

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

**Immunhistochemische Bestimmung der
eNOS-Expression als möglicher Prognosefaktor
bei primären Mammakarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Cornelia Strank

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2008

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Frau PD Dr. S. Loibl

Korreferent: Frau Prof. Dr. S. Dimmeler

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2008

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	III	
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV	
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII	
1	EINLEITUNG	1
1.1	EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE DES MAMMAKARZINOMS	1
1.2	BEDEUTUNG DER PROGNOSEFAKTOREN FÜR FRÜHERKENNUNG, THERAPIE UND PRÄVENTION DES MAMMAKARZINOMS.....	2
1.3	STICKSTOFFMONOXID (NO) UND NO- BILDENDE ENZYME (NO-SYNTHASEN)	4
1.4	ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN.....	9
2	PATIENTEN UND METHODEN	10
2.1	PATIENTENKOLLEKTIV	10
2.2	METHODEN	12
2.2.1	<i>Histologische Bearbeitung</i>	12
2.2.2	<i>Immunhistochemische Darstellung der eNOS-Expression</i>	12
2.2.3	<i>Reagenzien</i>	17
2.2.4	<i>Auswertung</i>	19
2.2.5	<i>Datenerhebung und Nachbeobachtung</i>	20
2.3	STATISTIK	21
3	ERGEBNISSE	23
3.1	EIGENSCHAFTEN DER PATIENTINNEN.....	23
3.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE AUSWERTUNG DER eNOS-EXPRESSION.....	25
3.3	AUSWERTUNG DER ETABLIERTEN PROGNOSEFAKTOREN	27
3.4	KORRELATION DER eNOS-EXPRESSION MIT DEN PROGNOTISCHEN PARAMETERN	31
3.5	UNI- UND MULTIVARIATE ÜBERLEBENSANALYSE.....	35
4	DISKUSSION	59
4.1	PATIENTINNEN.....	59
4.2	METHODISCHE ASPEKTE	61
4.3	ERGEBNISSE.....	63
4.3.1	<i>Nachweis von NOS in Tumoren</i>	63
4.3.2	<i>Korrelationen zwischen eNOS-Expression und den Prognosefaktoren</i>	66
4.3.3	<i>Überlebensanalyse der Prognosefaktoren – spielt eNOS eine Rolle ?</i>	72
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
6	SUMMARY.....	83
LITERATURVERZEICHNIS.....	84	
ANHANG	99	
SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG.....	102	
LEBENS LAUF.....	103	
DANKSAGUNG	104	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: SCHEMA DER APAAP-METHODE MIT DARSTELLUNG SOWOHL DES PRIMÄR- UND BRÜCKENANTIKÖRPERS ALS AUCH DES APAAP-KOMPLEXES (QUELLE: NOLL UND SCHAUB-KUHNEN 2000, S. 16).	14
ABBILDUNG 2: DARSTELLUNG DER ROTGEFÄRBTEN TUMORZELLEN IM MAMMAKARZINOMGEWEBE.....	26
ABBILDUNG 3: DARSTELLUNG DER ROTGEFÄRBTEN ENDOTHELZELLEN IN DER NABELSCHNUR (POSITIV-KONTROLLE)	26
ABBILDUNG 4: VERTEILUNG DER AUSPRÄGUNGEN DER eNOS-EXPRESSION	27
ABBILDUNG 5: PROZENTUALE VERTEILUNG DER T-STADIEN	28
ABBILDUNG 6: PROZENTUALE VERTEILUNG DES DIFFERENZIERUNGSGRADES	28
ABBILDUNG 7: PROZENTUALE VERTEILUNG DES ALTERS.....	28
ABBILDUNG 8: PROZENTUALE VERTEILUNG DES HORMONREZEPTORSTATUS	29
ABBILDUNG 9: PROZENTUALE VERTEILUNG DES ÖSTROGENREZEPTORSTATUS.....	29
ABBILDUNG 10: PROZENTUALE VERTEILUNG DES PROGESTERONREZEPTORSTATUS	29
ABBILDUNG 11: PROZENTUALE VERTEILUNG DES LYMPHKNOTENSTATUS.....	30
ABBILDUNG 12: PROZENTUALE VERTEILUNG DER BEFALLENEN LYMPHKNOTEN ...	30
ABBILDUNG 13: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN DES GESAMTKOLLEKTIVS (DISEASE FREE SURVIVAL).....	35
ABBILDUNG 14: GESAMTÜBERLEBEN DES GESAMTKOLLEKTIVS (OVERALL SURVIVAL).....	36
ABBILDUNG 15: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM T-STADIUM (DISEASE FREE SURVIVAL)	37
ABBILDUNG 16: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM T-STADIUM (OVERALL SURVIVAL)	38
ABBILDUNG 17: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TUMORDIFFERENZIERUNG (DISEASE FREE SURVIVAL)	39
ABBILDUNG 18: GESAMTÜBERLEBEN IN ABÄNGIGKEIT VON DER TUMORDIFFERENZIERUNG (OVERALL SURVIVAL).....	40
ABBILDUNG 19: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER (DISEASE FREE SURVIVAL).....	41
ABBILDUNG 20: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER (OVERALL SURVIVAL).....	42
ABBILDUNG 21: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM HORMONREZEPTORSTATUS (DISEASE FREE SURVIVAL)	43
ABBILDUNG 22: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM HORMONREZEPTORSTATUS (OVERALL SURVIVAL)	44
ABBILDUNG 23: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ÖSTROGENREZEPTORSTATUS (DISEASE FREE SURVIVAL).....	45

ABBILDUNG 24: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ÖSTROGENREZEPTORSTATUS (OVERALL SURVIVAL)	46
ABBILDUNG 25: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM PROGESTERONREZEPTORSTATUS (DISEASE FREE SURVIVAL)	47
ABBILDUNG 26: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM PROGESTERONREZEPTORSTATUS (OVERALL SURVIVAL)	48
ABBILDUNG 27: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM LYMPHKNOTENSTATUS (DISEASE FREE SURVIVAL)	49
ABBILDUNG 28: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM LYMPHKNOTENSTATUS (OVERALL SURVIVAL)	50
ABBILDUNG 29: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM LYMPHKNOTENSTATUS (OVERALL SURVIVAL)	51
ABBILDUNG 30: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANZAHL DER BEFALLENEN LYMPHKNOTEN (OVERALL SURVIVAL)	52
ABBILDUNG 31: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MENOPAUSENSTATUS (DISEASE FREE SURVIVAL)	53
ABBILDUNG 32: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM MENOPAUSENSTATUS (OVERALL SURVIVAL)	54
ABBILDUNG 33: KRANKHEITSFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER eNOS-EXPRESSION (DISEASE FREE SURVIVAL)	55
ABBILDUNG 34: GESAMTÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER eNOS- EXPRESSION (OVERALL SURVIVAL)	56
ABBILDUNG 35: ÖSTROGEN-INDUZIERTE AKTIVIERUNG VON eNOS (QUELLE: CHAMBLISS UND SHAUL 2002, SEITE 682)	70

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: SKALIERUNG DER ANFÄRBBARKEIT VON TUMOREN.....	19
TABELLE 2: PATIENTINNENKOLLEKTIV.....	24
TABELLE 3: EINTEILUNG REZEPTORSTATUS	24
TABELLE 4: KORRELATION ZWISCHEN eