzinom (LCIS) (b). 5-fache Vergrößerung.

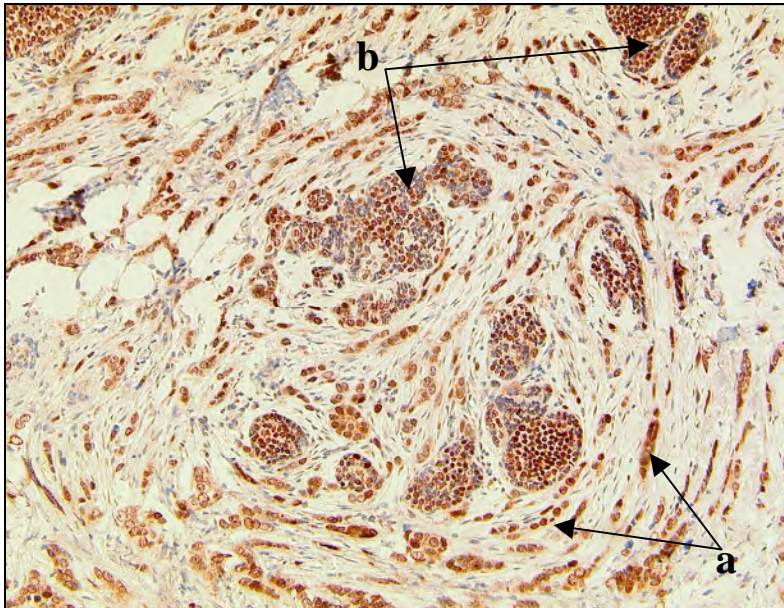




Abbildung 39 (Detail E14978.93): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 12 bei einem lobulären Karzinom (a), pT1cN1b1MO, Gx, ER+/PR+, BRCA negativ. Mit Anteilen von lobulärem in situ Karzinom (LCIS) (b). 40-fache Vergrößerung.

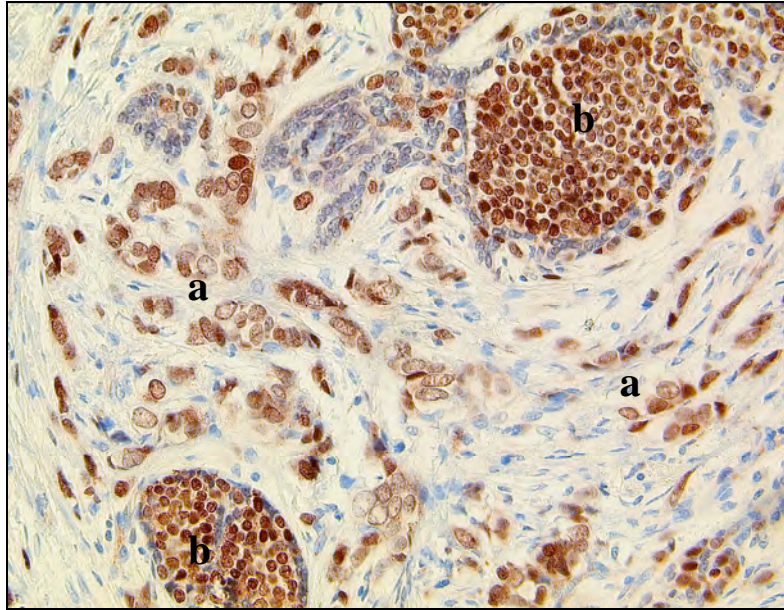


Abbildung 40 (E19131.94): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 2 bei einem medullären Karzinom, pT2N0M0, G3, ER-/PR-, BRCA nicht analysiert. 5-fache Vergrößerung.

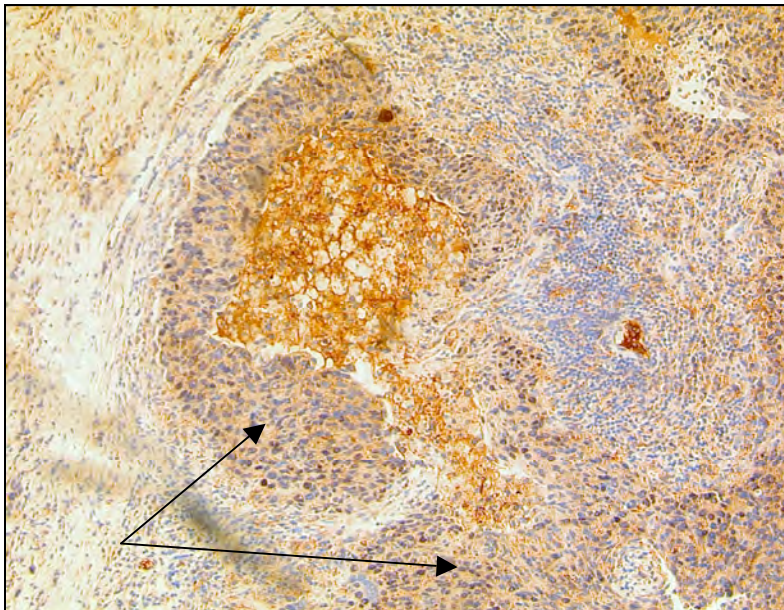
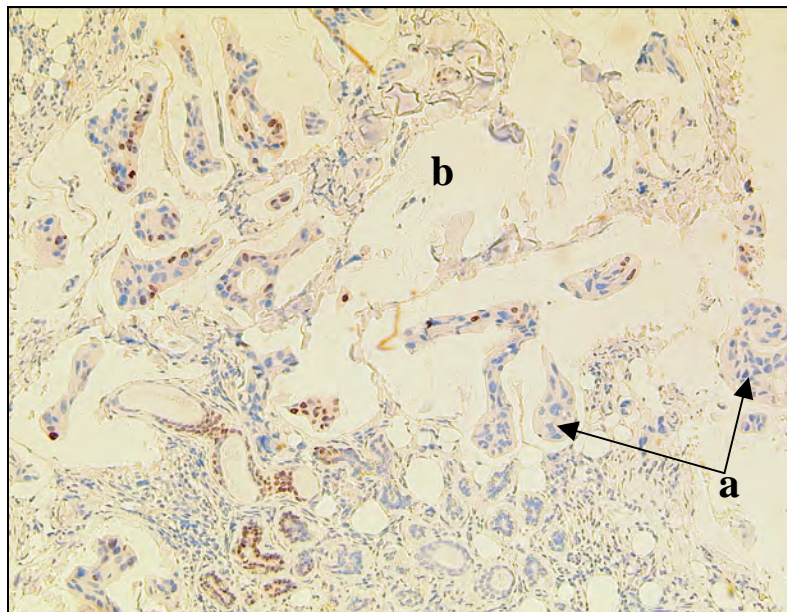


Abbildung 41 (E4973.01): AP-2 $\alpha$  Färbung IRS 3 bei einem muzinösen Karzinom (a), TNM unbekannt, G2, ER-/PR-, BRCA negativ. Mukus (b). 5-fache Vergrößerung.



Bezüglich der Expression von AP-2 $\gamma$  fällt auf, dass die grosse Mehrzahl der Karzinome, unabhängig des histologischen Typs, kein (79% duktale, 83,3% lobuläre, 85.7% medulläre und 75% muzinöse Karzinome) oder AP-2 $\gamma$  nur schwach (18.1% duktale, 14.3% lobuläre, 14.3% medulläre und 25% muzinöse Karzinome) exprimiert. Eine starke AP-2 $\gamma$ -Färbung kommt nur in dukталen Karzinomen vor (0.5%). Es fallen zwischen den Gruppen keine grossen Unterschiede auf.

Abbildung 42: AP-2 $\gamma$  bei dukталen, lobulären, medullären und muzinösen Karzinomen

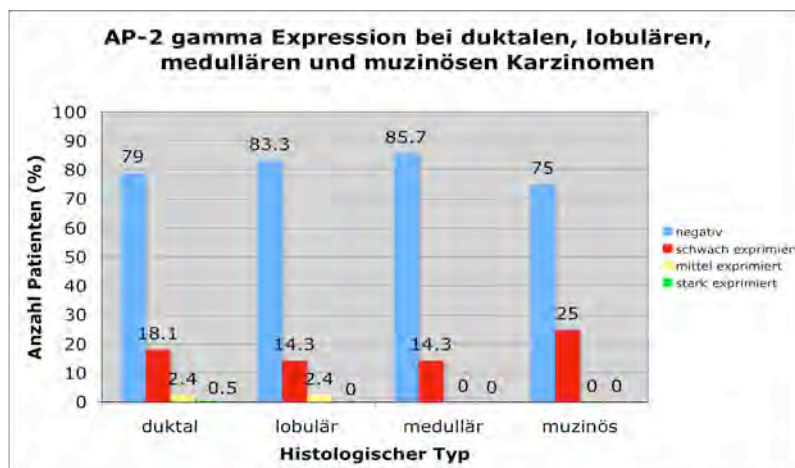


Abbildung 43 (E14978.93): AP-2 $\gamma$  Färbung IRS 0 bei einem lobulären Karzinom (a), pT1cN1biMO, Gx, ER+/PR+, BRCA negativ, mit Anteilen von lobulärem in situ Karzinom (LCIS) (b). 5-fache Vergrößerung.

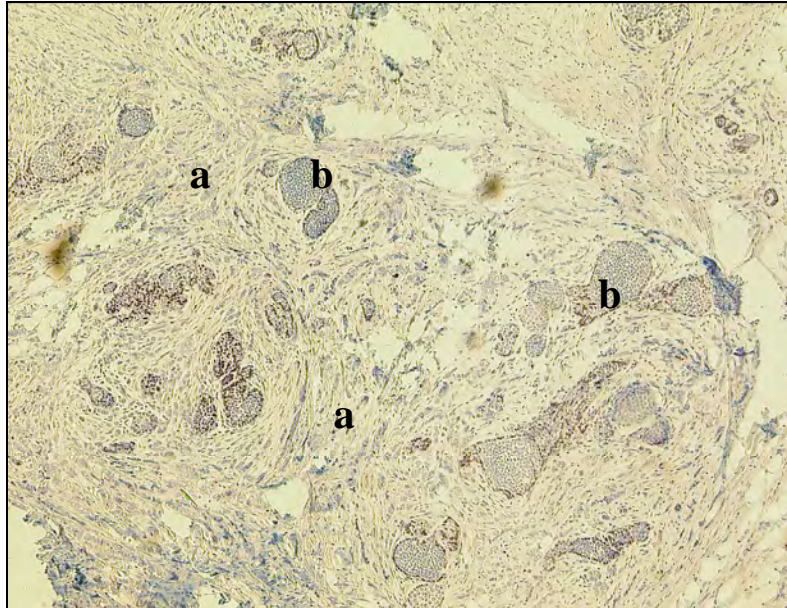
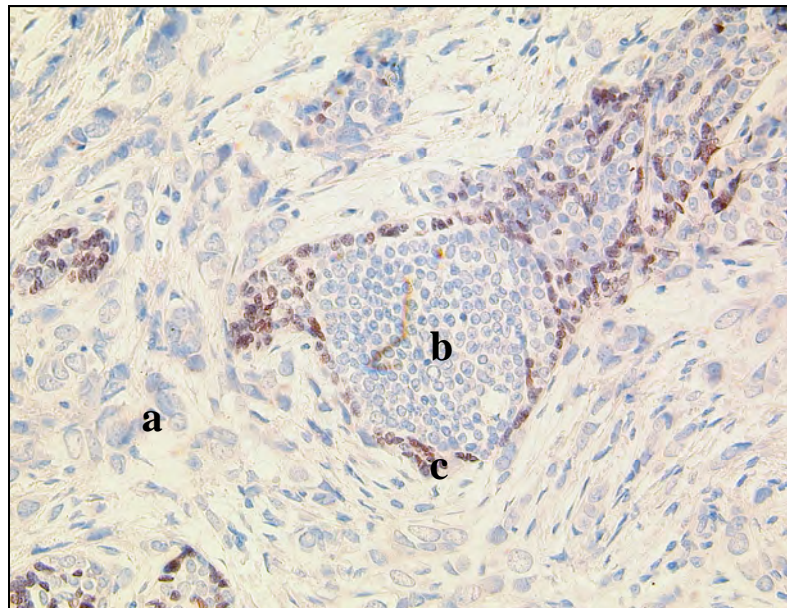


Abbildung 44 (Detail E14978.93): AP-2 $\gamma$  Färbung IRS 0 bei einem lobulären Karzinom (a), pT1cN1biMO, Gx, ER+/PR+, BRCA negativ, mit Anteilen von lobulärem in situ Karzinom (LCIS) (b). AP-2 $\gamma$ -gefärbte Myoepithelialzellen (c). 40-fache Vergrößerung.



Der statistische Wilcoxon-Test bestätigt die Beobachtung, dass sich duktale und lobuläre Karzinome in Bezug zur AP-2 $\gamma$ -Expression nicht signifikant unterscheiden.

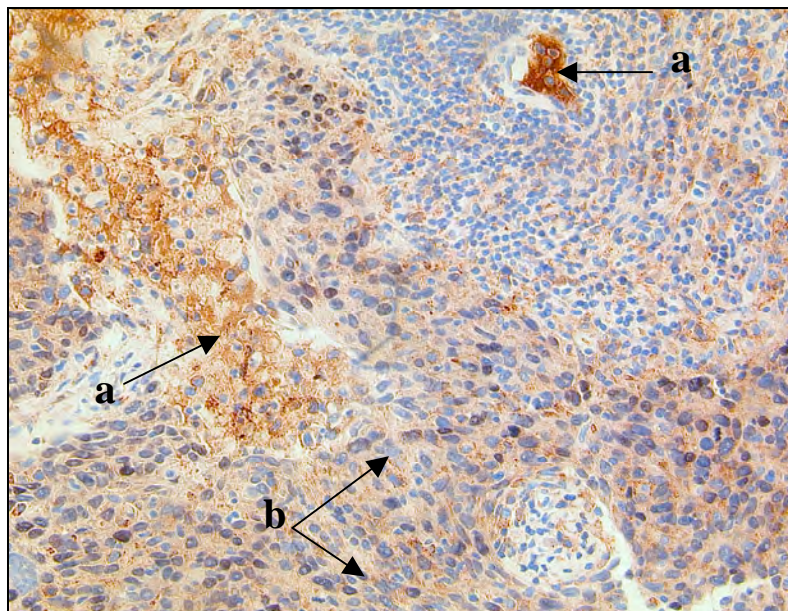
Tabelle 41: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit histologischem Karzinomtyp (Wilcoxon)

Histologischer Typ	N	AP-2 $\gamma$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
duktal	208	1.40	0.33	0.531
lobulär	42	1.07		

### 3.7.4 Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion

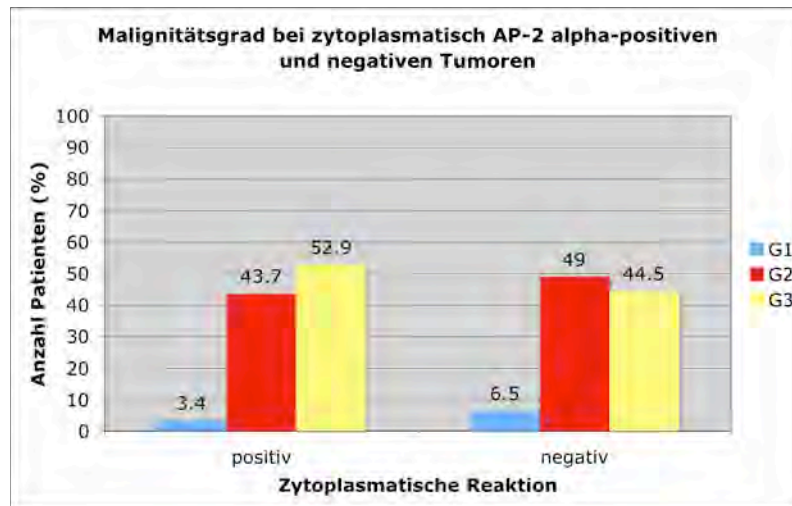
Die bisherigen Beobachtungen dieser Studie basieren auf einer AP-2-Expression im Zellkern der Brustkrebszellen. Im Gesamtkollektiv gibt es aber 93 Schnittpräparate, die AP-2 $\alpha$  im Zytoplasma der Brustkrebszellen exprimieren. Das sind 34% unseres Gesamtkollektivs. AP-2 $\gamma$  wird hingegen nur in 14 Präparaten zytoplasmatisch nachgewiesen. Aufgrund der geringen Fallzahl ist die zytoplasmatische Expression von AP-2 $\gamma$  nicht Gegenstand weiterer Erörterungen. Wir werden in den folgenden Kapiteln zytoplasmatisches AP-2 $\alpha$  in Relation mit Malignitätsgrad, Expression von Oestrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren, Expression von HER2/neu, BRCA-Status und nukleärem AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  bringen.

Abbildung 45 (E19131.94): zytoplasmatische Reaktion für AP-2 $\alpha$  bei einem medullären Karzinom (a), pT2N0M0, G3, ER-/PR-, BRCA nicht analysiert. IRS 0 für nukleäres AP-2 $\alpha$  (b). 20-fache Vergrößerung.



**Malignitätsgrad:** In unserem Kollektiv sind 52.9% der Tumoren, in denen eine zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Expression nachgewiesen wird, schlecht differenziert (Grad 3 nach Richardson und Bloom). In der Gruppe der Tumoren ohne zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion gibt es nur 44.5% G3-Tumoren. Im Allgemeinen beobachtet man, dass sowohl bei der zytoplasmatisch positiven Gruppe, wie auch bei der zytoplasmatisch negativen Gruppe G1-Tumoren seltener vorkommen.

Abbildung 46: Malignitätsgrad bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren



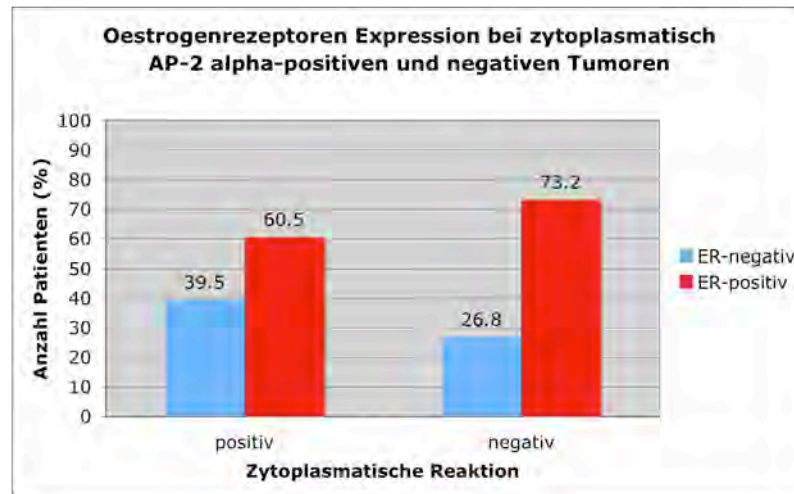
G3-Tumore scheinen etwas häufiger AP-2 $\alpha$  im Zytoplasma zu exprimieren. Der Unterschied bezüglich Malignitätsgrad zwischen den zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und AP-2 $\alpha$ -negativen Karzinomen ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 42: Malignitätsgrad bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test)

Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion	G1	G2	G3	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	10	76	69	2.094 (p=0.351)	0.173 (p=0.162)
positiv	3	38	46		

**Oestrogenrezeptoren:** Bei 39.5% der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven Tumoren beobachtet man eine Negativität für Oestrogenrezeptoren. In der Gruppe der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren findet man weniger ER-negative Tumoren (26.8%), sie scheinen hingegen häufiger Oestrogenrezeptoren zu exprimieren (73.2% versus 60.5%) als ihre Vergleichsgruppe.

Abbildung 47: Oestrogenrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren



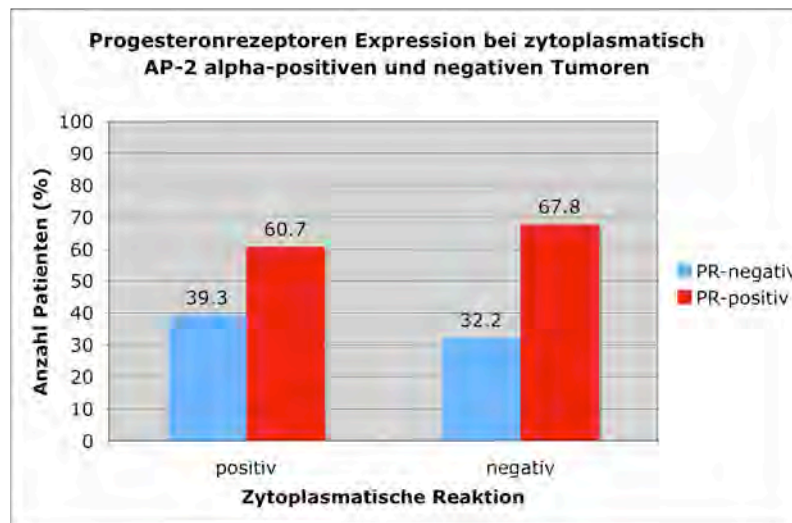
Diese Beobachtung zeigt sich als statistisch signifikant. So scheinen zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positive Tumoren seltener Oestrogenrezeptoren zu exprimieren, im Vergleich zu den zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren.

Tabelle 43: Oestrogenrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test)

Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion	ER-negativ	ER-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	40	109	4.070 (p=0.044)	-0.281 (p=0.048)
positiv	34	52		

**Progesteronrezeptoren:** Die Untersuchung der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Gruppen auf Progesteronrezeptoren ergibt ähnliche Ergebnisse, wie die Untersuchung auf Oestrogenrezeptoren. 39.3% der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven Tumoren exprimieren keine Progesteronrezeptoren, bei den restlichen 60.7% werden Rezeptoren nachgewiesen. Bei den zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren findet man nur in 32.2% der Fälle eine Negativität für Progesteronrezeptoren.

Abbildung 48: Progesteronrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren



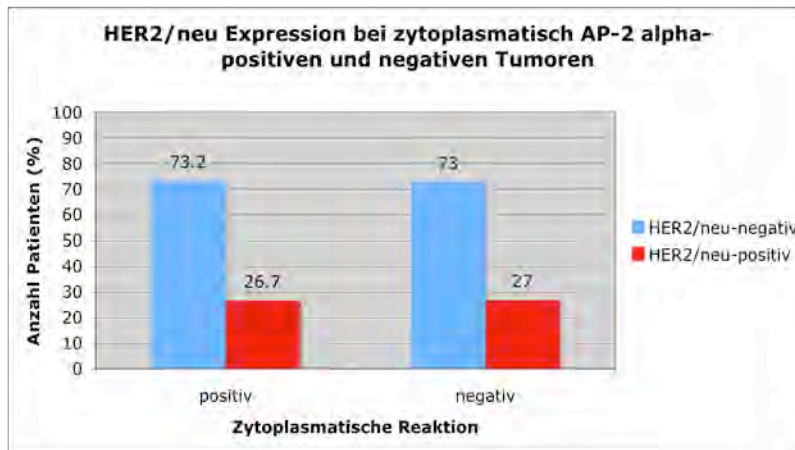
Tendenziell exprimieren zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positive Tumoren im Vergleich zu den zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren weniger häufig die Steroidrezeptoren. Statistisch gesehen sind jedoch nur die Unterschiede der Expression von Oestrogenrezeptoren signifikant. In Bezug auf die Progesteronrezeptoren unterscheiden sich die zwei Gruppen nicht signifikant.

Tabelle 44: Progesteronrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test)

Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion	PR-negativ	PR-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	48	101	1.184 (p=0.276)	-0.153 (p=0.282)
positiv	33	51		

**HER2/neu Expression:** Unsere beiden Gruppen werden bezüglich ihrer Expression von HER2/neu verglichen. Die folgende Abbildung zeigt, dass etwa gleich viele zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negative Tumoren HER2/neu exprimieren (73.2%) wie die Vergleichsgruppe der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven Tumoren (73%). Beide Gruppen scheinen sich gleich zu verhalten.

Abbildung 49: HER2/neu Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren



Wie erwartet gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen in Bezug auf die Expression von HER2/neu.

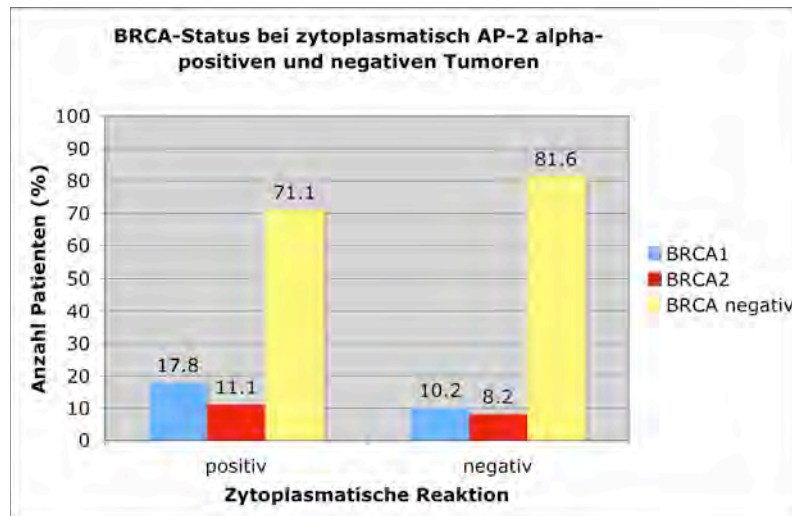
Tabelle 45: HER2/neu Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test)

Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion	HER2/neu-negativ	HER2/neu-positiv	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	54	20	0.001 (p=0.982)	-0.005 (p=0.982)
positiv	30	11		



**BRCA-Status:** In unserem zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven Kollektiv besitzen 17.8% aller Tumoren ein mutiertes BRCA1-Gen. Im Vergleich sind nur 10.2% aller zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren BRCA1-mutiert. Weiter sind 11.1% der Tumoren mit zytoplasmatischer Reaktion BRCA2-assoziert, nur 8.2% der zytoplasmatisch negativen Tumoren haben ein mutiertes BRCA2-Gen. Entsprechend den Erwartungen, gibt es in der zytoplasmatisch positiven Gruppe weniger BRCA negative Tumoren (71.1%) als in der zytoplasmatisch negativen Gruppe, wo 81.6% der Tumoren BRCA negativ sind.

Abbildung 50: BRCA-Status bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren



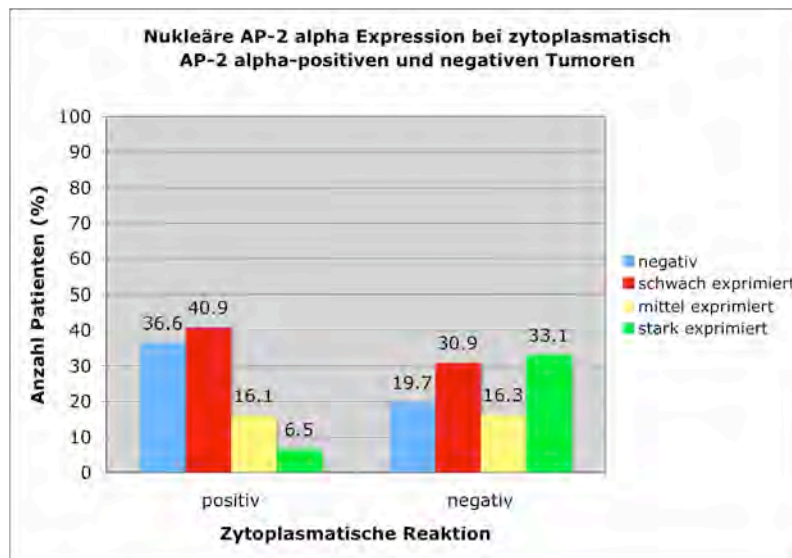
Obwohl man bei der Beobachtung, dass zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positive Tumoren häufiger BRCA1- oder BRCA2-assoziert sind, von einer Tendenz sprechen kann, zeigen sich bei der statistischen Bewertung der Ergebnisse keine Signifikanzen.

Tabelle 46: BRCA-Status bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test)

Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion	BRCA1	BRCA2	BRCAneg	Pearson $\chi^2$	Gamma
negativ	10	8	80	2.136 (p=0.344)	-0.276 (p=0.172)
positiv	8	5	32		

**Nukleäre AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\gamma$ -Expression:** Bei den Krebszellen, welche AP-2 $\alpha$  zytoplasmatisch exprimieren, zeigt sich eine weniger starke nukleäre AP-2 $\alpha$ -Expression im Vergleich zu den zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negativen Zellen. Nur 6.5% der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven Tumoren exprimieren AP-2 $\alpha$  stark im Zellkern, bei den zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren sind es hingegen 33.1%. Wie erwartet findet man in der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven Gruppe viel mehr Tumoren, die AP-2 $\alpha$  nukleär nicht (36.6%) oder nur schwach (40.9%) exprimieren, während es in der Vergleichsgruppe weniger sind (19.7%, beziehungsweise 30.9%).

Abbildung 51: Nukleäre AP-2 $\alpha$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren



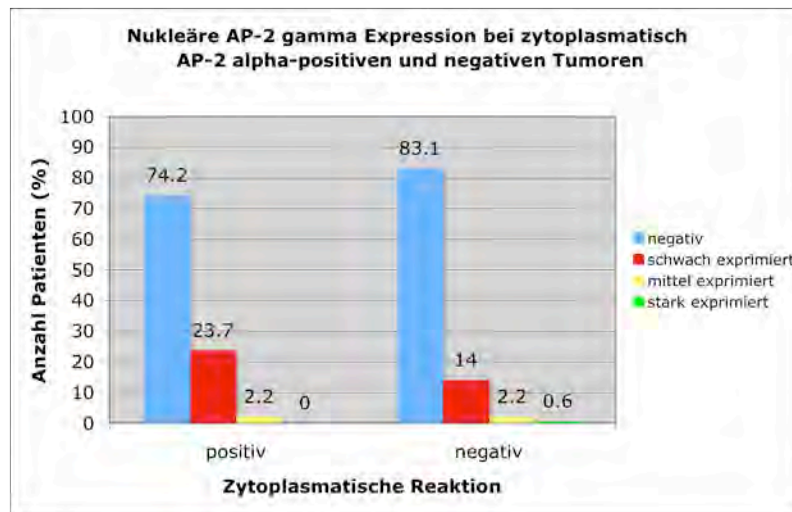
Der Vergleich der IRS-Mittelwerte (Tabelle 7) durch den Wilcoxon-Test zeigt, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Gruppen in Bezug auf die nukleäre Expression von AP-2 $\alpha$  als signifikant angesehen werden können. Die Tumoren, die AP-2 $\alpha$  zytoplasmatisch exprimieren, exprimieren im Vergleich mit Tumoren, die AP-2 $\alpha$  zytoplasmatisch nicht exprimieren, signifikant weniger oft AP-2 $\alpha$  im Zellkern.

Tabelle 47: Nukleäre AP-2 $\alpha$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren (Wilcoxon)

Zytopl. AP-2 $\alpha$ -Reaktion	N	AP-2 $\alpha$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
negativ	178	7.09	2.82	0.000
positiv	93	4.27		

Nun wenden wir uns der nukleären Expression des anderen AP-2 Transkriptionsfaktors zu (AP-2 $\gamma$ ). Wie schon weiter oben diskutiert (siehe Kapitel 4.7.2) exprimiert die Mehrzahl aller Tumoren kein AP-2 $\gamma$  im Zellkern, ob sie AP-2 $\alpha$  zytoplasmatisch exprimieren oder nicht. So exprimieren 74.2% der zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven Tumoren kein AP-2 $\gamma$  im Zellkern versus 83.1% bei den AP-2 $\alpha$ -negativen Tumoren. Es gibt kaum Tumoren, die AP-2 $\gamma$  stark im Zellkern exprimieren, wenn sie es aber tun, dann exprimieren sie AP-2 $\alpha$  nicht gleichzeitig im Zytoplasma (0.6% der Fälle).

Abbildung 52: Nukleäre AP-2 $\gamma$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren



Wie erwartet, ergibt der statistische Vergleich der beiden AP-2 $\gamma$  -IRS (nukleäre Expression) durch den Wilcoxon-Test keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 48: Nukleäre AP-2 $\gamma$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren (Wilcoxon)

Zytopl. AP-2 $\alpha$ -Reaktion	N	AP-2 $\gamma$ IRS-Mittelwert	Mittelwertsunterschied	Sig.
negativ	178	1.27	-0.2	0.512
positiv	93	1.47		

## 4 Diskussion

Das invasive Mammakarzinom ist bei Frauen die häufigste Krebsart (22% aller Krebse im Jahr 2000) und stellt die zweithäufigste Todesursache durch maligne Krankheit nach dem Lungenkrebs dar. Es gibt jährlich in Europa ungefähr 320'000 neue Fälle (Dumitrescu RG und Cotarla I, 2005).

Man kennt multiple Ursachen für Krebs. Heredität kann verantwortlich sein für die Entwicklung dieser Krankheit; es gibt jedoch weitere wichtige Faktoren, die umweltbedingt sind oder vom Lebensstil beeinflusst werden. Dies gilt auch für den Brustkrebs. In ihrer Studie beschreiben Kelsey JL et al. (1993) die wichtigsten Faktoren, die die Entwicklung von Brustkrebs positiv oder negativ beeinflussen sollen. Junges Alter bei der Menarche, hohes Alter bei der Menopause und hohes Alter bei der ersten Schwangerschaft erhöhen das Risiko für Brustkrebs leicht. Frauen hingegen, die nie Kinder hatten, besitzen ein deutlich erhöhtes Risiko nach dem vierzigsten Lebensjahr. Im Gegensatz dazu, werden multiple Schwangerschaften mit einem niedrigeren Risiko nach 40 Jahren assoziiert. Die chirurgische Entfernung der Ovarien kann Schutz gegen Brustkrebs anbieten und wird manchmal insbesondere bei hereditären Karzinomen als prophylaktische Massnahme ergriffen.

Welchen Effekt die hormonelle Substitutionstherapie auf die Entwicklung von Brustkrebs hat, ist unklar. Die Studien zeigen sich uneinig. Interessant sind die Ergebnisse der "Million Women Study" (Million Women Study Collaborators, 2003). Diese ziehen den Rückschluss, dass der Gebrauch der aktuellen hormonellen Substitutionstherapie mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert ist und dass der Effekt substanziell grösser ist für Oestrogen/Progesteron-Kombinationen. Um die Verbindung zwischen oraler Kontrazeption und Risiko für Brustkrebs zu untersuchen, interviewten Marchbanks PA et al. (2002) 4575 Frauen zwischen 35 und 64 Jahren. Ihre Resultate zeigten, dass orale Verhütungsmittel das Risiko für Brustkrebs nicht signifikant erhöhten.

Sporadischer Brustkrebs ist eine Krankheit, die vereinzelt Individuen der allgemeinen Population trifft. In dieser Studie haben wir uns mit dem Brustkrebs befasst, der bei bestimmten Frauen mehr auftritt als bei anderen. Hier muss zwischen dem familiären und erblichen Brustkrebs unterschieden werden. Familiärer Brustkrebs wird derjenige Krebs genannt, der angehäuft in einer Familie auftritt. Bei den Familienmitgliedern ist das Risiko, einen Brustkrebs zu entwickeln erhöht, die Wahrscheinlichkeit, dass diese Personen eine genetische Prädisposition (insbesondere eine Keimbahnmutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen) besitzen, ist gross. In diesen Fällen spricht man von erblichem Brustkrebs; er manifestiert sich häufig in jungem Alter und ist mit einer hoch penetranten, autosomal dominanten Prädisposition für die Krankheit verbunden (van de Vijver MJ, 1999). Zu bedenken ist aber, dass unter denjenigen Frauen, die eine Mutation in einer der beiden BRCA-Gene aufweisen, nicht alle eine positive Familienanamnese vorweisen.

Genetische Prädisposition durch eine Mutation in einer der zwei BRCA-Gene ist selten und betrifft nur 5-10% aller Mammakarzinome in der allgemeinen Population. Bei Frauen mit positiver

Familiengeschichte kann dieser Prozentsatz jedoch stark erhöht sein. Ford D et al. publizierten 1998 eine Studie mit dem damals grössten Kollektiv von Hochrisikofamilien; in diese Studie wurden 237 Familien mit vier oder mehr weiblichen oder mindestens einem männlichen Mammakarzinom einbezogen. Global konnte die Entwicklung des Brustkrebses in 52% der Fälle auf eine BRCA1-Mutation zurückgeführt werden. 32% der Erkrankten hatten ein defektes BRCA2-Gen, bei den Übrigen war die Krankheit mit anderen Genen verbunden. In Familien mit Brust- und Ovarialkarzinomen war in der Mehrzahl (81%) der Fälle das BRCA1-Gen für die Krankheit verantwortlich. In Familien mit Brustkrebs bei männlichen Mitgliedern konnte die Krankheit in 76% der Fälle mit BRCA2-Mutationen verbunden werden.

In Westeuropa und Nordamerika ist eine Keimbahnmutation im BRCA1-Gen bei Hochrisikofamilien eine leicht häufigere Ursache, im Vergleich zu BRCA2-Keimbahnmutationen. Aufgrund des Gründereffektes bei einigen Populationen gibt es jedoch Variationen in diesem Verhältnis. So kann in einer Untersuchung von 21 isländischen Familien die Mehrzahl der hereditären Mammakarzinome auf eine einzige BRCA2-Mutation zurückgeführt werden (Thorlacius S et al., 1996). In der Ashkenazi Population hingegen gibt es eine hohe Frequenz (2%) für drei bestimmte Gründermutationen (Levy-Lahad E et al., 1997).

Die Isolierung von den BRCA1- und BRCA2-Genen ergab wichtige Einblicke in der Pathogenese von Krebs beim Menschen und vermag ein besseres Verständnis der Brustkrebsbiologie zu verschaffen. Sie erlaubt die Berechnung des Risikos für die Entwicklung von Brust- und Ovarialkarzinom bei den Mutationsträgern und bei einigen Patienten kann somit eine frühe Diagnose gestellt werden. So haben Frauen, die eine deletäre Mutation in den Genen BRCA1 oder BRCA2 tragen, ein beträchtlich erhöhtes Lebensrisiko für Brustkrebs (ungefähr 80%), welches knapp zehn Mal höher ist als für Nichtmutationsträger (Dumitrescu RG und Cotarla I, 2005; Easton D, 1997). Diese Zahl war in einer anderen Studie nicht so imposant. Das Brustkrebsrisiko in BRCA-Mutationsträgern betrug für 50-jährige 32.9% und für 70-jährige 50.2% (Loman N et al., 2003).

## 4.1 Geschlecht

Brustkrebs ist eine ungewöhnliche Krankheit bei Männern und macht etwa 1% aller Brustkrebsfälle und <1% aller Krebsarten bei Männern aus. Risikofaktoren sind Hypoandrogenismus (zum Beispiel Klinefeltersyndrom), Leberzirrhose mit Hyperoestrogenismus, Gebrauch von exogenen Oestrogenen, Adipositas, Gynäkomastie und positive Familiengeschichte (Kwiatkowska E et al., 2003). Man denkt, dass eine genetische Prädisposition für Brustkrebs bei Männern eher durch eine Keimbahnmutation im BRCA2-Gen als im BRCA1-Gen vorhanden ist. Eine deletäre Mutation in einem der beiden BRCA-Gene bei Männern mit Brustkrebs konnte in 28% der Fälle entdeckt werden (Frank TS et al., 2002).

In unserem Kollektiv konnte bei den vier männlichen Patienten (1,4% des Gesamtkollektivs) weder eine Mutation des BRCA1- noch des BRCA2-Genes nachgewiesen werden. Drei der Patienten waren

BRCA negativ, einer besass eine unklassifizierte Variante des BRCA1-Genes (Abbildung 4). Die Tatsache, dass dieses untersuchte Teilkollektiv sehr klein ist, kann zum Teil erklären, warum wir nicht dieselben Ergebnisse erhalten haben wie Forschungsgruppen in früheren Studien. Es besteht die Möglichkeit, dass diese vier Männer nur rein zufällig nicht von einer BRCA-Mutation betroffen sind. Wäre die untersuchte Population grösser gewesen, hätte sich vielleicht ein anderes Bild gezeigt. So erkrankten unsere männlichen Patienten nicht an einem hereditären Mammakarzinom, eine familiäre Komponente ist jedoch gewiss. Möglicherweise spielen andere noch unbekannte Gene eine wichtige Rolle in der Pathogenese des männlichen Brustkrebses. Auf die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in unserer Studie konnten keine befriedigenden Rückschlüsse gezogen werden. Eine statistische Bewertung ist wegen des kleinen Kollektivs nicht sinnvoll.

## 4.2 Alter zum Zeitpunkt der Diagnose

Das Krebsrisiko für BRCA-Mutationsträger ist in verschiedenen Organen wie Prostata, Pankreas, Gallenblase, Magen und Haut leicht erhöht. Hochpenetranter, früh eintretender Krebs entwickelt sich jedoch spezifisch in der Brust und in den Ovarien (Scully R, 2000; Friedenson B, 2006). In einer Studie über die histopathologischen Merkmale von BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Tumoren, entwickelten BRCA1-Patienten ein Mammakarzinom bei einem Altersdurchschnitt von 44 Jahren. BRCA-2 Patienten waren im Durchschnitt 47 Jahre, BRCA negative Patienten hingegen 55 Jahre alt (Eerola H et al., 2005). Eine andere Studie bestätigte die frühere Entwicklung vom Mammakarzinom bei BRCA1/2-Patienten im Vergleich zu BRCA negativen Patienten. Die Patienten waren jedoch um einige Jahre jünger zum Zeitpunkt der Diagnose (39, 44 respektiv 46 Jahre) (Chen WY et al., 2002).

In unserem Kollektiv haben wir das Durchschnittsalter der BRCA-getesteten Patienten mit dem Alter der nicht getesteten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose anhand von Alterskurven verglichen. Der Gipfel der Alterskurve liegt bei beiden Gruppen in derselben Alterssparte, die meisten Patienten waren bei der Diagnose zwischen 40 und 49 Jahre alt. Interessanterweise ist aber der Gipfel der Alterskurve der BRCA-getesteten Patienten höher. Die BRCA-getesteten Patienten unseres Kollektivs waren im Durchschnitt 47.8 Jahre alt als man bei ihnen ein in situ Karzinom oder ein invasives Karzinom diagnostizierte. Sie waren ungefähr zwei Jahre jünger als die Patienten, für welche man den BRCA-Test nicht durchgeführt hatte; diese waren im Durchschnitt 50 Jahre alt zum Zeitpunkt der Diagnose (Abbildung 5). Der Unterschied war zwar statistisch nicht signifikant (Tabelle 9), man kann ihn jedoch als eine Tendenz betrachten. Er zeigt, dass Patienten, bei denen Indikationen für einen BRCA-Test bestehen (unter anderem Familienanamnese), tendenziell jünger sind als die Patienten, die an einem sporadischen Brustkrebs erkrankten. Man muss hierbei erwähnen, dass eine der Indikationen für den Test eben das jugendliche Alter ist. Diese Tatsache senkt natürlich den Altersdurchschnitt der BRCA-getesteten Gruppe.

Weiter verglichen wir in unserem Kollektiv bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten den Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Diagnose. Dabei kam heraus, dass sich die BRCA1-Patienten klar von den zwei anderen Gruppen abgrenzen. Sie waren im Durchschnitt 39.2 Jahre alt als sie an einem Brusttumor erkrankten. Dies ist etwa sieben Jahre jünger als die BRCA2-Patienten (im Durchschnitt 46.5 Jahre alt), und etwa zehn Jahre jünger als die BRCA negativen Patienten (49.4 Jahre alt). Der Gipfel der Alterskurve der BRCA1-Patienten bestätigt diese Beobachtung; er liegt in einer niedrigeren Alterssparte als derjenige der anderen zwei Gruppen (Abbildung 6). Man kann somit annehmen, dass das BRCA1-assoziierte Mammakarzinom sich speziell früh manifestiert. Statistisch signifikant war der Unterschied zwischen der BRCA1- und der BRCA negativen Gruppe, jedoch nicht zwischen den zwei BRCA-assoziierten Gruppen (Tabelle 10), obwohl sich das BRCA2-assoziierte Mammakarzinom eher später zu entwickeln scheint als das BRCA1-Karzinom und sich tendenziell eher wie BRCA negative Tumoren verhält (Alterunterschied: drei Jahre). Unsere Ergebnisse sind in Bezug auf das Alter der BRCA1-Gruppe vergleichbar mit denen von Chen WY et al. (2002). Unsere BRCA2-Patienten waren jedoch etwa zwei Jahre, unsere BRCA negativen Patienten etwa drei Jahre älter. Man beachte, dass unsere BRCA2-Gruppe sehr klein ist, ein einziger Patient mit höherem Alter kann den Altersdurchschnitt der Gruppe bedeutend erhöhen.

### **4.3 Tumorlokalisierung (rechte Mamma - linke Mamma)**

Brusttumoren scheinen sich etwas häufiger in der linken Brust zu entwickeln als in der rechten Brust (Ekbohm A et al., 1994; Woods SE et al., 2006). Global gesehen entwickelten in unserem Gesamtkollektiv 45.3% der Patienten einen Tumor in der rechten Brust, bei 54.7% Patienten wurde der Tumor in der linken Brust entdeckt. Bei unseren BRCA-getesteten Patienten fiel auf, dass bei einer Mehrzahl der Patienten der Tumor sich in der linken Brust entwickelte. Im Vergleich dazu schien es bei nicht getesteten Patienten keinen Prädilektionsort zu geben, beide Seiten waren gleich häufig betroffen (Abbildung 7). Wir untersuchten auch die Unterschiede zwischen den nach BRCA-Status aufgeteilten Gruppen. Es scheint, dass sich in der BRCA1-Gruppe die Tumoren knapp häufiger in der rechten Brust entwickeln. Die BRCA2-Tumoren betreffen hingegen vermehrt die linke Brust (Abbildung 8), wie auch die BRCA negativen Tumoren. Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit der Literatur, wenn man das gesamte Patientengut sowie die BRCA2-assoziierten und die BRCA negativen Tumoren betrachtet. Mit einer grösseren Anzahl Patienten könnte untersucht werden, ob sich der BRCA1-assoziierte Brustkrebs wirklich anders verhält als die beiden anderen Gruppen. In unserer Studie wurden nur 18 BRCA1-Patienten untersucht, die Ergebnisse können somit zufällig sein. Ausserdem zeigte der statistische Test keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen (Tabelle 12).

## 4.4 Histopathologische Merkmale

Es gibt weniger Studien über die histopathologischen Charakteristika von BRCA2-Tumoren als für BRCA1-Tumoren, und die Resultate ergeben kein einheitliches Bild mit distinktem Phänotyp für diese Tumoren. Meinungen zum Malignitätsgrad und histologischen Typ der Karzinome sind diskrepant. Zusammenfassend kann man sagen, dass trotz Ähnlichkeiten der zwei BRCA-Gene, die BRCA1-Karzinome getrennt von den BRCA2-Karzinomen betrachtet werden müssen. Der relativ homogene basale Phänotyp vom BRCA1-assoziierten Mammakarzinom könnte Auswirkungen auf die Prognose der betroffenen Patienten haben. Gegensätzlich dazu scheint das BRCA2-assoziierte Mammakarzinom heterogener und daher nicht ganz klar unterscheidbar von nicht hereditären Karzinomen zu sein. Die biologischen Funktionen der zwei BRCA-Proteine könnten sich also unterscheiden (Osin PP und Lakhani SR, 1999).

### 4.4.1 Histologischer Karzinomtyp

Das Vorkommen des lobulär invasiven und des duktal invasiven Karzinomes differiert zwischen BRCA1-, BRCA2-Mutationsträgern und Kontrollpatienten nicht signifikant (Breast Cancer Linkage Consortium, 1997). BRCA1-Tumoren sollen eine Neigung zum medullären Typ mit so genannten "pushing margins" und lymphozytärer Infiltration haben (Eerola H et al., 2005; Stoppa-Lyonnet D et al., 2000). So denken Eisinger F et al. (1998), dass zwischen dem BRCA1-Mutationsstatus und dem medullären histologischen Bild des Karzinomes eine wichtige Verbindung besteht, obwohl die beiden nicht streng miteinander korrelieren. In der Studie des Breast Cancer Linkage Consortium (1997) besaßen 13% der BRCA1-assoziierten Mammakarzinome dieses histologische Bild, im Vergleich zu 3% der BRCA2- und 2% der Kontrolltumoren. In Robson M et al.'s (1998) Kollektiv zeigten 1.6% der BRCA negativen und 10.3% der BRCA-positiven Tumoren (ohne Unterscheidung zwischen BRCA1 und BRCA2) medulläre Charakteristika. Trotz der in der Literatur nachgewiesenen Häufung von medullären Karzinomen unter den Patienten mit BRCA1-Mutation, konnten wir in unserem Kollektiv keine solche Korrelation finden. Global gesehen zeigte eine klare Mehrheit der Karzinome duktale Merkmale. Viel weniger häufig, jedoch signifikant vertreten, waren lobuläre Karzinome. Andere histologische Typen wie muzinöse und medulläre Typen kamen selten vor und nur bei Patienten der BRCA negativen Gruppe. Unter den BRCA1-assoziierten Tumoren konnte keinem medulläre Charakteristika zugeschrieben werden (Abbildung 9 und 10). Diese Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen in früheren Studien ist enttäuschend. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass unsere BRCA1/2-Gruppen wenig Patienten beinhalten, womöglich durch Zufall waren keine dieser Karzinome vom medullären Typ. Die Tatsache, dass die histologische Bewertung der Tumoren stark subjektiv und abhängig vom Pathologen ist, ist eine andere plausible Erklärung. Womöglich könnten durch eine Neubewertung aller Tumoren durch eine einzige qualifizierte Person einige verkannte medulläre Merkmale hervorgehoben werden.



#### 4.4.2 TNM-Stadium

Der BRCA-assoziierte Brustkrebs weist pathologische und biologische Merkmale auf, die mit einer schlechteren Prognose verbunden werden, vor allem der BRCA1-assoziierte Brustkrebs. Bei solchen Tumoren wären also höhere TNM-Stadien zu erwarten. Chappuis PO et al.'s Metanalyse (2000) über die histopathologischen Merkmale von BRCA-Tumoren suggeriert, dass es keinen Unterschied in der Tumorgrösse zwischen BRCA1/2- und sporadischen Tumoren gibt und dass ein Trend zu Lymphknotennegativität bei BRCA1-positiven Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe besteht. Zuvor hatten Robson M et al. (1999) mit einem statistisch signifikanten Unterschied nachgewiesen, dass 49% der BRCA-Tumoren (BRCA1 und BRCA2) und nur 32% der BRCA negativen Tumoren lymphknotenpositiv waren. Andere Studien wiesen bei BRCA-positiven Patienten eine nicht signifikante Tendenz zu höheren Tumorstadien und Lymphknoteninfiltration nach (Robson M et al., 1998; Veronesi A et al., 2005).

In unserem Kollektiv fiel auf, dass BRCA1-Patienten weniger häufig an einem in situ Karzinom erkrankten als BRCA2-Patienten oder BRCA negative Patienten. Unsere Ergebnisse zeigten weiter, dass die BRCA1- und BRCA negativen Tumoren sich häufiger im pT1-Stadium befanden, im Vergleich zu den BRCA2-assoziierten Tumoren, welche vermehrt im pT2-Stadium entdeckt wurden und somit zum Zeitpunkt der Diagnose fortgeschrittener waren (Abbildung 11). Der Vergleich in Bezug auf die absolute Tumorgrösse in Zentimetern bestätigt diese Beobachtung: BRCA2-Tumoren waren grösser als BRCA1-assoziierte und BRCA negative Tumoren. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Tabelle 13), weisen jedoch auf eine erstaunliche Tendenz hin. Hinzu kommt die Einsicht, dass BRCA2-Patienten unseres Kollektivs verglichen mit den BRCA1-Patienten signifikant häufiger Lymphknotenmetastasen entwickelt hatten (Tabelle 14).

Über das M-Stadium können mit unserer Studie keine statistisch signifikanten Rückschlüsse gezogen werden. In zu vielen Fällen fehlten die nötigen Daten. Es ist interessant zu bemerken, dass 25% der BRCA1-Patienten, bei denen das M-Stadium bekannt war, Fernmetastasen entwickelten, versus 20% bei den BRCA2-Patienten und nur 15% bei den BRCA negativen Patienten (Abbildung 13). Wenn man jedoch annimmt, dass in den Fällen, wo das M-Stadium nicht in den Pathologiebefunden vermerkt war, sich keine Metastasen entwickelt hatten, erhält man korrigiert für BRCA1-Patienten in 5.6%, für BRCA2-Patienten in 7.7%, und für BRCA negative Patienten in 4.5% der Fälle eine mögliche Metastasierung. Diese Zahlen passen zu den oben genannten Ergebnissen; BRCA2-assoziierte Tumoren scheinen zum Zeitpunkt der Diagnose fortgeschrittener zu sein (höheres TNM-Stadium), wenn mit den Tumoren der anderen zwei Gruppen verglichen.

Unsere Beobachtungen widersprechen den Erwartungen, dass BRCA1-Tumoren mit Merkmalen verbunden sind, die mit einer schlechteren Prognose einherkommen. Die BRCA2-Patienten unseres Kollektivs hingegen erkrankten an Mammakarzinomen, die mit einem höheren TNM-Stadium assoziiert werden konnten. Dies ist ein möglicher Hinweis, dass der Verlauf des BRCA1-assoziierten Mammakarzinomes nicht schlechter oder sogar besser sein könnte als derjenige von anderen

Mammakarzinomen (Veronesi A et al., 2005; Verhoog LC et al., 1999). Die Relevanz einer BRCA-Mutation auf die Prognose von Frauen mit Brustkrebs ist ein Objekt von aktiver Forschung; diese Frage ist jedoch noch nicht ganz geklärt. Es wäre interessant nachzuprüfen, ob Patienten mit BRCA2-Mutation tatsächlich, wie es unsere Ergebnisse (ohne statistische Signifikanzen) suggerieren, mit einem ungünstigeren Verlauf ihrer Krankheit rechnen müssen.

#### **4.4.3 Malignitätsgrad nach Bloom und Richardson**

Verschiedene Studien (Breast Cancer Linkage Consortium, 1997; Marcus JN et al., 1996; Chappuis PO et al., 2000; Eerola H et al., 2005; Robson M et al., 1998; Lakhani SR et al., 2002; Foulkes WD et al., 2000) vergleichen die histologischen Merkmale von BRCA1- und BRCA2-assoziierten Tumoren im Vergleich zu den nicht hereditären Mammakarzinomen. Die Ergebnisse zeigen, dass die hereditären Tumoren, insbesondere bei BRCA1-Mutation, einen höheren Malignitätsgrad aufweisen.

Unsere Studie zeigte bezüglich des Malignitätsgrades keine statistisch interessanten Ergebnisse beim Vergleich der BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten. In beiden Gruppen waren die meisten Karzinome mittelmässig oder schlecht differenziert (G2 und G3). Die Patienten, die den BRCA-Test erhalten hatten, erkrankten etwas häufiger an schlecht differenzierten Karzinomen im Vergleich zu den Patienten, die nicht auf BRCA-Status analysiert wurden (Abbildung 14 und Tabelle 15). Diese Tendenz weist darauf hin, dass der familiäre, früh eintretende Brustkrebs eher bösartig entartet als der sporadische Brustkrebs.

Beim Vergleich der drei nach BRCA-Status aufgeteilten Gruppen konnte in unserem Kollektiv eine positive Korrelation zwischen der BRCA1-Mutation und einem hohen Malignitätsgrad nachgewiesen werden. Diese Tumoren waren signifikant häufiger als G3-Tumoren eingestuft worden, im Vergleich zu den Tumoren der beiden anderen Gruppen, welche klar besser differenziert waren. Gut differenzierte Tumoren konnten nur bei BRCA negativen Patienten nachgewiesen werden. BRCA2-Tumoren schienen sich hingegen nicht signifikant von ihren Vergleichstumoren zu unterscheiden, sie waren jedoch besser differenziert als BRCA1-Tumoren und schlechter differenziert als BRCA negative Tumoren (Abbildung 15 und Tabelle 16).

Schlecht differenzierte Krebszellen sind eigenständig und haben die Merkmale von normalen Zellen verloren. Können wir deshalb erwarten, dass BRCA1-assoziierte Karzinome keine Oestrogen- und Progesteronrezeptoren exprimieren und schlechter auf eine Hormontherapie reagieren? Man könnte annehmen, dass eine Remission der Krankheit für die betroffenen Patienten möglicherweise schwieriger zu erreichen ist. Möglicherweise wäre ein Verlust der AP-2 $\alpha$ -Expression auch auf die schlechte Differenzierung zurückzuführen. Wir werden später auf diese Fragen zu sprechen kommen (Kapitel 5.7.2).

#### **4.4.4 Van Nuys für in situ Karzinome**

Wie oben erwähnt, zeigen die Ergebnisse von Studien, die die histologischen Merkmale von BRCA1- und BRCA2-assoziierten Tumoren verglichen mit nicht hereditären Mammakarzinomen, dass die BRCA1-assoziierten Tumoren einen höheren Malignitätsgrad aufweisen. In solchen Studien kam das duktales in situ Karzinom (DCIS) weniger häufig bei Tumoren mit BRCA1-Mutation als bei Kontrolltumoren vor. Frank TS et al. (2002) beobachteten in ihrer Studie, dass die Prävalenz von BRCA-Mutationen bei Frauen mit DCIS signifikant niedriger war als bei Frauen mit invasivem Mammakarzinom. Laut den Autoren könnte das DCIS somit eher eine intraduktales Läsion von heterogenem malignem Potenzial, statt eine wahre präinvasive Läsion darstellen. Wie auch immer war die Prävalenz einer BRCA-Keimbahnmutation bei DCIS-Patienten höher als bei Frauen ohne Brustkrebs überhaupt.

Wir erhielten mit unserer Studie ähnliche Resultate wie in der Literatur. Bei den BRCA-getesteten Patienten fand man tendenziell in situ Karzinome mit höheren van Nuys-Scoren. Diese Läsionen zeigten mehr Kernatypien im Vergleich zu den in situ Karzinomen der nicht getesteten Patienten (Abbildung 16). Interessanterweise konnte in unserem BRCA1-Kollektiv nur ein einziges in situ Karzinom gefunden werden (van Nuys-Gruppe unbekannt), alle anderen diagnostizierten Tumoren waren invasive Karzinome. Bei den BRCA2-Patienten gab es nur in situ Karzinome mit einem van Nuys-Score 3, was die obengenannte Theorie bekräftigt (Abbildung 17). Diese Aussage konnte statistisch nicht verifiziert werden: weil wir zu kleine Fallzahlen besaßen (n=1 für BRCA1, n=2 für BRCA2), war eine Berechnung nicht möglich.

#### **4.5 Expression von Hormonrezeptoren in den Tumorzellen**

Den BRCA1-Tumoren wurde in der Literatur eine Negativität für Steroidhormonrezeptoren (Oestrogen- und Progesteronrezeptoren) zugeschrieben (Chappuis PO et al., 2000; Eerola H et al., 2005; Lakhani SR et al., 2002; Foulkes WD et al., 2000; Stoppa-Lyonnet D et al., 2000). So konnten Loman N et al. (1998) in ihrem Kollektiv bei den BRCA1-Patienten signifikant verminderte Oestrogenrezeptorspiegel nachweisen, im Vergleich zu den anderen hereditären Krebspatienten. In Bezug auf die Progesteronrezeptoren war der Unterschied nur zwischen der BRCA1-Gruppe und der nicht hereditären Gruppe statistisch signifikant. BRCA1- und BRCA2-Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich. In Robson M et al.'s Studie (1998) über 91 jüdische Frauen mit Brustkrebs wurden in 30.4% der BRCA-positiven und in 66.1% der BRCA negativen Tumoren Oestrogenrezeptoren nachgewiesen. Auch der Progesteronrezeptorspiegel war in den BRCA-positiven Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger. Lakhani SR et al. (2002) beschrieben, dass 10% der BRCA1-, 66% der BRCA2- und 65% der Kontrolltumoren ER-positiv waren. Die Autoren denken, dass BRCA1-Tumore für ihre Proliferation einen hormonunabhängigen, von BRCA2- und sporadischen Tumoren unterschiedlichen Mechanismus besitzen könnten. Trotz dieser Behauptung bleibt die

Hypothese bestehen, dass sich BRCA1-Tumoren aggressiv entwickeln und sie ihre Hormonabhängigkeit im Verlauf ihrer Progression verlieren. In einer der wenigen Studien über die Expression von Steroidrezeptoren in BRCA2-Mammakarzinomen, konnte nachgewiesen werden, dass diese Tumoren dazu neigen, die Expression der Steroidrezeptoren zu behalten (Verhoog LC et al., 1999).

Bei unseren Krebspatienten erhielten wir gleiche Ergebnisse für die Expression von Oestrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren. Allgemein waren in unserem Gesamtkollektiv die meisten Tumoren positiv für Oestrogen- und Progesteronrezeptoren. Wir beobachteten diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen den BRCA-getesteten und den ungetesteten Patienten (Abbildung 18 und 20, Tabelle 18 und 20). Bei der Aufteilung des Kollektivs in drei Gruppen nach BRCA-Status fielen signifikante Unterschiede der Expression von Hormonrezeptoren in den Krebszellen auf. Die BRCA1-assoziierten Mammakarzinome unseres Kollektivs exprimierten signifikant seltener Oestrogenrezeptoren, wenn diese mit BRCA2-assoziierten oder BRCA negativen Tumoren verglichen wurden. Bei nur 26.7% unserer BRCA1-Patienten waren Oestrogenrezeptoren in den Krebszellen vorhanden. Hingegen erkrankten 72.7% der BRCA2-Patienten an ER-positivem Brustkrebs, bei den Patienten mit Wildtyp-BRCA waren es sogar 80.2% (Abbildung 19 und Tabelle 19). Wir erhielten relativ gesehen ähnliche Ergebnisse wie Lakhani SR et al. (2002). Allgemein exprimierten aber alle ihre Tumoren weniger häufig die Rezeptoren als die unseren; möglicherweise spielen hier verschiedene Färbungsmethoden und Beurteilungskriterien eine Rolle.

In unserer Studie ergaben sich für die Expression von Progesteronrezeptoren parallele Verhältnisse mit der Expression von Oestrogenrezeptoren (Abbildung 21). Im Gegensatz zu anderen Studien, waren nur in unseren BRCA1-Tumoren die Progesteronrezeptoren signifikant häufiger abwesend, wenn mit BRCA2- und BRCA negativen Tumoren verglichen (Tabelle 21). Wir erhielten ähnliche Prozentsätze wie für die Oestrogenrezeptorenexpression; bei nur 20% der BRCA1-Tumoren konnten Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden (versus 26.7% für Oestrogenrezeptoren). Die grosse Mehrzahl der BRCA2- und BRCA negativen Mammakarzinome war PR-positiv, wobei es die BRCA2-Tumoren etwas häufiger (81.8%) waren als die BRCA negativen Tumoren (74.7%), ohne dass dies einen signifikanten Unterschied darstellte. Auch hier verhielten sich BRCA2-Tumoren ähnlich wie BRCA negative Tumoren.

Patienten mit BRCA1-Mutationen scheinen also an Mammakarzinomen zu erkranken, die kaum differenzierte Krebszellen besitzen. Diese können sich unabhängig von Wachstumsfaktoren wie Steroidhormone vermehren. In solchen Fällen ist eine antihormonelle Therapie nicht angezeigt. BRCA2- und BRCA negative Tumoren behalten diesbezüglich die Merkmale von normalen Brustdrüsenzellen.

## 4.6 HER2/neu Expression

Es besteht die Möglichkeit, dass die Amplifikation vom HER2/neu-Gen in gutartigen Brustbiopsien mit einem substanziiell erhöhten Risiko für Mammakarzinome assoziiert ist. HER2/neu-Amplifikation ist häufiger in Biopsien mit mittelmässiger bis florider duktaler Hyperplasie gefunden worden. Diese genetische Alteration könnte ein frühes Stadium der Brustkrebsentwicklung darstellen (Stark A et al., 2000).

Man nimmt an, dass das Protoonkogen HER2/neu (ErbB2) ein wichtiger Faktor in der Karzinogenese der Brust darstellt und dass 25-30% der Mammakarzinome beim Menschen das Protein überexprimieren (Stark A et al., 2000; King CR et al., 1989). HER2/neu soll mit Parametern verbunden sein, die die Aggressivität des Mammakarzinomes reflektieren (fortgeschrittenes Stadium, schwache Differenzierung und Rekurrenz) (Pellikainen J et al., 2004). Die Amplifikation dieses Gens oder die Überexpression des Proteins sind also ein Marker für eine schlechte Prognose für Patienten mit diesem Phänotyp. Es gibt wenige Untersuchungen über die Expression von HER2/neu im hereditären Brustkrebs. Die konfliktreichen Ergebnisse suggerieren, dass die Überexpression von HER2/neu kaum ein wichtiger Teil der molekularen Pathogenese im BRCA1-assoziierten Mammakarzinom ist, obwohl diese Tumoren üblicherweise hochgradig maligne und hormonrezeptorennegativ sind; ein Bild, das normalerweise mit HER2/neu-Amplifikation oder Überexpression im Brustkrebs assoziiert wird (Chappuis PO et al., 2000; Lakhani SR et al., 2002; Foulkes WD et al., 2000; Phillips KA, 2000; Stoppa-Lyonnet D et al., 2000; Robson M et al., 1999; Robson M, 2000).

Wir können mit unserer Studie leider kaum etwas über die Expression von HER2/neu beim erblichen Brustkrebs aussagen. Bei einem Fünftel (20%) der BRCA-getesteten Patienten wurde ein Mammakarzinom diagnostiziert, das HER2/neu exprimierte. Bei den nicht getesteten Patienten mit sporadischem Brustkrebs war es etwa ein Drittel (32%) (Abbildung 22). Diese Zahlen stimmen mit denen der Literatur überein (25-30%). Wir verifizierten in unserem Kollektiv, ob BRCA1-Tumoren, die häufig mit schwacher Differenzierung und Hormonrezeptorennegativität assoziiert waren, wie vermutet, häufiger HER2/neu exprimieren. Bei nur vier der 18 BRCA1-Schnittpräparaten war die Expression von HER2/neu untersucht worden. In den restlichen Fällen konnte in den Pathologiebefunden keine Information über den HER2/neu-Status gefunden werden. Ein Grund dafür ist, dass diese Untersuchung relativ neu ist, vor einigen Jahren gehörte sie nicht zur Standardbeschreibung der Tumoren. Keiner dieser vier BRCA1-Tumoren exprimierte HER2/neu. Bei den anderen zwei Gruppen (BRCA2 und BRCA negativ) war etwa ein Viertel der Tumoren HER2/neu-positiv (Abbildung 23). Möglicherweise können BRCA1-Tumoren trotz aggressiver Merkmale nicht mit HER2/neu-Überexpression verbunden werden. Es fehlen jedoch zu viele Daten, um eine statistisch sinnvolle Berechnung durchzuführen (Tabelle 23). Um das Verhalten von

HER2/neu im hereditären Mammakarzinom besser zu verstehen, wäre eine Studie mit systematischer HER2/neu-Immunhistochemie für alle Schnittpräparate notwendig.

Die Produkte der zwei BRCA-Gene sind zwei grosse, ubiquitäre Proteine von 1863 (BRCA1) und 3418 (BRCA2) Aminosäuren, deren Sequenz sich voneinander unterscheidet. Sie befinden sich beide im Kern von normalen Zellen (Daniel DC, 2002). Es wurde gezeigt, dass in BRCA1- und BRCA2-defizienten Zellen eine Chromosominstabilität mit Anhäufung von chromosomalen Fehlern, DNA-Reparationsdefekten und Wachstumsarrest zu finden ist. Dies ist ein Hinweis dafür, dass BRCA1- und BRCA2-Proteine an die Reparatur und Rekombination von DNA beteiligt sind und eine Rolle in der Regulierung der Transkription von einer ganzen Reihe von Genen spielt. BRCA1 und BRCA2 scheinen dabei fähig, klar unterschiedliche Rollen zu spielen, wobei sie zweifellos miteinander vorübergehend für Schlüsselreaktionen in der Doppelstrangbruch-Reparatur interagieren (Liu Y und West SC, 2002). Ausserdem wurden beide BRCA-Proteine mit Checkpoints im Zellzyklus assoziiert (Daniel DC, 2002).

Die Funktionen von BRCA1 sind besser dokumentiert als diejenigen von BRCA2. Für BRCA1 kennt man eine Menge Proteinpartner; viele von diesen sind Transkriptionsfaktoren, die spezifische Promotoren von Genen binden. Man kann also dem BRCA1-Protein eine Rolle in der Regulierung der Transkription zuweisen. Andere Partner von BRCA1 sind Komponenten der Transkriptionsmaschine, Koregulatoren von verschiedenen zellulären Wegen, Tumorsuppressoren und Zellzyklusregulatoren. Eine wichtige Funktion von sowohl BRCA1 als auch BRCA2 ist die Teilnahme an der Reparatur von geschädigter DNA. So wird in Antwort auf ionisierende Strahlen das BRCA1-Protein von der ATM-Kinase und der G2/M-Checkpoint-Kinase (CHK2) phosphoryliert (Yoshida K und Miki Y, 2004). Es kann dann BRCA1 in Komplexe involviert werden, die die Reparatur von der geschädigten DNA starten. Ein Beispiel dafür ist die Interaktion von BRCA1 und BRCA2 mit dem Protein Rad51, welches in der Rekombination und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur eine Rolle spielt (Scully R et al., 1997). BRCA1 kann aber auch für die Wachstumskontrolle der Zellen mit p53 interagieren, um die Transkription von Tumorsuppressorgen  $p21^{waf1/cip1}$  zu stimulieren. Dies hat einen Arrest des Zellzyklus zur Folge (Chai Y et al., 1999). Viele Forschungsgruppen haben sich mit der Regulierung von  $p21^{waf1}$  durch BRCA1 beschäftigt. Einige berichten über eine Hochregulation durch die Überexpression von BRCA1 (mit darauf folgendem Zellzyklusarrest), andere können nachweisen, dass ein Verlust von BRCA1 die Expression von  $p21^{waf1}$  aktivieren kann. Somit bleibt die genaue Funktion von BRCA1 in der Regulierung von  $p21^{waf1}$  noch unklar (Bertwistle D und Ashworth A, 1999).

BRCA1 scheint die Promotoren derjenigen Gene zu aktivieren, die bei Stress in Zellzyklus-Checkpoints involviert sind. Die Gene, die durch BRCA1 inhibiert werden, könnten diejenigen sein, die für die Zellteilung verantwortlich sind (Bertwistle D und Ashworth A, 1999). Von speziellem Interesse in diesem Kontext ist der Bericht, dass Wildtype-BRCA1 in transfizierten Zellen die Signalisation durch Oestrogenrezeptoren inhibieren kann (Fan S et al., 1999). Dies suggeriert, dass ein

Verlust von BRCA1 zu einer erhöhten Fähigkeit des Brustepithels zur Proliferation als Antwort auf Oestrogene führen könnte.

Es liegt nahe, dass ein funktionelles Fehlen der BRCA-Proteine in den Zellen zu einer reduzierten Fähigkeit zur DNA-Reparation führen kann. Die Folge davon ist eine genomische Instabilität, ein Charakterzug von Krebszellen. Die Entwicklung von Tumoren ist somit favorisiert, vor allem wenn p53 in BRCA1- und BRCA2-mutierten Zellen nicht funktionell ist. Der p53-abhängige Zellzyklusarrest und die Apoptose durch p21<sup>waf1/cip1</sup> können nicht statt finden. Immunohistochemische Studien zeigten, dass in 15-30% aller Mammakarzinome eine Expression von p53 detektierbar ist; dies könnte eine Folge von Mutationen sein, die das p53-Protein stabilisieren (Chappuis PO et al., 2000). In dieser Hinsicht wurden einige Studien publiziert, die die Frequenz von p53-Mutationen in hereditärem und nicht hereditärem Brustkrebs untersucht haben. Eine davon ist die Studie von Sensi E et al. (2003). Die Forschungsgruppe entdeckte, dass BRCA negative Tumoren eher selten p53-Mutationen besitzen, im Vergleich zu BRCA1-Tumoren. Diese Ergebnisse wurden von Phillips KA et al. (1999) unterstützt. Weitere Forschungsgruppen (Lakhani SR et al., 2002; Crook T et al., 1998) konnten in ihren Testgruppen nachweisen, dass BRCA-assoziierte Tumoren häufiger ein mutiertes p53 besitzen als die sporadischen Kontrolltumoren. Die BRCA1-Tumore in Foulkes WD et al.'s Studie (2000) hatten in 60% der Fälle eine p53-Überexpression, die BRCA1/2-negative Kontrollgruppe hingegen nur in 17% der Fälle. Aber Crook T et al. (1998) fanden keinen Verlust von p21<sup>waf1</sup> in BRCA-assoziierten Tumoren und schlossen daraus, dass solche Tumoren Objekt von multiplen Mechanismen der Wachstumsregulation sein müssen und nicht nur von p53 abhängig sind. Es stellt sich die Frage, ob die Inaktivierung der p53-Checkpoints wirklich eine Etape in der Entwicklung der BRCA-assoziierten Tumoren darstellt und welche Rolle der Verlust des BRCA-Genes in diesem Prozess besitzt. Deshalb muss weiter untersucht werden, welche Gene direkt von den BRCA-Proteinen reguliert werden und welche relevant für eine Tumorsuppression sind.

#### **4.7 Expression von Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie in den Tumorzellen**

Die multiplen Funktionen der AP-2-Proteine verursachten intensive Forschung bezüglich einer möglichen Rolle von deregulierter Expression in Neoplasien. Verschiedene Studien (Schorle H et al., 1996; Moser M et al., 1997) berichten über die Entwicklungsdefekte in AP-2-defizienten Mäusen. So weiss man, dass AP-2 regulierende Funktionen in der Kontrolle von Apoptose, Zellzyklus und Genexpression besitzt (Hilger-Eversheim K et al., 2000). Die Inhibition der Myc-Transaktivierung durch AP-2 könnte einer der Mechanismen darstellen, der an der Inhibition von Zellproliferation während der Zelldifferenzierung teilnimmt (Gaubatz S et al., 1995). In HepG2 Hepatom-Zelllinien ist AP-2 fähig, in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, die Transkription von TGF $\alpha$ , einem mitogenen Polypeptid, das der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) angehört und eine

wichtige Rolle in der Onkogenese spielt, zu aktivieren (Wang D et al., 1997). Später gab es Hinweise, dass TNF $\alpha$  die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  postranskriptionell während der TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose in Brustkrebszellen reguliert. Das Spalten von AP-2 $\alpha$  durch Caspasen könnte ein wichtiger Mechanismus für die Regulierung von Zellüberleben, Proliferation, Differenzierung und Apoptose darstellen (Nyormoi O et al., 2001). Diese Aussagen deuten auf einen onkogenen Charakter von AP-2. Einerseits soll AP-2 das TGF $\alpha$ -abhängige Zellwachstum ankurbeln können, andererseits soll seine Spaltung notwendig sein für die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose.

Ein AP-2-Expressionsverlust in humanen Melanomzellen soll mit einer Reduktion der Expression von Protoonkogen c-Kit korrelieren (Huang S et al., 1998). Die Progression von Melanomen wurde mit dem Verlust der c-Kit-Expression assoziiert. 70% der Melanomzellen exprimieren kein c-Kit. Somit denkt man, dass AP-2, wenn vorhanden, als ein Tumorsuppressorgen agiert, dessen Expression im Verlauf der Progression von Melanomen jedoch verloren geht und dass dies einer der Mechanismen der Tumorgenese und der Metastasierung im kutanen malignen Melanom darstellen könnte. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass ras-Onkogene in Teratokarzinom PA-1-Zelllinien beim Menschen einen hohen AP-2 mRNA-Spiegel induzieren. Die AP-2-Überexpression hat jedoch Selbstinterferenz zur Folge; in diesen Zellen wird der AP-2-Spiegel dramatisch unterdrückt. Biologische Effekte von N-Ras können also durch Selbstinhibierung von AP-2 nach dessen Überexpression erreicht werden. Dieser Prozess führt zu maligner Transformation (Kannan P et al., 1994 und 1999). So sollen AP-2-Promotoren einige Bindungsorte für AP-2 selber beinhalten (Bauer R et al., 1994). Das bedeutet, dass AP-2-Gene durch Autoregulation kontrolliert werden. So wäre ein inadäquat aktiviertes AP-2-Gen fähig, sich selber "eingeschaltet" zu behalten. Andererseits könnten Agenten, die AP-2-Proteine inhibieren, die Expression von AP-2 reduzieren. Weiter wurde vorgeschlagen, dass ein epigenetischer Vorgang wie eine abnormale DNA-Methylierung in einer CpG-reichen Region des AP-2 $\alpha$ -Promotors eine Ursache für den Verlust vom AP-2 $\alpha$ -Protein im Brustkrebs sein könnte (Douglas DB et al., 2004). Auch letztere Ergebnisse schlagen vor, dass ein Verlust der normalen Expression des vermutlichen Tumorsuppressorgenes AP-2 zur Tumorgenese führen kann.

Um die Rolle von AP-2 in der postnatalen Brustdrüse genauer zu untersuchen, entwickelten Zhang J et al. (2003) eine transgene AP-2 $\alpha$ -Maus. In ihren Experimenten stieg die AP-2 $\alpha$ -Expression in der jungfräulichen Brust bis zur Schwangerschaft an, wo sich die lobuloalveoläre Struktur der Brustdrüse entwickelt. Danach wurde ein drastischer Abfall während der Laktation beobachtet, bevor es mit der Umwandlung der Brustdrüse während der Involution wieder reaktiviert wurde. Die Autoren bemerkten weiter, dass eine Überexpression von AP-2 $\alpha$  die Endknospenbildung bei jungfräulichen Mäusen inhibiert und eine lobuloalveoläre Fehlentwicklung während Schwangerschaft und Laktation bewirkt. In dieser Studie entwickelte keine der Mäuse ein Mammakarzinom. Auch konnte keine Änderung des p21<sup>waf1/cip</sup>-Spiegels nachgewiesen werden, obwohl die Zellproliferation signifikant vermindert war. Somit wurde gezeigt, dass die Expression von AP-2 $\alpha$  wichtig für die normale Entwicklung der Brust



bei Mäusen ist, eine Überexpression hingegen soll den Zellwachstum inhibieren. Diese Beobachtung lässt denken, dass AP-2 $\alpha$  eine mögliche Tumorentwicklung in der Brust von Mäusen unterdrückt (Tumorsuppression).

Die erste Studie über die Expression von AP-2-Transkriptionsfaktoren im invasiven Mammakarzinom *in vivo* wurde mit einem Kollektiv von 86 primären Mammakarzinomen von Gee JM et al. (1999) durchgeführt. In dieser Studie wurden AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben. Erklärt wurde dies durch die Beobachtung, dass eine AP-2 $\alpha$ - und AP-2 $\beta$ -Expression mit einer p21<sup>cip</sup>-Expression übereinstimmte. So schlussfolgerten die Autoren, dass eine Expression von AP-2 $\alpha/\beta$  im primären invasiven Mammakarzinom ein Versuch der Zelle sein könnte, durch p21<sup>cip</sup> das Wachstum und die Differenzierung zu stoppen. Wajapeyee N und Somasundaram K (2003) erzeugten einen replikationsunfähigen, rekombinierten Adenovirus, der in die von ihm infizierten Zellenlinien funktionelles AP-2 $\alpha$  exprimieren liess und dadurch den Wachstumsarrest und die Apoptose der Krebszellen induzierte. Gleichzeitig wurde eine Erhöhung der Chemosensibilität dieser Zellen beobachtet. Aufgrund weiterer Resultate schlugen die Autoren vor, dass AP-2 $\alpha$  zusammen mit p53 durch Aktivierung von p21<sup>waf1/cip</sup> den Zellzyklus stoppe und die Apoptose einleite. Dieser Prozess könne in der Tumorsuppression jedoch auch ohne p53 effizient stattfinden. Die Hypothese, dass die Expression von p21<sup>waf1</sup> in Brustkrebszellen von AP-2 eingeleitet wird, wurde von Pellikainen MJ et al. (2003) verworfen. Ihre Ergebnisse suggerierten, dass im Mammakarzinom die Regulierung von p21<sup>waf1</sup> hauptsächlich auf p53- und AP-2-unabhängigen Wegen erfolgt. Zusätzlich schien p21<sup>waf1</sup> keinen prognostischen Wert für die Krankheit zu haben. Die AP-2-Expression konnte auch in ihrer späteren Studie (Pellikainen J et al., 2004) nicht mit der p21<sup>waf1</sup>-Expression assoziiert werden. Es wurden jedoch AP-2-Antikörper benutzt, die keinen Unterschied zwischen den drei brustkrebsassoziierten AP-2-Proteinen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) machten.

Die genaue Rolle von AP-2-Proteinen im Brustkrebs bleibt noch unklar. Einerseits werden AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  mit der Kontrolle von Proliferation, Apoptose und Differenzierung in Mammaepithelzellen assoziiert. Ein Defekt in diesen Prozessen kann womöglich zur Entwicklung eines Mammakarzinoms führen. Andererseits ist im Brustkrebs die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  mit der Expression von HER2/neu verbunden, AP-2 $\alpha$  alleine hingegen mit einer Expression von Oestrogenrezeptoren; einem Marker für eine günstige Prognose. Die folgende Tabelle zeigt, dass AP-2 $\alpha$  eher ein tumorsuppressiver Charakter zugeschrieben werden kann. Es gibt jedoch Studien, die dagegen sprechen. Nicht genau bekannt scheint, ob und wie AP-2 $\gamma$  in der Tumorgenese mitspielt. Aus Überlebensanalysen liess sich ableiten, dass AP-2 $\alpha$  ein schützender Faktor in der Tumorgenese sein könnte, AP-2 $\gamma$  hingegen hatte keinen Einfluss auf die Prognose. In erster Linie soll aber AP-2 $\alpha$  am Tumorprozess teilnehmen; AP-2 $\gamma$  ist möglicherweise nicht involviert (Friedrichs N et al., 2005).

Tabelle 49: Hinweise in der Literatur für eine tumorsuppressive versus onkogene Rolle von AP-2 in Neoplasien

Studie	Isoform	Tumorsuppressorgen	Onkogen
Wang D et al. (1997)	AP-2		TGF $\alpha$ induzierter Zellwachstum via AP-2 Expression in HepG2 Hepatom-Zelllinien
Nyormoi O et al. (2001)	AP-2 $\alpha$		TNF $\alpha$ induzierte Apoptose via Spaltung von AP-2 $\alpha$ durch Caspasen in Brustkrebszellen
Huang S et al. (1998)	AP-2	c-kit induzierte Tumorprogression via AP-2 Verlust in Melanomzellen	
Kannan P et al. (1994 und 1999)	AP-2	N-ras induzierte Tumorprogression via AP-2 Selbstinhibierung in Teratokarzinom PA-1 Zelllinien	
Douglas DB et al. (2004)	AP-2 $\alpha$	Tumorprogression via AP-2 $\alpha$ Verlust nach Hypermethylation in Brustkrebszellen	
Zhang J et al. (2003)	AP-2 $\alpha$	Inhibierung der Entwicklung via AP-2 $\alpha$ Überexpression in transgenen AP-2 $\alpha$ -Mäusen	
Gee JM et al. (1999)	AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\beta$	Tumorsuppression via AP-2 induzierter Expression von p21 <sup>cip</sup> in Brustkrebszellen	
Wajapeyee N und Somasundaram K, (2003)	AP-2 $\alpha$	Tumorsuppression via AP-2 induzierter Expression von p53 und p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> in Brustkrebszellen	

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  nicht parallel verläuft. Im Allgemeinen exprimierten die Tumorzellen weniger AP-2 $\gamma$  als AP-2 $\alpha$  (vergleiche Abbildung 24 und 26). In den meisten Gewebsschnitten konnte kein AP-2 $\gamma$ -Protein nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass AP-2 $\gamma$  keine fundamentale Rolle in der Pathogenese des erblichen Brustkrebses hat, wie es auch schon Friedrichs N et al. (2005) vermuteten. Eine andere Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass im Verlauf der Karzinogenese von normalen Brustdrüsenzellen die Expression des Transkriptionsfaktors verloren geht. So stellte sich die Forschungsgruppe die Frage, ob die AP-2 $\alpha$ -überexprimierenden Tumorzellen eher im DCIS lokalisiert sind und somit die weniger malignen Zellklone darstellen, während invasive Tumorzellen mit niedriger AP-2 $\alpha$ -Expression maligner sind. Im invasiven Karzinom fehlte das Myoepithelium, AP-2 $\gamma$ -positive Zellen mit myoepithelialer Morphologie verschwanden, während AP-2 $\alpha$ -positive Tumorzellen zurückblieben. Undifferenzierte Tumoren konnten auch AP-2 $\gamma$ -positive, atypische Zellen zeigen; die Autoren denken, dass dies jedoch die Konsequenz eines Differenzierungsverlustes oder aber ein Abweichen vom AP-2-Expressionsmuster reflektieren könnte.

Turner BC et al.'s Studie (1998) widerspricht dieser Theorie. Sie wies in Brustkrebszellen im Vergleich zu normalen Epithelzellen einen signifikant erhöhten AP-2 $\gamma$ -Spiegel nach, was erklären kann, weshalb in 25-30% der Mammakarzinome HER2/neu überexprimiert wird, denn laut den Autoren hochregulieren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  die Transkription von HER2/neu. In unserer Studie erkannten wir einen Zusammenhang von AP-2 $\gamma$  und der Differenzierung des Tumors. Es scheint, dass schlecht differenzierte Mammakarzinome AP-2 $\gamma$  häufiger exprimieren als gut differenzierte

Vergleichstumoren. AP-2 $\alpha$ -Expression und Malignitätsgrad korrelierten hingegen nicht signifikant, obwohl viele schlecht differenzierte Tumoren AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach exprimierten. Wir werden später auf den Zusammenhang der Transkriptionsfaktoren AP-2 und Stadium beziehungsweise Malignitätsgrad des Tumors zu sprechen kommen.

Wir untersuchten die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten. Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen zwei Gruppen (Tabelle 24 und 26). Viele Tumoren exprimierten AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach. In zirka einem Drittel der Fälle konnte AP-2 $\alpha$  jedoch klar nachgewiesen werden (Abbildung 24). Eine Expression von AP-2 $\gamma$  konnte hingegen in zirka 80% der Fälle nicht beobachtet werden (Abbildung 26). In der Literatur fanden wir wenig Studien über die Expression von AP-2 $\gamma$  im Mammakarzinom, ein Vergleich ist somit schwierig. Wir können annehmen, dass sowohl familiäre wie auch sporadische Mammakarzinome AP-2 $\gamma$  selten exprimieren, wie schon oben erwähnt.

Wir unterteilten die BRCA-getestete Patientengruppe in drei Gruppen (BRCA1-, BRCA2- und BRCA negative Patienten), und verglichen die Expression der Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in diesen Tumoren. Wir entdeckten, dass die meisten BRCA1-Tumoren AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach exprimierten (Abbildung 25). Keiner dieser Tumoren exprimierte AP-2 $\alpha$  mittelmässig oder stark. Die Präsenz einer BRCA1-Mutation im Mammakarzinom scheint also mit der Abwesenheit einer AP-2 $\alpha$ -Expression zusammenzuhängen. Möglicherweise interagieren diese zwei Gene in der Entwicklung des hereditären Brustkrebses. Fehlt das eine, kann das andere nicht exprimiert werden, die Entwicklung eines Mammakarzinoms ist stark begünstigt. So ist denkbar, dass AP-2 $\alpha$  ein Zielgen des BRCA1-Proteins ist oder umgekehrt. Wenn die Mutation vom BRCA1-Gen mit Merkmalen von Invasivität und Malignität verbunden werden kann, darf man annehmen, dass die Abwesenheit von AP-2 $\alpha$  auch ein Marker für Tumorprogression ist. Dies spricht für die Hypothese, dass AP-2 $\alpha$ , wie auch BRCA1, eine tumorsuppressive Rolle im hereditären Brustkrebs spielt. Die meisten BRCA2-assoziierten Tumoren exprimierten AP-2 $\alpha$  ebenfalls nur schwach, einige exprimierten jedoch AP-2 $\alpha$  stark (Abbildung 25). Bei der statistischen Auswertung ergab sich, dass der Unterschied zwischen BRCA1-Tumoren einerseits und BRCA2- und BRCA negativen Tumoren andererseits signifikant war (Tabelle 25). Das heisst, dass man die BRCA1-Tumoren bezüglich der AP-2 $\alpha$ -Expression klar von den anderen zwei Gruppen abgrenzen muss und dass sich die BRCA2-Tumoren ähnlich wie die BRCA negativen Tumoren verhalten, obwohl BRCA2-Tumoren seltener AP-2 $\alpha$  exprimieren als BRCA negative Tumoren.

Bezüglich der Expression von AP-2 $\gamma$  erhielten wir keine klaren Ergebnisse. Allgemein war die Expression schwach, wie bereits erwähnt. Ausserdem schienen die Tumoren aller drei Gruppen den Transkriptionsfaktor auf gleiche Art und Weise zu exprimieren (Tabelle 27). Zirka 75% aller Tumoren exprimierten ihn nicht, zirka 20% exprimierten ihn schwach (Abbildung 27). Diese Ergebnisse bekräftigen unsere Vermutung, dass AP-2 $\gamma$  in der Entwicklung des hereditären Brustkrebses kaum

eine wichtige Rolle spielen kann. Sie erlauben uns jedoch auch zu denken, dass AP-2 $\gamma$  nicht onkogen ist, sondern eher eine tumorsuppressive Aktion haben könnte, die zu Beginn der Tumorgenese, unabhängig vom BRCA-Status, verloren geht.

#### **4.7.1 Korrelation von Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie mit verschiedenen pathologischen Parametern**

Eine schwache nukleäre AP-2-Expression soll mit der Progression von Brustkrebs korrelieren. In ihrer Studie beschrieben Pellikainen J et al. (2002) eine signifikant reduzierte AP-2-Expression im Karzinomgewebe im Vergleich zu gutartigem Brustdrüsenepithel, die mit fortgeschrittenem Stadium, Lymphknotenbefall, schlechte Differenzierung und Rezidiven, jedoch nicht mit ER/PR-Status, assoziiert wurde. Zu bemerken ist, dass diese Studie einen Antikörper benutzte, der sensitiver für die Isoformen AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\beta$  war (Friedrichs N et al., 2005). Wir beschlossen, unsere Korrelationsanalysen bei unseren BRCA-getesteten Patienten durchzuführen, weil wir uns auf die familiären Brustkrebsfälle beschränken wollten.

**BRCA-Status:** Die statistische Bewertung der Resultate mittels  $\chi^2$ -Test und Kreuztabelle ist schwierig. Unsere BRCA1- und BRCA2-Kollektive sind klein, sodass trotz signifikantem Pearson  $\chi^2$  nur von Tendenzen gesprochen werden kann (Tabelle 28). Die BRCA1-Tumoren werden mit einer fehlenden AP-2 $\alpha$ -Expression, die BRCA negativen Tumoren mit einer starken AP-2 $\alpha$ -Expression assoziiert. Eine solche Tendenz konnte zwischen der AP-2 $\gamma$ -Expression und dem BRCA-Status hingegen nicht festgestellt werden (Tabelle 29). In den meisten Schnittpräparaten war jedoch keine Färbung für AP-2 $\gamma$  nachweisbar.

**pT-Stadium:** In unserer Studie erkannten wir, dass fortgeschrittene Tumoren (hohe pT-Stadien) weniger den Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$  exprimierten (Tabelle 30, Abbildung 28 und 29). So konnten in den in situ Karzinomen sehr häufig AP-2 $\alpha$  stark nachgewiesen werden. In fortgeschrittenen, grossen Tumoren fehlte hingegen eine klare Färbung für AP-2 $\alpha$ . Obwohl der  $\chi^2$ -Test vermuten lässt, dass diese Beobachtung signifikant ist, müssen wir wegen sehr kleinen Fallzahlen behutsam mit den Ergebnissen umgehen. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass im Verlauf des Tumorwachstums die Expression von AP-2 $\alpha$  verloren geht. Eine starke Färbung in den DCIS war schon in der Arbeit von Friedrichs N et al. (2005) beobachtet worden. Der Verlust von AP-2 $\alpha$  wurde aber mit der Entdifferenzierung des Tumors assoziiert. Es wird angenommen, dass die Krebszellen im Verlauf der Tumorentwicklung immer schlechter differenziert sind und die Charakteristika der normalen Brustdrüsenzellen verloren gehen. Daraus können wir folgern, dass die Expression dieses Transkriptionsfaktors in der Pathogenese des Brustkrebses wichtig ist. Bezüglich der Expression von AP-2 $\gamma$  konnte kein klarer Zusammenhang mit dem Tumorstadium gefunden werden (Abbildung 30 und 50). Die meisten Tumoren waren ohnehin AP-2 $\gamma$ -negativ. Eine mögliche Erklärung dafür wurde oben gegeben. Die wenigen AP-2 $\gamma$ -positiven Tumoren waren im pT1 und pT2 Stadium, während

keiner der pT3- und pT4-Tumoren AP-2 $\gamma$  exprimierte. Diese Beobachtung geht in Richtung der oben genannten Theorie.

**Malignitätsgrad:** Wir wissen, dass die BRCA1-Tumoren häufig schlecht differenziert sind. Wir wissen auch, dass diese Tumoren AP-2 $\alpha$  häufig nicht oder nur schwach exprimieren. Statistisch gesehen ist eine Korrelationsanalyse "AP-2 $\alpha$  zu Malignitätsgrad" in dieser Teilgruppe nicht möglich, denn die BRCA1-Gruppe besteht aus zu wenigen Fällen (18 Patienten). Es liegt jedoch nahe, dass diese beiden Merkmale verbunden sind. Wir suchten in unserem BRCA-getesteten Kollektiv nach einem Zusammenhang zwischen AP-2 $\alpha$ -Expression und Malignitätsgrad. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Tabelle 32). Es spricht nur eine Tendenz dafür, dass schlecht differenzierte Mammakarzinome im Verlauf ihrer Entwicklung die Expression des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  verlieren, wie es schon in der Literatur beschrieben worden ist. So konnten wir in unseren Ergebnissen erkennen, dass die meisten schlecht differenzierten Tumoren (G2 und G3 nach Richardson und Bloom) AP-2 $\alpha$  nur schwach oder gar nicht exprimierten. In allen G1-Tumoren konnte eine spezifische, bei einigen nur eine schwache, bei den meisten jedoch eine mittelmässig oder sogar starke Färbung nachgewiesen werden. Wir dachten, dass die Restriktion auf die BRCA-getesteten Patienten die Ergebnisse auf irgendeine Weise beeinflussen könnte. Bei der Korrelationsanalyse "AP-2 $\alpha$  zu Malignitätsgrad" konnte jedoch auch bei Erweiterung des Kollektivs auf alle 270 Patienten keine Signifikanz gefunden werden. Eine plausible Erklärung für diese Differenz zur Literatur ist schwierig zu geben. Eine gewisse Rolle kann die individuelle, subjektive Bewertung des Differenzierungsgrades der Tumoren spielen. Unsere Tumoren wurden von verschiedenen Pathologen eingestuft. Andererseits ist möglicherweise unser Kollektiv zu klein, um eine statistisch signifikante Aussage erörtern zu können. In der Tat gab es in unserem BRCA-getesteten Kollektiv nur sieben G1-Tumoren. Es wäre möglich, dass die Entdifferenzierung der Tumoren mit dem Verlust der AP-2 $\alpha$ -Expression einhergeht, dass sich aber einige schlecht differenzierte Karzinome atypisch bezüglich dieser Hypothese verhalten und sich die Expression dieses sonst tumorsuppressiven Transkriptionsfaktors in späteren Stadien wieder aneignen, um wie in Hepatom-Zelllinien die Transkription von TGF $\alpha$  zu aktivieren und noch besser zu proliferieren (Wang D et al., 1997). Oder es wird in schlecht differenzierten Tumoren durch Suppression der TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose, welche normalerweise in Brustkrebszellen stattfinden müsste, das Spalten von AP-2 $\alpha$  durch die Caspasen umgangen (Nyormoi O et al., 2001). Dadurch erhöhen sich die AP-2 $\alpha$ -Spiegel. Die genaue Rolle von AP-2 $\alpha$  im invasiven Mammakarzinom ist noch nicht ganz geklärt. Möglicherweise muss nach anderen Faktoren gesucht werden, welche eine direkte Aktion auf die Expression von AP-2 $\alpha$  haben und somit unabhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors einen Einfluss haben. Einerseits ist die genaue Art und Weise, wie BRCA1 und AP-2 $\alpha$  interagieren, noch nicht untersucht worden. Andererseits könnte es sein, dass AP-2 $\alpha$  auf die Expression von AP-2 $\gamma$ , oder umgekehrt, einen Einfluss hat und sich diese zwei Transkriptionsfaktoren somit gegenseitig aktivieren oder inhibieren können.

Wir können bezüglich der Expression von AP-2 $\gamma$  mit unseren Ergebnissen trotz signifikantem Pearson  $\chi^2$  keine statistisch begründeten Aussagen treffen, da wie schon oben erwähnt, eine grosse Mehrzahl der Krebszellen kein AP-2 $\gamma$  exprimierten. Die schlecht differenzierten Mammakarzinome schienen AP-2 $\gamma$  jedoch tendenziell häufiger zu besitzen, wenn mit den gut differenzierten Tumoren verglichen. Es wurde einzig bei G3-Tumoren eine mittelmässige AP-2 $\gamma$  Färbung nachgewiesen (Tabelle 33, Abbildung 34 und 35). So ist es denkbar, dass AP-2 $\gamma$  eine onkogene Rolle spielt. In manchen Fällen können undifferenzierte Tumoren AP-2 $\gamma$  exprimieren. In der Literatur sind die Angaben über die Rolle dieses Transkriptionsfaktors im Mammakarzinom kontrovers. Weitere Studien wären nötig, um sich ein besseres Verständnis zu verschaffen.

**Hormonrezeptoren Expression:** Im Brustkrebs scheint die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  mit der Expression von HER2/neu verbunden, AP-2 $\alpha$  alleine hingegen mit einer Expression von Oestrogenrezeptoren zu sein; ein Marker für günstige Prognose. Ergebnisse von Friedrichs N et al.'s Studie (2005) zeigen, dass die ER-Expression mit einer besseren Prognose verbunden ist und dass ER- und AP-2 $\alpha$ -Expression korrelieren. Könnten niedrige AP-2 $\alpha$ -Spiegel in ER-negativen, schlecht differenzierten BRCA1-Tumoren die vermutlich tumorsuppressive Rolle des Transkriptionsfaktors im Mammakarzinom bestätigen? Tatsächlich konnten wir bei unseren BRCA1-Patienten eine Mehrzahl Tumoren finden, die einerseits keine Oestrogenrezeptoren besaßen, andererseits kaum AP-2 $\alpha$  exprimierten. In BRCA1-assoziierten Mammakarzinomen scheinen diese zwei Merkmale also stark voneinander abhängig zu sein (Tabelle 34). Niedrige AP-2 $\alpha$ -Spiegel in typischerweise ER-negativen, schlecht differenzierten BRCA1-Tumoren sprechen für eine tumorsuppressive Rolle dieses Transkriptionsfaktors. Eine erweiterte Analyse aller BRCA-getesteten Patienten zeigte, dass diese Abhängigkeit auch beim familiären Mammakarzinom zu finden ist. Wenn Oestrogenrezeptoren in den Krebszellen vorhanden waren, färbten sich die Schnittpräparate signifikant stärker für AP-2 $\alpha$  als die Tumoren, die keine Oestrogenrezeptoren besaßen, was für eine gute Prognose für die betroffenen Patienten spricht. Wir können mit der vorliegenden Studie bestätigen, dass, im Gegensatz zu AP-2 $\alpha$ , die Expression von AP-2 $\gamma$  mit der Expression von Oestrogenrezeptoren nicht zusammenzuhängen scheint (Tabelle 35).

Was die Expression von Progesteronrezeptoren in BRCA-getesteten Patienten betrifft, stimmen unsere Ergebnisse mit denen der Oestrogenrezeptoren überein (Tabelle 36 und 37). Global kann also gesagt werden, dass die Expression von AP-2 $\alpha$  mit der Anwesenheit von Hormonrezeptoren auch im familiären Mammakarzinom assoziiert ist und dass AP-2 $\gamma$  und Hormonrezeptoren sich unabhängig voneinander verhalten.

**HER2/neu Expression:** Mehrere Arbeiten dokumentierten den Zusammenhang von AP-2 mit Protoonkogen HER2/neu im Mammakarzinom, um die Rolle von diesem Transkriptionsfaktor in der Entwicklung und Progression der Krankheit besser zu verstehen. Laut Bosher JM et al.'s zweite Studie (1996) wird das Gen HER2/neu (c-ErbB2) durch die Bindung von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  an den Promotor

aktiviert. AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  waren in der Mehrzahl der c-ErbB2-überexprimierenden Brustkrebszelllinien hoch exprimiert. Dieselben Autoren hatten in ihrer ersten Studie (1995) den Faktor OB2-1 beschrieben, der mit dem Faktor AP-2 verwandt ist und die c-erbB2 Transkription hochreguliert. Die weiteren Analysen von diesem OB2-1 zeigten, dass er eine Kombination aus drei AP-2-Proteinen, AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , ist. Alle drei AP-2-Proteine zeigten eine hohe Homologie und waren fähig, den c-ErbB2-Promotoren zu binden, AP-2 $\alpha$  und  $\gamma$  waren dabei drei bis vier Mal aktiver als AP-2 $\beta$ . Turner BC et al. (1998) bestätigten diese Ergebnisse. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen AP-2 $\alpha$ /AP-2 $\gamma$ -Expression und HER2/neu-Expression.

Einige Jahre später untersuchten Jäger R et al. (2005) in bitransgenen LTR $\gamma$ /MMTV/neu-Mäusen die Rolle von AP-2 $\gamma$  in der Entwicklung und der Progression von Brusttumoren. Es zeigte sich, dass in transgenen LTR $\gamma$ -Mäusen (mit AP-2 $\gamma$ -Überexpression) nur eine sehr geringe Überexpression von ErbB2 stattfand; diese Mäuse entwickelten kein Mammakarzinom. Die transgenen MMTV/neu-Mäuse (mit ErbB2 Überexpression) hingegen entwickelten früher ein Mammakarzinom als die bitransgenen LTR $\gamma$ /MMTV/neu-Mäuse, deren Tumoren aber dann signifikant fortgeschrittener waren. Deshalb denken die Autoren, dass während AP-2 $\gamma$  die Inzidenz des Mammakarzinoms vermindert, favorisiert es die Progression von bestehenden Tumoren und dass AP-2 $\gamma$  neben der Induktion vom ErbB2-Gen eine kontroverse Rolle im Mammakarzinom beim Menschen spielt.

Die erste grosse immunhistochemische Studie, die die Beziehung zwischen der membranösen Überexpression von HER2/neu-Rezeptoren und AP-2 in klinischem Mammakarzinomgewebe beschrieb, wurde von Pellikainen J et al. im Jahr 2004 publiziert. Eine HER2/neu-Überexpression war oft mit einer hohen AP-2-Expression verbunden. Ausserdem konnte die AP-2-Expression eine vorteilhaftere Prognose für Patienten mit einem solchen Phänotyp offerieren. Es wurde jedoch nicht zwischen AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  unterschieden. Es gibt auch eine Publikation (Gee JM et al., 1999), die eine umgekehrte Relation zwischen AP-2 und HER2/neu in Brustkrebszellen beschreibt. Diese Experimente entdeckten in AP-2-positiven Zellen nur dann höhere HER2/neu-Spiegel, wenn die Zellen gleichzeitig ER-positiv waren.

Tabelle 50: Hinweise in der Literatur für den Einfluss von AP-2 auf die HER2/neu Expression

Studie	Isoform	Überexpression von HER2/neu
Bosher JM et al. (1995 und 1996)	AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\gamma$ 3-4x mehr als AP-2 $\beta$	Hochregulierung HER2/neu durch Bindung an Promotor in Brustkrebszelllinien
Turner BC et al. (1998)	AP-2 $\alpha$ und AP-2 $\gamma$	Korrelation mit HER2/neu Expression im Brustkrebs
Jäger R et al. (2005)	AP-2 $\gamma$	nebst Induktion von ErbB2 kontroverse Rolle in transgenen Mäusen
Pellikainen J et al. (2004)	AP-2	HER2/neu Überexpression mit hoher AP-2 Expression verbunden in Brustkrebszellen
Gee JM et al. (1999)	AP-2	Korrelation mit hohen HER2/neu-Spiegeln, nur wenn ER-positiv in Brustkrebszellen

Wir versuchten, die Expression von HER2/neu im BRCA1- und BRCA2-assoziierten Mammakarzinom darzustellen. Dies erwies sich als schwierig, da in einer grossen Anzahl der Fälle die nötigen Daten dazu fehlten. Es ist natürlich unmöglich, verlässliche Aussagen über eine mögliche Verbindung zwischen AP-2 $\alpha$ /AP-2 $\gamma$  und HER2/neu speziell bei Tumoren von BRCA1/2-Patienten zu machen. Es soll jedoch vermerkt werden, dass in unserem Kollektiv alle vier BRCA1-Patienten, bei denen der HER2/neu-Status bekannt war, HER2/neu nicht exprimierten (Abbildung 23). Ob ein Zusammenhang mit der beobachteten Neigung zur Abwesenheit von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in solchen Tumoren besteht, kann hier nicht geklärt werden. Auch bei der Erweiterung des Kollektivs auf alle BRCA-getesteten Fälle konnte keine Korrelation zwischen AP-2 $\alpha$ - und HER2/neu-Expression gefunden werden (Tabelle 38). Bezüglich des Zusammenhanges zwischen AP-2 $\gamma$  und HER2/neu konnten keine eindeutigen Rückschlüsse gezogen werden. Tumoren, die AP-2 $\gamma$  kaum oder nicht exprimierten waren tendenziell häufiger HER2/neu-negativ, im Vergleich zu Tumoren, welche eine mittelmässige AP-2 $\gamma$ -Färbung aufwiesen. Möglicherweise interagieren diese zwei Proteine miteinander. Im Einklang mit den Ergebnissen von Jäger R et al. (2005) könnte AP-2 $\gamma$  die Expression von HER2/neu induzieren. Unsere Ergebnisse müssten durch eine Studie mit einer höheren Anzahl Patienten mit bekanntem HER2/neu-Status verifiziert werden.

**Histologischer Karzinomtyp:** Die lobulären und duktaalen Mammakarzinome unterscheiden sich nicht nur auf histologischer und klinischer Ebene, sondern sie besitzen auch distinkte Transkriptionsprogramme für die Genexpression (Zhao H et al., 2004; Korkola JE et al., 2003). Subtile Verschiedenheiten der Genexpression könnten für phänotypische Unterschiede dieser beiden Karzinomtypen verantwortlich sein. Korkola JE et al. (2003) denken, dass insbesondere die Expression von Genen, die in Zelladhäsion und Invasion verwickelt sind, in lobulären und duktaalen Karzinomen unterschiedlich sind. Dies lässt vermuten, dass das invasive Wachstum durch separate Mechanismen erfolgt. Untersucht wurde unter anderem, ob sich die duktaalen und die lobulären Mammakarzinome in Bezug auf die AP-2-Expression unterschiedlich verhalten. Pellikainen J et al. (2002) konnten zeigen, dass die lobulär invasiven Karzinome häufiger AP-2 (ohne Differenzierung zwischen AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$ ) im Kern der Krebszellen exprimieren (63% der Fälle) als die duktaalen (48%) oder andere Karzinomtypen (45%).

Auch wir konnten in unserem Gesamtkollektiv nachweisen, dass die duktaalen Karzinome signifikant weniger stark AP-2 $\alpha$  exprimierten als die lobulären Karzinome (Abbildung 36, Tabelle 40, Abbildung 37-41). Die Expression von AP-2 $\gamma$  war hingegen in beiden Karzinomtypen ähnlich (Abbildung 42, 43 und 44, Tabelle 41). Eine bestehende Erklärung für diese Beobachtung konnte in der Literatur nicht gefunden werden; Pellikainen J et al. begründeten die Ergebnisse ihrer oben genannten Studie nicht. Unsere Ergebnisse stützen die These, dass die duktaalen und lobulären Karzinome unterschiedliche Genexpressionsmuster haben.



#### 4.7.2 Zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion

In Keratinozyten befindet sich AP-2 $\alpha$  in den Basalzellen im Kern, in den oberflächlichen Zellen ist es zytoplasmatisch gelegen. Durch die Translokation von AP-2 $\alpha$  in das zytoplasmatische Kompartiment, wird die Funktion des Transkriptionsfaktors reduziert (Mazina OM et al., 2001). Beobachtungen über die Expression von AP-2 im Zellkern versus dessen Expression im Zytoplasma der Brustkrebszellen wurden von Pellikainen J et al. (2002) gemacht. In ihrer Studie bemerkten die Autoren, dass vorwiegend ein nukleäres Expressionsschema bestand, wobei in 47% der Fälle auch eine zytoplasmatische Färbung zu sehen war. Zytoplasmatische Positivität war häufiger in ER/PR-negativen Tumoren zu sehen und war zusätzlich mit einem duktalem Histotyp und einer schlechten Differenzierung assoziiert. Ein Übergang von nukleärer zu zytoplasmatischer AP-2-Expression wurde bei progredienter, zellulärer Atypie beobachtet. Falls AP-2 im Zytoplasma vorhanden war, verkürzte sich das rezurrenzfreie Überleben (RFS) und das brustkrebsverbundene Überleben (BCRS) umso mehr für Patienten mit Tumoren, in denen eine nur schwache nukleäre AP-2-Expression vorhanden war. Während in Pellikainen J et al.'s zweite Studie (2004) nukleäres AP-2 mit HER2/neu-Expression assoziiert war, konnte dies für zytoplasmatisches AP-2 nicht gelten. Bei der Kombination nukleäre und zytoplasmatische AP-2-Expression waren 48% der Karzinome HER2/neu-positiv. In einer neueren Studie (Friedrichs N et al., 2005) über das räumliche Verteilungsmuster von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  war in nicht neoplastischem Brustdrüsengewebe eine schwache zytoplasmatische Reaktion nur in wenigen Fällen zu beobachten. Die Autoren bewerteten dies als nicht spezifisch. Über eine allfällige zytoplasmatische Reaktion in neoplastischen Brustkrebszellen wurde nichts gesagt.

Bei unseren Patienten fanden wir, dass die Tumorzellen mit zytoplasmatischer AP-2 $\alpha$ -Färbung einen signifikant niedrigeren AP-2 $\alpha$ -IRS-Mittelwert für Kernfärbung hatten als die Tumorzellen ohne zytoplasmatische Reaktion. Nukleäres AP-2 $\gamma$  und zytoplasmatisches AP-2 $\alpha$  hingegen schienen nicht miteinander verbunden zu sein (Abbildung 51 und 52, Tabelle 47 und 48). Weil die nukleäre Lokalisation von einem Transkriptionsfaktor essenziell für dessen Funktion ist, zeugen sowohl reduzierte nukleäre Expression als auch Anhäufung im Zytoplasma für ein weniger funktionell aktives Protein. Dieser Übergang von AP-2 $\alpha$  vom Zellkern in das Zytoplasma könnte zum Entdifferenzierungsprozess der Krebszellen gehören; einige schlecht differenzierte Krebszellen hätten somit einen Weg gefunden, diesen Tumorsuppressor loszuwerden, um ungestört zu proliferieren. Was die Ursache dieser Translokation ist, bleibt zu klären. Vielleicht ist eines der BRCA-Gene involviert?

Wir interessierten uns weiter für den Zusammenhang von Malignitätsgrad, Hormonrezeptoren, HER2/neu und zytoplasmatische AP-2 $\alpha$ -Reaktion. Tendenziell waren die Karzinome, bei denen in den Zellen AP-2 $\alpha$  im Zytoplasma vorhanden war, häufig schlecht differenziert (G3 nach Richardson und Bloom) (Abbildung 46, Tabelle 42). Wie schon in früheren Arbeiten beschrieben, exprimierten diese Tumoren signifikant seltener Oestrogenrezeptoren, im Vergleich zu Tumoren ohne zytoplasmatisches AP-2 $\alpha$  (Abbildung 47, Tabelle 43). Auch der Progesteronrezeptorenspiegel war niedriger, ohne dass

dies statistisch signifikant war (Abbildung 48, Tabelle 44). Die Tatsache, dass sich unter den Fällen mit zytoplasmatischer AP-2 $\alpha$ -Reaktion tendenziell häufiger BRCA1/2-Mammakarzinome befanden als unter den zytoplasmatisch negativen Fällen (Abbildung 50, Tabelle 46), bekräftigt die Hypothese, dass die Translokation von AP-2 $\alpha$  ins Zytoplasma ein Marker für schlecht differenzierte Tumoren ist. Man erinnere sich, dass vor allem BRCA1-assoziierte Tumoren hochgradig maligne sind und oft keine Hormonrezeptoren und AP-2 $\alpha$  exprimieren. Zytoplasmatisches AP-2 $\alpha$  konnte sowohl bei unseren Patienten als auch in der Literatur nicht mit einer HER2/neu-Expression korreliert werden (Abbildung 49, Tabelle 45).

## 5 Zusammenfassung

**Ziel:** Die Transkriptionsfaktoren der AP-2-Familie wurden nach unseren Kenntnissen noch nie im BRCA-assoziierten Mammakarzinom analysiert. Um die Karzinogenese dieser erblichen Krankheit und deren Akteure besser zu verstehen, haben wir uns deshalb mit dieser Studie zum Ziel gesetzt, die Expression der zwei Transkriptionsfaktoren AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  im Tumorgewebe von BRCA-Patienten immunohistochemisch zu untersuchen. Es sollen die Proteinspiegel von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  in Relation zu verschiedenen histopathologischen Merkmalen der BRCA-assoziierten Tumore dargestellt und mit BRCA negativen Kontrolltumoren verglichen werden.

**Material und Methoden:** Für die vorliegende Studie wurden 270 Gewebeproben aus der Mamma, beziehungsweise aus Lymphknoten, Ovar, Vagina, Haut, Thoraxwand und Leber (Mammametastase) von insgesamt 251 Patienten untersucht. 247 der Patienten sind Frauen, vier sind Männer. Das Durchschnittsalter bei der Diagnose beträgt 48.9 Jahre, mit einer Spannweite von 24 bis 87 Jahren. Alle Patienten wurden zwischen 1981 und 2004 unter Verdacht eines Mammakarzinoms in die Universitätskliniken Bonn oder Köln aufgenommen. In der Abteilung für molekulare Gynäko-Onkologie der Universitäts-Frauenklinik in Köln erhielten 130 Patienten den BRCA-Test. Bei den übrigen 121 Patienten wurde der BRCA-Status nicht analysiert (n.a.). Im Rahmen der Diagnostik wurden diesen Patienten Gewebeproben entnommen, welche für die vorliegende Studie zur Verfügung standen. Es konnte ebenfalls auf Pathologiebefunde zurückgegriffen werden, diese bilden die Grundlage für unsere Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Studie wurde mit polyklonalen Antikörpern der Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$ , beziehungsweise AP-2 $\gamma$ , in den Kernen der Krebszellen der 270 Präparate immunhistochemisch dargestellt. Es wurde nach der Avidin-Biotin-Methode gefärbt. Die Bewertung erfolgte mit IRS-Score nach Remmele und Stegner. Zum statistischen Vergleich des Alters bei Diagnose und von AP-2-Scoren wurde der nonparametrische Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon) benutzt. Die Assoziation zwischen BRCA-Status und histopathologischen Parametern wurde mit Kontingenztafeln und  $\chi^2$ -Tests untersucht.

**Ergebnisse:** Wir verglichen die Durchschnittswerte des IRS für die Expression von AP-2 $\alpha$  und AP-2 $\gamma$  bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten: Bezüglich AP-2 $\alpha$  Expression ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den BRCA1- und den BRCA2-Patienten ( $p=0.005$ ), sowie zwischen den BRCA1- und den BRCA negativen Patienten ( $p=0.000$ ). BRCA1-Tumore exprimieren seltener AP-2 $\alpha$ . Die BRCA2-Karzinome unterschieden sich hingegen nicht signifikant von BRCA negativen Karzinome ( $p=0.350$ ). Die drei Gruppen unterschieden sich bezüglich der Expression von AP-2 $\gamma$  nicht signifikant ( $p=0.588, 0.349, 0.083$ ).

Wir führten eine Korrelationsanalyse für die BRCA-getesteten Patienten durch: Die Expression von AP-2 $\alpha$  war tendenziell mit kleinen pT-Stadien verbunden ( $p=0.033$ ). Zwischen AP-2 $\gamma$  und pT-Stadium

bestand keine Korrelation. AP-2 $\alpha$  korrelierte nicht mit dem Karzinomgrad ( $p=0.331$ ). Die Expression von AP-2 $\gamma$  war tendenziell stärker in hochgradigen Tumoren ( $p=0.039$ ). Die meisten ER-negativen Tumore exprimierten AP-2 $\alpha$  nicht oder nur schwach ( $p=0.041$ ). Zwischen der Expression von AP-2 $\alpha$  und dem Progesteronrezeptoren-Status bestand auch eine hoch signifikante, positive Korrelation ( $p=0.024$ ). Die Expression von AP-2 $\gamma$  war von beiden Hormonrezeptoren unabhängig ( $p=0.342$ ,  $0.219$ ). Es gab zwischen AP-2 $\alpha$  und HER2/neu keine Korrelation ( $p=0.154$ ). Lobuläre Karzinome exprimierten häufiger AP-2 $\alpha$ , als duktale Karzinome ( $p=0.004$ ); keine Korrelation jedoch mit AP-2 $\gamma$  Expression ( $p=0.531$ ). Die beobachtete Tendenz, dass zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positive Tumoren schlechter differenziert sind, war statistisch nicht signifikant ( $p=0.351$ ). Diese Tumoren exprimierten hingegen signifikant seltener Oestrogenrezeptoren ( $p=0.044$ ), aber nicht Progesteronrezeptoren ( $p=0.276$ ), und AP-2 $\alpha$  befand sich signifikant weniger im Zellkern ( $p=0.000$ ). Es wurde keine Korrelation mit HER2/neu-Expression ( $p=0.982$ ) und BRCA-Status ( $p=0.344$ ) beobachtet.

Wir beschrieben die Häufigkeitsverteilung verschiedener histopathologischer Daten von den BRCA-getesteten Patienten. Dann teilten wir diese Gruppe in BRCA1-, BRCA2- und BRCA negative Patienten auf und verglichen sie untereinander: Keiner der vier Männer war BRCA1- oder BRCA2-Mutationsträger. Die BRCA1-Patienten waren signifikant jünger, als die BRCA negative Patienten ( $p=0.002$ ), und tendenziell jünger, als die BRCA2-Patienten ( $p=0.068$ ). Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich Tumorlokalisation (rechts-links) ( $p=0.238$ ,  $0.481$ ,  $0.658$ ), oder bezüglich histologischer Typ (duktal, lobulär, medullär, muzinös). Tendenzuell waren BRCA2-Tumore in einem höheren TNM-Stadium bei der Diagnose. BRCA1-Tumoren waren signifikant schlechter differenziert ( $p=0.003$ ), als BRCA2- und BRCA negative Tumoren. Es gab unter der BRCA1-Gruppe keine in situ Karzinome und häufiger ER-negative ( $p=0.000$ ) und PR-negative ( $0.000$ ) Tumoren. Bezüglich HER2/neu-Expression gab keine signifikanten Unterschiede ( $p=0.287$ ,  $0.828$ ,  $0.532$ ).

**Fazit:** AP-2 $\alpha$  scheint im erblichen Mammakarzinom eine tumorsuppressive Rolle zu spielen. Die Präsenz einer BRCA1-Mutation im Mammakarzinom ist mit der Abwesenheit einer AP-2 $\alpha$ -Expression verbunden. Möglicherweise interagieren diese zwei Gene in der Entwicklung des hereditären Brustkrebses. Eine naheliegende Vermutung ist, dass ein fehlendes AP-2 $\alpha$  für die Inaktivierung von p53-Checkpoint und somit für das Fehlen der tumorsuppressiven Prozesse wie Apoptose und Zellzyklusarrest verantwortlich sein könnte. BRCA1-Tumore müssen bezüglich der AP-2 $\alpha$ -Expression klar von den anderen zwei Gruppen (BRCA2- und BRCA negative Tumore) abgegrenzt werden. Der Übergang von AP-2 $\alpha$  vom Zellkern in das Zytoplasma könnte der Ausdruck eines Entdifferenzierungsprozesses der Krebszellen sein.

**Grenzen der Studie:** Wir möchten darauf hinweisen, dass die kleine Anzahl von nachgewiesenen BRCA1- und BRCA2-Fällen ( $n=18$  bzw.  $n=13$ ) die statistische Interpretation der vorliegenden Ergebnisse limitiert. Unsere Beobachtungen müssten deshalb mit weiteren Studien verifiziert werden.

Es muss auch erwähnt werden, dass die pathologischen Diagnosen von verschiedenen Pathologen gestellt wurde. Eine inter-individuelle Variabilität der diagnostischen Methoden ist somit wahrscheinlich. Eine einheitliche Bewertung zum Beispiel des Tumorgrades oder des histologischen Typs würde eine noch bessere Interpretation der Resultate ermöglichen.

Für die vorliegende Studie konnte auf die Pathologiebefunde von insgesamt 251 Patienten zurückgegriffen werden. Bei 130 Patienten war der BRCA-Status bekannt. Wir hatten ausserdem Zugang zu einer riesigen Anzahl von Gewebspräparaten. Dies gibt der Arbeit einen einzigartigen Wert.

## 6 Anhang

An dieser Stelle sind die insgesamt erfassten Rohdaten aufgelistet, um die oben getroffenen Aussagen nachvollziehbar zu machen. Sie werden in Tabellenform aufgelistet.

### Abkürzungsschlüssel, die in der vorliegenden Studie benutzt wurden:

AP-2	Active protein 2
BRCA	Breast cancer gene
LCIS	Carcinoma lobulare in situ
DCIS	Ductal carcinoma in situ
ER	Estrogen-receptor
EGF	Epidermal growth factor
G 1-3	Malignitätsgrad nach Richardson und Bloom
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HER2/neu = c-erbB2	Herceptin-receptor
IRS	Immun reactive score
is	in situ
LOH	Loss of heterozygosity
LK	Lymphknoten
neg.	negativ
PR	Progesteron-receptor
Sig.	Signifikanz
TGF $\alpha$	Tumor growth factor
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor
uv	unklassifizierte Variante
zytopl.	zytoplasmatisch

### Abkürzungsschlüssel für die folgende Tabelle:

Kolonne	benutzte Abkürzung			
<b>Geschlecht</b>	w = weiblich	m = männlich		
<b>Tumorort</b>	ma = Mamma	lk = Lymphknoten	ov = Ovar	th = Thoraxwand
	le = Leber	va = Vagina	r = rechts	l = links
<b>Tumorart</b>	isCA = in situ Karzinom	CA = Karzinom	Meta = Metastase	Rez = Rezidiv
<b>Histotyp</b>	d = duktal	l = lobulär	me = medullär	mu = muzinös
<b>N-Stadium</b>	0 = lymphknotennegativ		1 = lymphknotenpositiv	
<b>M-Stadium</b>	0 = keine Fernmetastasen		1 = Fernmetastasen	
<b>Malignitätsgrad</b>	1 = G1	2 = G2	3 = G3	
	is1 = van Nuys 1	is2 = van Nuys 2	is3 = van Nuys 3	
<b>AP-2<math>\alpha</math> zytopl.</b>	0 = kein AP-2 $\alpha$ im Zytoplasma		1 = AP-2 $\alpha$ im Zytoplasma	
<b>ER/PR</b>	0 = keine Oestrogen/Progesteronrezeptoren		1 = Oestrogen/Progesteronrezeptoren	
<b>HER2/neu</b>	0 = kein HER2/neu		1 = HER2/neu exprimiert	
<b>BRCA-Status</b>	0 = negativ	1 = BRCA1	2 = BRCA2	
<b>überall gilt</b>	x = unbekannt			

Patientennummer	Familiennummer	Geschlecht	Histonummer	Institut für Pathologie	Histojahr	Alter (Jahre)	Tumorort	rechts-links	Tumoroart	Tumorgroesse (cm)	Histotyp	pT-Stadium	n-Stadium	m-Stadium	Malignitätsgrad	AP-2α (IRS)	AP-2α zytopl	AP-2γ (IRS)	ER	PR	HER2/neu	BRCA-Status
.	.	w	10108	Bonn	00	35	ma	l	isCA	x	d	is	0	0	x	12	0	1	x	x	x	x
1	5	w	6337	Bonn	98	38	ma	l	Rez	1.1	d	1	1	1	3	0	1	0	0	0	x	1
1	4	w	14728	Bonn	96	38	ma	l	CA	1.2	d	1	0	x	3	0	1	0	0	0	x	1
6	1	w	19131	Bonn	94	31	ma	r	CA	2.3	me	2	0	0	3	2	1	2	0	0	x	x
10	5	w	89	Köln	95	58	ma	r	CA	0.7	d	1	1	x	2	6	0	0	x	x	x	x
11	1	w	13238	Bonn	95	46	ma	x	CA	3	l	2	1	x	2	1	0	0	1	1	x	0
16	1	w	10007	Bonn	93	28	ma	l	CA	3.5	d	1	0	0	1	3	0	1	1	1	x	0
18	1	w	22816	Kiel	94	48	ma	r	CA	x	d	1	0	x	2	2	0	1	0	0	x	1
19	4	w	785	Neunkirchen	96	35	lk	x	Meta	x	d	x	1	x	x	1	0	12	x	x	x	0
25	2	w	22026	Köln	95	61	ma	r	CA	1	d	1	1	x	2	6	0	0	1	1	x	0
26	1	w	29105	Siegburg	96	49	ma	l	CA	1.2	d	1	0	x	3	4	0	4	0	0	x	1
32	1	w	10489	Bonn	96	35	ma	l	CA	x	d	1	0	0	2	0	0	0	1	0	x	0
33	2	w	11478	Köln	96	38	ma	x	CA	3.1	me	2	x	x	3	6	1	2	1	1	x	x
41	2	w	9539	Berlin	92	55	ma	l	CA	x	d	2	1	0	2	2	0	0	0	0	x	x
43	2	w	4455	Gummersbach	96	38	ma	x	CA	x	d	1	1	x	2	6	0	2	1	1	x	0
47	4	w	21278	Bonn	94	72	lk	x	Meta	x	x	x	1	x	x	9	0	0	x	x	x	x
76	2	w	23601	Kiel	95	73	ma	x	CA	3.2	d	2	1	x	2	0	0	0	1	1	x	x
79	1	w	18453	Bonn	95	30	ma	r	CA	x	d	2	0	x	3	9	0	1	1	0	x	0
85	2	m	33655	Düsseldorf	96	74	ma	l	CA	2.2	l	4	1	x	2	12	0	0	1	1	x	0
91	1	w	16152	Koblenz	96	47	ma	r	CA	0.8	l	1	0	x	2	1	0	0	1	1	x	1
99	1	w	854	Köln	94	57	ma	l	CA	1.1	d	1	x	x	2	2	1	0	x	x	x	0
101	1	w	21854	Siegburg	95	26	ma	l	CA	2	d	2	0	0	3	0	1	0	0	0	x	x
103	2	w	8823	Dessau	97	45	ma	r	CA	2.9	d	2	0	x	2	3	1	0	1	1	x	0
104	3	w	15187	Bonn	97	46	ma	r	CA	1.8	d	1	1	x	2	6	0	0	1	1	0	0
105	1	w	6104	Bonn	03	39	ma	l	CA	1.2	me	1	x	x	3	6	0	1	0	0	0	0
107	1	w	20972	Bonn	97	35	ma	r	CA	x	d	3	1	x	3	6	1	0	1	1	x	0
109	2	w	53058	Speyer	96	32	ma	l	CA	x	d	4	1	x	3	2	1	0	0	0	x	0
110	2	w	9661	Köln	97	53	ma	r	CA	x	d	1	0	0	1	4	0	0	1	1	x	x
116	11	w	3005	Siegburg	01	59	ma	r	CA	1.8	d	4	x	x	3	4	0	1	1	0	x	0
116	3	w	13826	Bonn	02	40	ma	r	CA	1.2	d	1	0	x	3	0	0	0	x	x	x	1
117	2	w	5257	Bonn	95	35	ma	l	CA	x	d	4	1	1	3	6	1	4	1	0	x	x
117	2	w	5258	Bonn	95	35	ma	r	CA	x	d	4	1	1	3	6	1	4	1	0	x	x
124	3	w	14139	Bonn	97	58	le	x	Meta	x	x	2	1	1	2	1	0	0	x	x	x	0
126	4	w	9190	München	02	55	ma	r	CA	1.7	d	1	0	0	2	2	1	1	1	1	0	x
129	1	w	709	Bonn	90	41	ma	r	CA	4	d	2	0	x	3	6	0	4	0	0	x	0
145	2	w	8171	Hamburg	98	38	lk	x	Meta	x	x	2	0	0	3	3	0	2	0	0	x	0
146	2	w	40129	Heidelberg	94	47	ma	l	CA	2	l	2	0	x	3	8	0	0	1	0	0	0
150	3	w	7762	Bonn	98	64	ma	r	CA	2.5	d	2	x	x	3	6	0	4	0	0	x	1
151	2	w	134702	Giessen	01	61	ma	l	CA	2	d	2	1	x	2	2	1	1	1	1	0	0
159	1	w	6147	Bonn	95	46	ma	l	CA	x	d	1	1	x	3	3	1	0	1	1	x	0
164	1	w	16043	Köln	96	27	ma	r	CA	1.1	d	1	0	0	2	3	0	0	1	1	x	0
165	2	w	19235	Bonn	94	38	ma	l	CA	x	d	2	1	x	3	0	0	0	0	1	x	x
166	2	w	4737	Recklinghausen	98	36	ma	r	CA	2.5	d	2	0	x	2	6	0	1	0	1	x	2
166	2	w	4737	Rechlinghausen	98	36	ma	l	CA	0.9	d	1	0	x	2	6	0	1	1	1	x	2
179	2	w	24400	Würselen	98	58	ma	l	CA	4	d	1	1	x	3	2	1	2	0	1	x	0
185	1	w	21973	Bonn	00	54	ma	x	CA	x	l	1	x	x	2	9	0	1	0	0	0	0
187	2	w	2133	Bonn	89	51	ma	l	CA	4.6	d	3	0	x	2	4	1	0	1	x	x	x
191	3	w	11761	Berlin	91	46	ma	l	CA	2	d	1	1	x	3	12	0	0	0	0	x	x
192	1	w	19897	Bonn	98	34	ma	l	CA	3.5	me	2	0	0	3	2	1	1	0	1	0	0
198	3	w	19288	Bonn	81	46	ma	x	CA	0.7	d	1	0	x	3	3	0	0	x	x	x	x
207	2	w	18830	Bochum	98	74	ma	l	CA	2.1	l	2	0	0	2	3	0	0	1	0	x	0
210	2	w	29571	Koblenz	97	43	ma	l	CA	2.8	d	2	0	x	3	2	1	0	0	1	x	0
217	1	w	24310	Soest	99	33	ma	r	CA	0.8	d	1	x	x	2	0	1	0	0	0	x	0
221	1	w	7425	Neuwied	98	40	ma	r	CA	2.1	d	2	1	x	3	1	0	0	x	x	x	2
223	2	w	16465	Bonn	98	37	lk	x	Meta	x	x	x	1	x	x	4	1	3	x	x	x	x
238	2	m	12253	Bonn	98	58	ma	l	isCA	1	d	is	0	0	is1	9	0	0	x	x	x	0
244	1	w	6721	Lüdenscheid	99	34	ma	l	CA	2.2	d	1	0	x	3	2	1	0	0	0	x	1
245	3	w	12702	Neuwied	96	40	ma	l	CA	3	d	2	0	0	3	4	1	0	0	0	x	1
250	1	w	21447	Bonn	01	46	ma	r	isCA	x	d	is	0	0	is3	12	0	1	x	x	x	0
256	2	w	3697	Köln	99	49	ma	l	CA	2.2	d	2	x	x	2	0	1	0	1	0	0	0
258	1	w	20593	Bonn	95	44	ma	r	CA	2.8	l	4	1	1	2	12	0	2	1	1	0	0
271	2	w	16137	Bonn	97	44	ma	l	CA	1	d	1	0	x	3	2	0	0	1	0	x	0
274	2	w	14811	Bonn	99	54	ov	r	Meta	x	l	2	1	1	3	12	0	0	1	0	x	0
275	2	w	78973	Dresden	97	45	ma	r	CA	x	d	1	0	0	2	2	0	0	0	0	x	x

289	1	w	9660	Mainz	98	49	ma	x	CA	0.6	d	1	x	x	2	3	1	1	1	1	x	0
290	1	w	21824	Siegburg	97	34	ma	r	CA	1.7	d	1	0	0	2	2	1	2	0	1	0	x
291	2	w	9865	Viersen	94	30	ma	r	isCA	3	d	is	0	0	is3	12	0	0	x	x	x	0
302	2	w	16045	Wuppertal	97	47	ma	l	CA	x	d	1	1	0	2	4	1	0	1	1	x	x
307	1	w	7756	Bonn	96	39	ma	r	CA	x	d	1	x	x	3	2	0	2	1	1	0	0
309	2	w	4996	Hamburg	96	37	ma	l	CA	2.5	d	2	1	x	3	3	0	1	1	1	x	2
317	1	w	4062	Neunkirchen	04	77	ma	l	Rez	x	d	1	x	x	2	4	1	0	0	0	0	2
317	5	w	10547	Neunkirchen	86	45	ma	r	CA	5	d	2	0	1	2	4	0	1	0	0	x	2
317	1	w	5400	Neunkirchen	92	65	ma	l	CA	x	d	1	0	0	2	6	0	1	1	1	x	2
317	2	w	7000	Neunkirchen	98	44	ma	l	CA	2	d	2	1	x	2	0	1	1	1	1	x	x
319	1	w	22371	Bonn	01	44	th	l	Rez	1	d	x	x	x	3	9	0	1	0	0	0	x
329	2	w	448	Mainz	86	36	va	x	Meta	3.2	x	1	0	1	3	9	0	0	0	0	x	x
332	1	w	6212	Bonn	97	39	ma	l	CA	x	d	1	0	x	3	0	0	2	1	1	x	1
334	3	w	4283	Siegburg	99	58	ma	r	CA	1.5	d	2	1	0	2	8	1	0	1	1	x	x
351	1	w	21982	Köln	99	33	ma	r	CA	3.5	l	2	0	x	3	0	1	0	0	0	0	1
357	1	w	29000	Düsseldorf	96	45	ma	l	CA	3.2	l	2	1	0	2	12	0	2	1	1	x	0
361	1	w	3379	Remagen	99	43	ma	r	CA	1.3	d	2	x	x	2	4	0	1	0	1	x	x
368	1	w	3222	Bonn	00	42	ma	l	Rez	2	d	2	x	0	3	0	1	4	0	0	0	x
369	2	w	5044	Bergisch-Gladbach	99	49	ma	r	CA	2.5	d	2	1	0	3	3	1	2	1	1	x	2
373	1	w	2892	Bonn	03	45	ma	r	isCA	0.5	l	is	0	0	x	9	1	1	x	x	x	0
387	1	w	17784	Bonn	00	38	ma	l	isCA	1.2	d	is	0	0	is1	6	0	0	x	x	x	x
403	1	w	321	Grevenbroich	00	33	ma	r	CA	1.8	d	1	0	x	3	6	0	1	1	0	0	x
412	1	w	13637	Siegburg	00	36	ma	r	CA	2	d	2	0	0	3	6	1	0	1	1	x	x
416	2	w	6858	Viersen	98	39	ma	r	CA	1.5	me	2	1	0	3	0	1	0	0	1	x	x
423	1	w	18285	Bonn	94	27	ma	r	CA	x	d	1	0	x	3	2	0	0	1	1	x	x
431	1	w	9063	Wiesbaden	98	56	ma	l	isCA	x	d	is	0	0	is2	12	0	0	x	x	x	0
435	2	w	7104	München	91	70	ma	r	CA	1	d	1	0	1	2	12	0	0	x	x	x	0
435	2	w	7104	München	91	70	ma	r	isCA	x	d	is	0	0	x	12	0	0	x	x	x	0
439	1	w	22573	Bonn	97	32	ma	r	CA	1.3	d	1	0	x	2	9	0	2	1	1	x	0
441	2	w	14819	Bonn	93	60	ma	r	CA	x	d	2	1	x	2	0	1	1	0	1	1	x
448	3	w	11946	Siegburg	98	62	ma	l	CA	1.5	d	1	x	x	3	9	1	6	0	0	x	x
448	1	w	15166	Hamm	99	49	ma	l	CA	6	d	4	1	x	3	12	0	0	1	1	1	x
465	3	w	3540	Frankfurt	00	59	ma	r	CA	2.2	d	2	0	x	2	2	0	2	1	1	0	x
465	2	w	18575	Frankfurt	00	33	ma	r	isCA	x	d	is	0	0	is2	9	0	0	x	x	x	x
468	2	w	2709	Halle/Saale	98	58	ma	r	CA	1.2	d	1	0	x	1	12	0	0	1	1	x	0
469	1	w	22059	Köln	00	43	ma	l	CA	2.5	d	2	1	x	3	4	1	0	1	1	0	0
469	1	w	22059	Köln	00	43	ma	l	CA	1.2	d	2	1	x	3	4	1	0	1	1	0	0
469	2	w	2024	Köln	01	44	ma	l	isCA	x	l	is	0	0	x	12	0	1	x	x	x	0
477	4	w	9644	Bonn	00	50	ma	l	CA	1.6	d	1	0	x	2	6	0	0	1	1	0	0
479	1	w	158	Neuwied	98	45	ma	r	CA	1.8	d	1	0	x	3	0	0	0	1	1	x	1
482	3	w	11264	Köln	00	57	ma	l	CA	1.1	l	1	1	x	2	12	0	0	1	1	1	0
484	3	w	6202	Mönchengladbach	97	67	ma	l	CA	3.8	d	2	1	x	3	12	0	0	1	1	x	x
485	2	w	4973	Bonn	01	78	ma	r	CA	x	mu	x	x	x	2	3	0	1	0	0	1	0
487	3	w	56858	Trier	99	76	ma	l	CA	3.2	d	2	0	x	2	2	0	3	1	1	x	0
520	2	w	2667	Siegburg	00	35	ma	r	CA	1	d	1	0	0	2	6	0	0	1	1	0	x
522	3	w	11369	Bochum	94	58	ma	l	CA	3	l	4	x	x	2	4	1	1	1	1	x	x
523	1	w	10143	Bonn	01	52	ma	r	CA	0.1	l	1	0	x	2	6	0	1	1	1	0	x
526	2	w	2619	Siegburg	99	51	ma	r	CA	1.8	d	2	1	x	3	6	0	0	1	1	x	0
527	1	w	19411	Siegburg	00	37	ma	r	CA	1.2	d	1	0	x	2	2	1	0	0	0	0	0
529	3	w	2987	Siegburg	01	53	ma	l	CA	1.5	d	1	0	0	2	0	1	2	1	1	x	0
532	1	w	12197	Köln	97	47	ma	l	CA	2.2	d	2	0	x	3	3	1	2	0	0	x	0
533	1	w	1840	Bergisch-Gladbach	99	30	ma	r	CA	2	d	3	1	x	3	6	0	0	0	0	1	x
539	1	w	23444	Siegburg	01	28	ma	l	CA	0.5	d	1	0	x	2	6	0	1	1	1	0	x
540	1	w	24275	Köln	00	48	ma	l	CA	0.8	d	1	0	x	1	12	0	4	1	1	0	0
541	2	w	9694	Bonn	01	66	ma	l	CA	0.7	d	1	0	x	1	6	0	0	1	1	0	0
542	2	w	19973	Siegburg	00	48	ma	l	CA	0.8	d	1	0	x	1	12	0	0	1	1	x	x
546	2	w	8340	Göttingen	99	59	ma	l	CA	3.5	d	2	0	0	3	6	0	0	1	1	1	x
549	1	w	20056	Bonn	94	50	ma	l	CA	x	d	1	1	x	2	9	0	4	1	1	x	x
552	1	w	9695	Bonn	01	43	ma	r	CA	0.6	d	1	0	x	3	0	0	1	0	0	1	x
552	1	w	9695	Bonn	01	43	ma	r	isCA	1.5	d	is	0	0	is3	12	0	0	x	x	x	x
553	2	w	2033	Bonn	96	51	ma	r	CA	2.6	d	2	0	0	3	6	1	6	0	0	x	x
556	1	w	143	Bonn	01	76	ma	l	CA	0.8	l	2	0	x	2	12	0	4	1	0	0	x
558	1	w	4701	Bonn	96	45	ma	r	CA	1.3	l	1	1	x	3	8	0	3	1	0	x	0
562	1	w	25417	Bonn	00	55	ma	r	CA	2.5	d	2	0	x	3	0	1	2	1	1	0	x
564	1	w	32219	Düren	99	62	ma	l	CA	3.5	d	2	0	0	2	12	0	2	1	1	x	x
565	1	w	7241	Bergisch-Gladbach	00	47	ma	r	CA	4	mu	2	0	x	2	12	0	6	0	0	x	0
575	1	w	8027	Köln	99	51	ma	l	CA	5.2	d	3	1	x	2	6	0	2	1	1	0	0
578	3	w	8164	Aachen	01	45	ma	l	CA	2.2	d	2	0	x	3	9	1	3	1	1	1	x
581	1	w	17271	Bonn	01	61	ma	l	CA	1.8	d	1	1	x	2	0	0	0	1	1	0	0
583	1	w	707	Bergisch-Gladbach	96	50	ha	x	Meta	0.3	d	1	1	1	3	12	1	4	x	x	x	x
600	1	w	31937	Wuppertal	00	58	ma	l	CA	1.6	l	1	1	x	2	6	0	0	1	1	x	0
605	1	w	12008	Hannover	80	36	ma	l	CA	2.5	l	2	0	0	3	6	1	3	x	x	x	0



611	1	w	4575	Kassel	02	49	ma	l	isCA	x	d	is	0	0	is3	6	1	4	1	1	0	2
612	1	w	34139	Siegburg	01	41	ma	r	CA	0.7	d	1	0	x	1	8	0	3	1	1	x	0
621	2	w	7878	Bonn	01	69	ma	l	isCA	2.5	d	is	0	0	is3	12	0	4	0	0	1	x
624	1	w	21671	Bonn	02	41	ma	l	CA	x	d	2	0	0	2	12	1	3	1	1	0	x
626	2	w	19177	Bonn	01	54	ma	r	CA	1.2	d	1	0	0	2	6	0	1	1	1	1	x
632	2	w	6462	Lüdenscheid	01	26	ma	r	CA	2.4	me	2	0	x	2	12	0	1	1	1	x	0
639	1	w	9542	Siegburg	02	55	ma	r	CA	1.2	d	1	0	x	3	12	0	8	0	1	1	0
640	2	w	14673	Viersen	96	56	ma	l	CA	2.3	d	2	1	x	2	6	1	3	0	0	0	x
641	1	w	9325	Köln	01	40	ma	r	CA	1.2	me	4	1	x	2	1	0	0	0	0	0	x
644	1	w	23431	Bonn	94	57	ma	r	CA	0.7	d	1	0	x	3	4	0	2	0	1	x	x
645	3	w	12027	Köln	01	64	ma	r	CA	1	d	1	0	x	3	9	1	3	1	1	1	0
646	3	w	11963	Berlin	97	60	ma	r	CA	2	d	4	x	x	2	3	1	3	0	0	1	x
647	4	w	928	Bonn	00	75	ma	l	CA	x	d	1	0	x	3	4	0	2	1	1	0	x
648	3	w	525	Bonn-Duisdorf	00	84	ma	l	CA	1	d	1	0	x	2	2	0	0	1	1	x	0
652	1	w	15193	Duisburg	02	38	ma	r	CA	0.5	d	1	0	1	3	12	0	1	0	1	1	0
656	2	w	42088	Hagen	00	78	ma	l	CA	8	d	4	1	x	2	3	1	0	1	0	1	0
657	1	w	9487	Bonn	02	46	ma	l	CA	0.6	d	1	1	x	2	6	0	8	1	1	0	x
657	2	w	11759	Bonn	99	46	ma	l	CA	x	d	1	1	0	2	4	1	1	1	1	x	x
657	1	w	9449	Bonn	02	46	ma	l	isCA	0.5	d	is	0	0	is2	8	0	8	x	x	x	x
659	2	w	15789	Bonn	00	60	ma	r	CA	2.1	l	2	x	0	3	12	0	1	1	1	0	x
660	2	w	36029	Würselen	93	27	ma	l	CA	2	l	1	1	x	2	1	1	4	0	0	x	0
669	3	w	1234	Leverkusen	02	53	ma	l	CA	8	l	3	x	x	3	8	0	0	0	0	0	x
672	1	w	9928	Leverkusen	97	44	ma	l	CA	1.2	d	1	0	x	3	12	0	4	1	1	x	0
673	3	w	1778	Heidelberg	01	52	ma	r	CA	3.7	d	4	1	x	2	2	1	0	0	1	0	0
676	2	w	37732	Hagen	01	47	ma	r	CA	5	d	1	1	x	3	3	1	0	1	1	x	0
679	1	w	8238	Köln	02	31	ma	l	CA	0.7	d	1	1	x	2	8	0	2	1	1	0	0
684	2	w	9534	Erfurt	01	35	ma	l	CA	2.4	d	2	1	x	3	3	1	1	1	1	0	2
688	4	w	7980	Bonn	02	70	ma	l	CA	1.9	d	1	x	x	3	12	0	0	1	1	0	0
688	4	w	7980	Bonn	02	70	ma	l	CA	1.8	d	1	x	x	3	12	0	0	1	1	0	0
693	2	w	16314	Bonn	01	69	ma	l	CA	5	l	3	1	x	2	12	0	0	1	1	0	x
694	1	w	18184	Köln	98	43	ma	l	CA	1.5	d	2	1	x	2	0	1	0	1	1	x	2
697	3	w	4568	Bonn	00	64	ma	l	CA	2.3	d	2	0	0	3	9	1	6	0	0	0	x
699	2	w	14052	Bonn	94	64	ma	l	CA	1.5	d	1	1	x	2	8	1	0	1	0	x	x
700	1	w	1998	Lüdenscheid	01	34	ma	l	CA	2	d	1	0	x	3	3	1	3	0	0	0	1
701	1	w	17147	Siegburg	02	31	ma	r	CA	3	d	2	1	x	2	12	0	0	1	0	0	x
710	1	w	2369	Köln	01	61	lk	x	Meta	3.5	x	x	1	x	2	4	0	0	0	0	0	0
710	2	w	6027	Siegburg	98	55	ma	l	CA	2	d	2	0	0	3	6	0	0	0	0	1	x
713	3	w	15425	Mutlangen	00	36	ma	r	CA	1.6	d	1	0	x	2	2	0	1	1	1	x	x
713	1	w	25500	Gummersbach	96	36	ma	l	CA	1.7	d	2	0	x	3	2	0	2	1	1	x	0
715	1	w	18349	Mönchengladbach	00	44	ma	r	CA	3.2	me	2	1	0	3	4	0	0	0	1	x	x
716	1	w	7349	Zürich, CH	02	63	ma	r	CA	1.5	l	1	1	0	2	1	0	1	0	0	0	x
716	2	w	7035	Chur, CH	94	49	ma	r	CA	1	d	1	0	0	1	6	0	2	0	0	x	x
718	1	w	24863	Bonn	02	25	ma	r	CA	3.5	d	2	0	x	3	3	0	2	1	0	0	1
718	2	w	9271	Bonn	77	34	lk	x	Meta	x	d	1	1	x	3	3	1	6	x	x	x	1
718	1	w	24863	Bonn	02	25	ma	r	isCA	x	d	is	0	0	x	3	0	2	x	x	x	1
728	2	w	848	Leverkusen	02	60	ma	r	CA	1.3	d	1	0	x	3	8	0	1	1	0	1	x
729	2	w	10125	Bonn	89	53	ma	l	CA	2.3	me	2	0	x	3	9	1	4	1	x	x	0
731	2	w	10364	Bonn	02	46	ma	l	CA	1.8	d	1	0	x	3	12	0	4	1	1	1	2
731	2	w	10364	Bonn	02	46	ma	l	isCA	x	d	is	0	0	x	12	0	4	x	x	x	2
732	1	w	6800	Köln	01	38	ma	r	CA	1.7	d	1	0	x	3	0	0	0	0	0	0	1
734	2	w	50612	Würselen	00	39	ma	l	CA	0.4	d	1	x	x	3	9	1	0	0	0	1	x
736	4	w	19712	Bonn	85	33	ma	r	CA	2.2	d	2	x	x	3	4	0	3	x	x	x	x
737	1	w	13996	Siegburg	02	52	ma	l	CA	1	d	1	1	0	2	1	0	0	1	1	x	x
738	12	w	3994	Bonn	04	71	ma	l	CA	1.5	d	1	1	x	3	12	0	1	1	1	0	0
738	3	w	8021	Siegburg	00	78	ma	l	CA	2	d	1	0	x	2	1	0	0	1	1	x	0
744	2	w	9749	Neuwied	00	47	ma	r	CA	2	l	1	0	x	3	12	0	0	1	0	0	x
746	2	w	16430	Saarbrücken	99	75	ma	r	CA	x	d	4	1	x	3	4	0	0	1	1	0	x
756	2	m	16448	Bonn	97	72	ma	r	CA	x	d	4	0	x	3	0	1	2	1	1	x	0
757	1	w	12627	Siegburg	01	53	ma	r	CA	0.8	d	1	0	x	1	12	0	0	1	1	x	0
757	1	w	12627	Siegburg	01	53	ma	l	CA	2	d	2	0	x	2	12	0	0	1	1	x	0
758	2	w	13440	Fulda	94	47	ma	r	CA	1.3	d	1	x	x	2	0	1	0	1	1	x	x
760	2	w	2758	Bonn	99	72	ma	l	CA	3.9	d	2	1	x	3	12	0	2	1	1	x	0
761	3	w	15159	Bonn	02	48	ma	l	CA	2.5	d	2	0	x	2	12	0	0	1	1	0	0
761	3	w	15159	Bonn	02	48	ma	l	CA	0.3	d	1	0	x	2	12	0	0	1	1	0	0
761	3	w	15159	Bonn	02	48	ma	l	isCA	x	d	is	0	0	x	9	0	0	x	x	x	0
762	2	w	5835	Bonn	02	71	ma	r	CA	1.6	d	1	0	x	2	12	0	8	1	1	0	x
768	2	w	9758	Bonn	82	29	ma	r	isCA	1	d	is	0	0	is3	12	0	0	x	x	x	0
769	2	w	20654	Karlsruhe	00	59	th	x	Rez	x	d	1	x	x	2	4	0	0	1	0	1	0
770	2	w	15683	Aachen	02	44	ma	l	CA	0.8	d	1	0	x	1	6	0	0	1	1	0	x
771	1	w	16632	Aachen	02	34	ma	r	isCA	0.7	d	is	0	0	is1	6	1	0	1	1	0	x
774	2	w	26426	Siegburg	02	34	ma	l	CA	3	d	2	0	x	2	6	1	1	0	0	0	x
776	1	w	31773	Aachen	01	31	ma	l	CA	x	mu	2	x	x	1	9	1	0	1	1	0	0

778	1	w	11930	Mainz	98	34	ma	r	CA	2	d	1	1	x	3	1	1	0	1	1	x	x	
783	2	w	20400	Bonn	02	63	ma	r	CA	1.9	l	1	1	0	x	2	9	0	2	1	1	0	0
786	1	w	11211	Koblenz	01	41	th	l	Rez	1.2	l	1	x	x	2	0	1	0	1	1	0	0	
787	1	w	23016	Bonn	02	60	ma	l	CA	0.7	d	1	0	x	3	12	0	4	1	1	0	x	
803	3	w	18086	Stuttgart	95	44	ma	r	CA	6	d	3	1	1	3	8	1	0	0	0	x	x	
807	3	w	10851	Bonn	03	60	ma	l	CA	3.5	l	2	1	0	3	9	0	0	1	1	0	0	
807	3	w	10851	Bonn	03	60	ma	l	CA	1.2	l	1	1	0	3	9	0	0	1	1	0	0	
807	3	w	10851	Bonn	03	60	ma	l	CA	0.4	l	1	1	0	3	9	0	0	1	1	0	0	
808	2	w	4000	Essen-Steele	00	61	ma	r	CA	1.2	d	1	1	x	2	12	0	0	1	0	x	x	
808	1	w	10387	Mönchengladbach	03	42	ma	r	CA	2.4	d	2	0	x	3	9	1	0	1	1	1	x	
808	1	w	10387	Mönchengladbach	03	42	ma	r	CA	0.4	l	1	0	x	2	9	1	0	1	1	1	x	
809	1	w	4999	Bonn	03	38	ma	r	CA	2.1	d	2	0	0	2	6	0	0	1	1	0	x	
814	3	w	12122	Bergisch-Gladbach	01	57	ma	r	Rez	0.3	d	1	0	1	2	12	0	0	0	1	x		
818	1	w	23943	Trier	00	45	ma	l	CA	2	d	2	1	x	2	3	1	0	1	1	1	0	
819	2	w	16909	Bergisch-Gladbach	02	53	ma	l	CA	1.5	d	2	1	0	3	0	1	8	1	1	x	0	
823	5	w	36847	Siegburg	02	42	ma	l	CA	1.4	d	1	0	x	2	0	1	0	0	0	x	x	
823	4	w	26584	Siegburg	96	62	ma	r	CA	0.9	d	1	0	x	1	4	1	4	1	1	0	x	
824	1	m	11626	Koblenz	02	58	ma	r	CA	1.8	d	4	1	x	2	0	1	0	1	0	0	0	
826	1	w	1411	Bergisch-Gladbach	01	55	ma	l	CA	1.3	l	1	0	x	2	12	1	8	1	1	1	x	
833	1	w	14978	Bonn	93	44	ma	r	CA	1.8	l	1	1	0	2	12	0	0	1	1	x	0	
833	1	w	14978	Bonn	93	44	ma	r	isCA	x	l	is	0	0	x	12	0	0	x	x	x	0	
835	2	w	11882	Hamel	99	52	ma	l	CA	x	l	1	0	1	2	12	1	1	0	0	0	x	
843	3	w	9422	Fulda	97	54	ma	r	CA	9	l	3	1	x	3	0	0	0	1	1	x	x	
843	4	w	10732	Fulda	98	87	ma	l	CA	6	d	3	x	x	2	3	0	0	1	1	x	x	
854	1	w	28609	Bochum	03	24	ma	l	CA	2.2	d	2	1	x	3	2	0	0	1	1	1	0	
858	1	w	12563	Bonn	01	42	ma	l	isCA	1.5	d	is	0	0	is1	8	0	0	x	x	x	0	
862	1	w	1919	Dresden	03	49	ma	r	Rez	0.9	d	1	0	x	3	3	0	0	1	1	x	0	
863	1	w	22158	Bonn	02	49	ma	l	CA	1.4	mu	1	0	0	2	9	0	2	1	1	0	0	
869	1	w	20309	Siegburg	99	46	ma	l	CA	1.5	d	1	0	x	2	4	0	0	1	1	x	x	
870	2	w	27711	Siegburg	00	79	ma	l	CA	2.2	d	2	1	x	2	6	0	2	0	0	x	x	
873	1	w	8117	Bonn	03	41	ma	r	CA	2.2	l	2	1	0	3	12	0	3	1	1	1	0	
875	3	w	22253	Wiesbaden	01	74	ma	l	isCA	0.5	d	is	0	0	x	9	1	0	1	1	0	x	
879	2	w	29247	Siegburg	96	35	ma	l	CA	2.6	d	2	0	0	3	3	1	3	0	0	x	1	
886	1	w	34358	Siegburg	99	37	ma	l	CA	2.7	d	2	0	x	3	8	0	0	1	1	x	0	
888	1	w	23299	Bonn	00	43	ma	l	isCA	x	d	is	0	0	is3	12	0	2	x	x	x	x	
905	3	w	15049	Aachen	03	44	ma	l	CA	2.3	d	2	0	x	2	12	1	1	1	1	0	x	
906	3	w	12802	Hamel	02	73	ma	l	CA	1.2	d	1	0	x	3	12	0	4	0	0	1	x	
908	2	w	12052	Duisburg	98	35	ma	l	CA	x	d	1	1	x	3	12	0	1	1	1	x	0	
911	2	w	785	Siegburg	97	62	ma	r	CA	2.7	d	1	0	0	3	0	0	3	0	0	x	x	
913	1	w	19751	Oberhausen	03	45	ma	r	CA	2.5	d	2	1	x	2	12	0	2	1	1	0	x	
913	2	w	37529	Bochum	03	45	ma	r	CA	1.5	d	2	1	0	2	8	0	0	1	1	0	x	
922	3	w	9368	Neuwied	01	50	ma	l	CA	2.1	d	2	0	x	3	12	0	6	1	1	x	0	
923	2	w	17544	Remscheid	99	48	ma	r	CA	2	d	1	1	0	2	6	1	1	1	1	x	x	
923	3	w	16544	Remscheid	96	73	ma	r	CA	2.5	d	2	0	x	3	9	0	1	x	x	x	x	
931	1	w	5923	Trier	04	40	ma	l	CA	1.8	d	1	1	0	3	9	1	1	0	1	0	0	
932	1	w	12261	Neuwied	00	34	ma	r	CA	1.8	l	1	0	x	3	2	0	1	1	1	x	x	
942	3	w	8583	Neuwied	00	61	ma	l	CA	2.4	d	2	0	x	2	0	1	0	1	0	x	x	
944	1	w	26689	Siegen	01	29	ma	l	CA	1.4	d	1	1	0	1	12	1	0	1	1	x	x	
951	2	w	638	Grevenbroich	01	51	ma	l	CA	5	me	4	1	0	3	0	1	0	0	0	0	x	
955	5	w	4273	Lüdenscheid	00	61	ma	r	CA	1.7	d	1	0	x	2	12	0	2	1	1	x	x	
961	4	w	7910	Remscheid	01	53	ma	l	CA	1.5	l	1	0	x	2	6	0	1	1	1	x	x	
962	3	w	690	Siegburg	99	65	ma	r	CA	0.6	d	1	0	x	3	6	1	6	1	1	x	x	
979	1	w	10312	Bonn	04	54	ma	l	isCA	2.5	d	is	0	0	is3	12	0	4	0	0	1	x	
979	1	w	10312	Bonn	04	54	ma	l	CA	0.2	d	1	x	x	3	9	0	4	0	0	1	x	
986	2	w	61074	Trier	03	48	ma	l	CA	2.5	d	2	1	0	3	8	0	4	0	1	0	x	
986	2	w	61074	Trier	03	48	ma	r	CA	1.2	d	1	1	0	2	8	0	4	1	1	0	x	
1037	2	w	5363	Bochum	04	66	ma	r	CA	1	l	1	0	x	2	12	0	0	1	1	0	x	
1040	1	w	1917	Wuppertal	04	55	ma	r	isCA	x	l	is	0	0	is1	12	0	4	x	x	x	x	
1057	2	w	5303	Hildesheim	04	44	ma	r	CA	1.1	d	1	0	0	2	0	0	0	1	1	0	x	
1057	3	w	4239	Bonn	00	69	ma	r	CA	2.6	d	2	1	x	3	6	1	1	1	1	1	x	
1103	1	w	28120	Bochum	03	44	ma	l	CA	1.6	d	1	0	x	2	3	0	0	1	1	0	0	
1104	1	w	33823	Viersen	04	36	ma	l	isCA	0.5	d	is	0	0	x	6	1	0	x	x	x	x	

## 7 Legende

### 7.1 Abbildungen:

Abbildung 1 (E1917.04): AP-2 $\alpha$ Färbung in Epithelialzellen eines physiologischen Brustdrüsenläppchens	16
Abbildung 2 (E1917.04): AP-2 $\gamma$ Färbung in Myoepithelialzellen eines physiologischen Brustdrüsenläppchens	17
Abbildung 3 (E15789.00): AP-2 $\gamma$ Färbung in Myoepithelialzellen eines physiologischen Brustdrüsenläppchens	17
Abbildung 4: Geschlecht bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	21
Abbildung 5: Alter bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten	22
Abbildung 6: Alter bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	23
Abbildung 7: Tumorlokalisation bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten	24
Abbildung 8: Tumorlokalisation bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	25
Abbildung 9: Histologischer Typ bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten	26
Abbildung 10: Histologischer Typ bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	27
Abbildung 11: pT-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	28
Abbildung 12: N-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	29
Abbildung 13: M-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	30
Abbildung 14: Malignitätsgrad bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten	31
Abbildung 15: Malignitätsgrad bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	32
Abbildung 16: van Nuys-Score bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten	33
Abbildung 17: van Nuys-Score bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	34
Abbildung 18: Oestrogenrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten	35
Abbildung 19: Oestrogenrezeptoren bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	36
Abbildung 20: Progesteronrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten	37
Abbildung 21: Progesteronrezeptoren bei BRCA1, BRCA2 und BRCA negativen Patienten	38
Abbildung 22: HER2/neu Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten	39
Abbildung 23: HER2/neu Expression bei BRCA1, BRCA2 und BRCA negativen Patienten	40
Abbildung 24: AP-2 $\alpha$ Expression bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten	41
Abbildung 25: AP-2 $\alpha$ -Expression bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	42
Abbildung 26: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten	43
Abbildung 27: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten	44
Abbildung 28 (E9865.94): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 12 bei einem duktalem in situ Karzinom (DCIS)	47
Abbildung 29 (Detail E9865.94): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 12 bei einem duktalem in situ Karzinom (DCIS)	47
Abbildung 30 (E9865.94): AP-2 $\gamma$ Färbung IRS 0 bei einem duktalem in situ Karzinom (DCIS)	48
Abbildung 31 (A34139.01): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 9 bei einem gut differenzierten duktalem Karzinom	49
Abbildung 32 (E18184.98): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 0 bei einem mittelmässig differenzierten duktalem Karzinom	49
Abbildung 33 (E15166.99): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 12 bei einem schlecht differenzierten duktalem Karzinom	50
Abbildung 34 (A34139.01): AP-2 $\gamma$ Färbung IRS 3 bei einem gut differenzierten duktalem Karzinom	51
Abbildung 35 (E15166.99): AP-2 $\gamma$ Färbung IRS 0 bei einem schlecht differenzierten duktalem Karzinom	51
Abbildung 36: AP-2 $\alpha$ bei duktalem, lobulärem, medullärem und muzinösem Karzinomen	55
Abbildung 37 (E18184.98): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 0 bei einem mittelmässig differenzierten duktalem Karzinom	56
Abbildung 38 (E14978.93): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 12 bei einem lobulärem Karzinom	56
Abbildung 39 (Detail E14978.93): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 12 bei einem lobulärem Karzinom	57
Abbildung 40 (E19131.94): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 2 bei einem medullärem Karzinom	57
Abbildung 41 (E4973.01): AP-2 $\alpha$ Färbung IRS 3 bei einem muzinösem Karzinom	58
Abbildung 42: AP-2 $\gamma$ bei duktalem, lobulärem, medullärem und muzinösem Karzinomen	58
Abbildung 43 (E14978.93): AP-2 $\gamma$ Färbung IRS 0 bei einem lobulärem Karzinom	59
Abbildung 44 (Detail E14978.93): AP-2 $\gamma$ Färbung IRS 0 bei einem lobulärem Karzinom	59
Abbildung 45 (E19131.94): zytoplasmatische Reaktion für AP-2 $\alpha$ bei einem medullärem Karzinom	60
Abbildung 46: Malignitätsgrad bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren	61
Abbildung 47: Oestrogenrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren	62
Abbildung 48: Progesteronrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren	63
Abbildung 49: HER2/neu Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren	64
Abbildung 50: BRCA-Status bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren	65
Abbildung 51: Nukleäre AP-2 $\alpha$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren	66
Abbildung 52: Nukleäre AP-2 $\gamma$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren	67

## 7.2 Tabellen:

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für Mammakarzinom.....	11
Tabelle 2: Malignitätsgrad bei invasiven Karzinomen, modifiziert nach Bloom und Richardson.....	11
Tabelle 3: van Nuys (pathomorphologische) Klassifikation.....	11
Tabelle 4: Anzahl Gewebeprobe mit Tumorart.....	12
Tabelle 5: Anzahl Gewebeprobe mit histologischem Typ.....	12
Tabelle 6: Anzahl Patienten mit BRCA-Status.....	12
Tabelle 7: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele W und Stegner HE, 1987).....	15
Tabelle 8: Zusammenhangsmasse (Korrelationskoeffizienten).....	19
Tabelle 9: Alter bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten (Wilcoxon).....	22
Tabelle 10: Alter bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon).....	23
Tabelle 11: Tumorlokalisation bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	24
Tabelle 12: Tumorlokalisation bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	25
Tabelle 13: Tumorgröße bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon).....	28
Tabelle 14: N-Stadium bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	29
Tabelle 15: Malignitätsgrad bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	31
Tabelle 16: Malignitätsgrad bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	32
Tabelle 17: van Nuys-Score bei BRCA-getesteten und BRCA nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	33
Tabelle 18: Oestrogenrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	35
Tabelle 19: Oestrogenrezeptoren bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	36
Tabelle 20: Progesteronrezeptoren bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	37
Tabelle 21: Progesteronrezeptoren bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	38
Tabelle 22: HER2/neu Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	39
Tabelle 23: HER2/neu Expression bei BRCA1-, BRCA2- und BRCA negativen Patienten ( $\chi^2$ -Test).....	40
Tabelle 24: AP-2 $\alpha$ -Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten (Wilcoxon).....	41
Tabelle 25: AP-2 $\alpha$ -Expression bei BRCA1, BRCA2 und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon).....	42
Tabelle 26: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA-getesteten und nicht getesteten Patienten (Wilcoxon).....	43
Tabelle 27: AP-2 $\gamma$ -Expression bei BRCA1, BRCA2 und BRCA negativen Patienten (Wilcoxon).....	44
Tabelle 28: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit BRCA-Status ( $\chi^2$ -Test).....	45
Tabelle 29: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit BRCA-Status ( $\chi^2$ -Test).....	45
Tabelle 30: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit pT-Stadium ( $\chi^2$ -Test).....	46
Tabelle 31: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit pT-Stadium ( $\chi^2$ -Test).....	46
Tabelle 32: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression und Malignitätsgrad ( $\chi^2$ -Test).....	48
Tabelle 33: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit Malignitätsgrad ( $\chi^2$ -Test).....	50
Tabelle 34: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit Oestrogenrezeptoren Expression ( $\chi^2$ -Test).....	52
Tabelle 35: Korrelation AP-2 $\gamma$ -Expression mit Oestrogenrezeptoren ( $\chi^2$ -Test).....	52
Tabelle 36: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit Progesteronrezeptoren Expression ( $\chi^2$ -Test).....	53
Tabelle 37: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit Progesteronrezeptoren Expression ( $\chi^2$ -Test).....	53
Tabelle 38: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit HER2/neu Expression ( $\chi^2$ -Test).....	54
Tabelle 39: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit HER2/neu Expression ( $\chi^2$ -Test).....	54
Tabelle 40: Korrelation von AP-2 $\alpha$ -Expression mit histologischem Karzinomtyp (Wilcoxon).....	55
Tabelle 41: Korrelation von AP-2 $\gamma$ -Expression mit histologischem Karzinomtyp (Wilcoxon).....	60
Tabelle 42: Malignitätsgrad bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test).....	61
Tabelle 43: Oestrogenrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test).....	62
Tabelle 44: Progesteronrezeptoren bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test).....	63
Tabelle 45: HER2/neu Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test).....	64
Tabelle 46: BRCA-Status bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven und negativen Tumoren ( $\chi^2$ -Test).....	65
Tabelle 47: Nukleäre AP-2 $\alpha$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren (Wilcoxon).....	66
Tabelle 48: Nukleäre AP-2 $\gamma$ -Expression bei zytoplasmatisch AP-2 $\alpha$ -positiven/negativen Tumoren (Wilcoxon).....	67
Tabelle 49: Hinweise in der Literatur für eine tumorsuppressive versus onkogene Rolle von AP-2 in Neoplasien.....	82
Tabelle 50: Hinweise in der Literatur für den Einfluss von AP-2 auf die HER2/neu Expression.....	87

## 8 Literaturverzeichnis

- Bauer R, Imhof A, Pscherer A, Kopp H, Moser M, Seegers S, Kerscher M, Tainsky MA, Hofstaedter F, Buettner R. The genomic structure of the human AP-2 transcription factor. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 1413–1420
- Bertwistle D, Ashworth A. The pathology of familial breast cancer: how do the functions of BRCA1 and BRCA2 relate to breast tumour pathology? <http://breast-cancer-research.com/vol1no1/27oct99/review/4>
- Birch J, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binchy A, Crowther D. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994; 54: 1298-1304
- Bosher JM, Totty NF, Hsuan JJ, Williams T, Hurst HC. A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene* 1996; 13: 1701–1707
- Bosher JM, Williams T, Hurst HC. The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 744-747
- Breast Cancer Linkage Consortium. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet* 1997; 349: 1505-1510
- Chai Y, Cui J, Shao N, Reddy P, Rao VN. The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21<sup>WAF1/CIP1</sup> promoter. *Oncogene* 1999; 18: 263–268
- Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD. Clinico–Pathological Characteristics of BRCA1- and BRCA2-Related Breast Cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 2000; 18: 287–295
- Chen WY, Garber JE, Higham S, Schneider KA, Davis KB, Deffenbaugh AM, Frank TS, Gelman RS, Li FP. BRCA1/2 Genetic Testing in the Community Setting. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 4485-4492
- Crook T, Brooks LA, Crossland S, Osin P, Barker KT, Waller J, Philp E, Smith PD, Yulug I, Peto J, Parker G, Allday MJ, Crompton MR, Gusterson BA. p53 mutation with frequent novel condons but not a mutator phenotype in BRCA1- and BRCA2-associated breast tumours. *Oncogene* 1998; 17: 1681-1689
- Daniel DC. Highlight: BRCA1 and BRCA2 Proteins in Breast Cancer. *Microscopy research and Technique* 2002; 59: 68–83
- Denk H. Immunohistochemische Färbemethoden. In: Böck P, ed. *Mikroskopische Technik/Romeis*. München-Wien-Baltimore: Urban u. Schwarzenberg, 1989: 251-262
- Douglas DB, Akiyama Y, Carraway H, Belinsky SA, Esteller M, Gabrielson E, Weitzman S, Williams T, Herman JG, Baylin SB. Hypermethylation of a Small CpGuanine-Rich Region Correlates with Loss of Activator Protein-2 $\alpha$ -Expression during Progression of Breast Cancer. *Cancer Research* 2004; 64: 1611-1620
- Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med.* 2005; 9: 208-221
- Easton D, Breast cancer genes: what are the real risks? *Nature Genet.* 1997; 16: 210–211
- Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Nevanlinna H. Histopathological Features of Breast Tumours in BRCA1, BRCA2 and Mutation -Negative Breast Cancer Families. *Breast Cancer Res.* 2005; 7: R93-R100
- Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillerets B, Peyrat JP, Longy M, Guinebretiere JM, Sauvan R, Noguchi T, Birnbaum D, Sobol H. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. *Cancer Research* 1998; 58: 1588-1592

- Ekblom A, Adami HO, Trichopoulos D, Lambe M, Hsieh CC, Ponten J. Epidemiologic correlates of breast cancer laterality (Sweden). *Cancer Causes Control* 1994; 5: 510-516
- Fan S, Wang J, Yuan R, Ma Y, Meng Q, Erdos MR, Pestell RG, Yuan F, Auburn KJ, Goldberg ID, Rosen EM. BRCA1 inhibition of Oestrogen receptor signaling in transfected cells. *Science* 1999; 284: 1354–1356
- Feng W, Williams T. Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24: 460–475
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S. et al., and the Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62: 676–689
- Foulkes WD, Chappuis PO, Wong N, Brunet JS, Vesprini D, Rozen F, Yuan ZQ, Pollak MN, Kuperstein G, Narod SA, Bégin LR. Primary node negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers has a poor outcome. *Annals of Oncology* 2000; 11: 307-313
- Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, Gumpper KL, Scholl T, Tavtigian SV, Pruss DR, Critchfield GC. Clinical Characteristics of Individuals With Germline Mutations in BRCA1 and BRCA2: Analysis of 10,000 Individuals. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1480-1490
- Friedenson B. BRCA1 and BRCA2 Pathways and the Risk of Cancers Other Than Breast or Ovarian. 2006; <http://www.medscape.com/viewarticle/505347>
- Friedrichs N, Jäger R, Paggen E, Rudlowski C, Merkelbach-Bruse S, Schorle H, Buettner R. Distinct spatial expression patterns of AP-2 $\alpha$  and AP-2 $\gamma$  in non-neoplastic human breast and breast cancer. *Modern Pathology* 2005; 18: 431–438
- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1995; 266: 120-122
- Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M. Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *The EMBO Journal* 1995; 14: 1508-1519
- Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI, Hurst HC. Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J. Pathol.* 1999; 189: 514–520
- Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro ANA, Tavtigian SV, Couch FJ, and the Breast Cancer Information Core (BIC) Steering Committee. Integrated Evaluation of DNA Sequence Variants of Unknown Clinical Significance: Application to BRCA1 and BRCA2. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 75: 535–544
- Gomez-García EB, Ambergen T, Blok MJ, van den Wijngaard A. Patients With an Unclassified Genetic Variant in the BRCA1 or BRCA2 Genes Show Different Clinical Features From Those With a Mutation. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 2185-2190
- Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 2000; 260: 1–12
- Huang S, Jean D, Luca M, Tainsky MA, Bar-Eli M. Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *The EMBO Journal* 1998; 17, 4358–4369
- Jäger R, Friedrichs N, Heim I, Buettner R, Schorle H. Dual role of AP-2 $\gamma$  in ErbB-2-induced mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2005; 90: 273–280
- Kannan P, Buettner R, Chiao PJ, Yim SO, Sarkiss M, Tainsky MA. N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation. *Genes Dev.* 1994; 8: 1258-1269

- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 866-874
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol. Rev.* 1993; 15: 36-47
- King CR, Swain SM, Porter L, Steinberg SM, Lippman ME, Gelmann EP. Heterogeneous expression of erbB-2 messenger RNA in human breast cancer. *Cancer Res.* 1989; 49: 4185-4191
- Korkola JE, DeVries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep ALH, Chen YY, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM, Waldman FM. Differentiation of Lobular versus Ductal Breast Carcinomas by Expression Microarray Analysis. *Cancer Research* 2003; 63: 7167-7175
- Kwiatkowska E, Teresiak M, Filas V, Karczewska A, Breborowicz D, Mackiewicz A. BRCA2 Mutations and Androgen Receptor Expression as Independent Predictors of Outcome of Male Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 4452-4459
- Lakhani SR, van de Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, Easton D, for the Breast Cancer Linkage Consortium. The Pathology of Familial Breast Cancer: Predictive Value of Immunohistochemical Markers Oestrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2 and p53 in Patients With Mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin. Oncol.* 2002; 20: 2310-2318
- Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan CM, Cochran C, Gumbs C, Seal S, Barfoot R, Collins N, Bignell G, Patel S, Hamoudi R, Larsson C, Wiseman RW, Berchuck A, Iglehart JD, Marks JR, Ashworth A, Stratton MR, Futreal PA. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat. Genet.* 1996; 13: 238-240
- Levy-Lahad E, Catane R, Eisenberg S, Kaufman B, Hornreich G, Lishinsky E, Shohat M, Weber BL, Beller U, Lahad A, Halle D. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 1059-1067
- Liaw D, Marsh D, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* 1997; 16: 64-67
- Liu Y, West SC. Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Res.* 2002; 4: 9-13
- Loman N, Bladström A, Johannsson O, Borg Å, Olsson H. Cancer incidence in relatives of a population-based set of cases of early-onset breast cancer with a known BRCA1 and BRCA2 mutation status. *Breast Cancer Res.* 2003; 5: R175-R186
- Loman N, Johannsson O, Bendahl PO, Borg A, Ferno M, Olsson H. Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer* 1998; 83: 310-319
- Marcus JN, Watson P, Page DL, Narod SA, Lenoir GM, Tonin P, Linder-Stephenson L, Salerno G, Conway TA, Lynch HT. Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* 1996; 77: 697-709
- Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, et al. Oral Contraceptives and the Risk of Breast Cancer. *NEJM* 2002; 346: 2025-2032
- Mazina OM, Phillips MA, Williams T, Vines CA, Cherr GN, Rice RH. Redistribution of transcription factor AP-2 $\alpha$  differentiating cultured human epidermal cells. *J. Investig. Dermatol.* 2001; 117: 864-870
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71

Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW.J, Tjian R. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 1991; 5: 105–119

Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362: 419-427

Moser M, Imhof A, Pscherer A, Bauer R, Amselgruber W, Sinowatz F, Hofstädter F, Schüle R, Buettner R. Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 $\beta$ . *Development* 1995; 121: 2779–2788

Moser M, Pscherer A, Roth C, Becker J, Mücher G, Zerres K, Dixkens C, Weis J, Guay-Woodford L, Buettner R, Fässler R. Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2 $\beta$ . *Genes and development* 1997; 11: 1938–1948

Nyormoi O, Wang Z, Doan D, Ruiz M, McConkey D, Bar-Eli M. Transcription Factor AP-2 $\alpha$  Is Preferentially Cleaved by Caspase 6 and Degraded by Proteasome during Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21: 4856–4867

Osin PP, Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: immunohistochemistry and molecular analysis <http://breastcancer-research.com/vol1no1/27oct99/review/3>

Pellikainen J, Kataja V, Ropponen K, Kellokoski J, Pietiläinen T, Böhm J, Eskelinen M, Kosma V-M. Reduced Nuclear Expression of Transcription Factor AP-2 Associates with Aggressive Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2002; 8: 3487–3495

Pellikainen J, Naukkarinen A, Ropponen K, Rummukainen J, Kataja V, Kellokoski J, Eskelinen M, Kosma VM. Expression of HER2 and its association with AP-2 in breast cancer. *European Journal of Cancer* 2004; 40: 1485–1495

Pellikainen MJ, Pekola TT, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma V-M. p21<sup>WAF1</sup> expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation and prognosis. *J. Clin. Pathol.* 2003; 56: 214-220

Phillips KA. Immunophenotypic and Pathologic Differences Between BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast Cancers. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 107s-112s

Phillips KA, Nichol K, Ozcelik H, Knight J, Done SJ, Goodwin PJ, Adrulis IL. Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 469–473

Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical Oestrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8: 138-140

Robson M. Are BRCA1- and BRCA2-associated breast cancers different? Prognosis of BRCA1-associated breast cancer. *J Clin. Oncol.* 2000; 18: 113s-118s

Robson M, Gilewski T, Haas B, Levin D, Borgen P, Rajan P, Hirschaut Y, Pressman P, Rosen PP, Lesser ML, Norton L, Offit K. BRCA-Associated Breast Cancer in Young Women. *J Clin. Oncol.* 1998; 16: 1642-1649

Robson M, Levin D, Federici M, Satagopan J, Bogolminy F, Heerdt A, Borgen P, McCormick B, Hudis C, Norton L, Boyd J, Offit K. Breast Conservation Therapy for Invasive Breast Cancer in Ashkenazi Women With BRCA Gene Founder Mutations. *J Natl. Cancer Inst.* 1999; 91: 2112–2117

Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 1996; 381: 235–238

Scully R. Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Res.* 2000; 2: 324–330



- Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88: 265-275
- Sensi E, Tancredi M, Aretini P, Cipollini G, Naccarato AG, Viacava P, Bevilacqua G, Caligo MA. p53 inactivation is a rare event in familial breast tumors negative for BRCA1 and BRCA2 mutations. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003; 82: 1-9
- Stark A, Hulka BS, Joens S, Novotny D, Thor AD, Wold LE, Schell MJ, Melton III LJ, Liu ET, Conway K. HER-2/neu Amplification in Benign Breast Disease and the Risk of Subsequent Breast Cancer. *J Clin. Oncol.* 2000; 18: 267-274
- Stoppa-Lyonnet D, Ansquer Y, Dreyfus H, Gautier C, Gauthier-Villars M, Boustyn E, Clough KB, Magdelénat H, Pouillart P, Vincent-Salomon A, Fourquet A. Familial Invasive Breast Cancers: Worse Outcome Related to BRCA1 Mutations. *J Clin. Oncol.* 2000; 18: 4053-4059
- Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat. Genet.* 1996; 13: 117-119
- Turner BC, Zhang J, Gumbs AA, Maher MG, Kaplan L, Carter D, Glazer PM, Hurst HC, Haffty BG, Williams T. Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways. *Cancer Res.* 1998; 58: 5466-5472
- van de Vijver MJ. The pathology of familial breast cancer: the pre-BRCA1/BRCA2 era: historical perspectives. <http://breastcancer-research.com/vol1no1/27oct99/review/1>
- Verhoog LC, Brekelmans CTM, Seynaeve C, Dahmen G, van Geel AN, Bartels CCM, Tilanus-Linthorst MMA, Wagner A, Devilee P, Halley DJJ, van den Ouweland AMW, Meijers-Heijboer EJ, Klijn JGM. Survival in Hereditary Breast Cancer Associated With Germline Mutations of BRCA2. *J Clin. Oncol.* 1999; 17: 3396-3402
- Veronesi A, de Giacomi C, Magri MD, Lombardi D, Zanetti M, Scuderi C, Dolcetti R, Viel A, Crivellari D, Bidoli E, Boiocchi M. Familial breast cancer: characteristics and outcome of BRCA 1-2 positive and negative cases, 2005; <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/70>
- Wang D, Shin TH, Kudlow JE. Transcription Factor AP-2 Controls Transcription of the Human Transforming Growth Factor- $\alpha$  Gene. *The Journal of biological Chemistry* 1997; 272: 14244-14250
- Wajapeyee N, Somasundaram K. Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2 $\alpha$  (AP-2 $\alpha$ ) and the role of p53 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in AP-2 $\alpha$  mediated growth inhibition. *J Biol. Chem.* 2003; 278: 52093-52101
- Wang HV, Vaupel K, Buettner R, Bosserhoff AK, Moser M. Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon. *Dev. Dyn.* 2004; 231: 128-135
- Williams T, Tjian R. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 1991a; 5: 670-682
- Williams T, Tjian R. Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* 1991b; 251: 1067-1071
- Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, Karlan B, Chen JJ, Scully R, Livingston D, Zuch RH, Kanter MH, Cohen S, Calzone FJ, Slamon DJ. Localization of human BRCA1 and its loss in high grade non-inherited breast carcinomas. *Nat. Genet.* 1999; 21: 236-240
- Woods SE, Luking R, Atkins B, Engel A. Association of Race and Breast Cancer Stage. *J Natl. Med. Assoc.* 2006; 98: 683-686
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G, Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-792

Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004; 95: 866–871

Zhang J, Brewer S, Huang J, Williams T. Overexpression of AP-2 $\alpha$  suppresses mammary gland growth and morphogenesis. *Developmental Biology* 2003; 256: 127–145

Zhao H, Langerød A, Ji Y, Nowels KW, Nesland JM, Tibshirani R, Bukholm IK, Kåresen R, Botstein D, Børresen-Dale A-L, Jeffrey SS. Different Gene Expression Patterns in Invasive Lobular and Ductal Carcinomas of the Breast. *Molecular Biology of the Cell* 2004; 15: 2523–2536

Zhao F, Satoda M, Licht JD, Hayashizaki Y, Gelb BD. Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding and transactivation properties, *J Biol. Chem.* 2001; 276: 40755–40760

## 9 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Büttner, Pathologisches Institut der Universität Bonn, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine stets freundliche, hilfsbereite und gewissenhafte Betreuung während der gesamten Zeit.

Frau Dr. Flucke, Pathologisches Institut der Universität Bonn, stand mir hilfreich bei der histologischen Auswertung der Schnittpräparate und bei der Entwicklung der Fotos beratend zur Seite. Ich bedanke mich bei ihr für ihre wertvolle, freundliche Betreuung und für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Esch und Frau Steiner, Pathologisches Institut der Universität Bonn, für die sorgfältige und geduldige Anfertigung der histologischen und immunohistochemischen Schnitte und ihre immer offene und hilfsbereite Art.

Frau Prof. Dr. Schmutzler, Stiftungsprofessorin der Deutschen Krebshilfe, Abt. Molekulare Gynäko-Onkologie Universitäts-Frauenklinik zu Köln, verdanke ich die Überlassung der klinischen Daten ihrer Abteilung.

Frau Zaugg half mir freundlicherweise bei der Bedienung des Statistikprogrammes SPSS® und bei der statistischen Auswertung der Daten. Sie nahm sich auch Zeit für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Herzlichen Dank an Frau Eberhard und Frau Roth für das gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskripts.

Herr Dr. Heukamp, Pathologisches Institut der Universität Bonn, beriet mich bei der Bedienung von Excel® für die Eingabe der Rohdaten in den PC.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Sie haben mich während des gesamten Studiums moralisch und finanziell unterstützt. Auf diese Weise ermöglichten sie mir den zügigen Abschluss meines Studiums und meiner Dissertation.

Schliesslich habe ich auch dank Jean diese strenge Zeit mit Freude und Geduld überstanden.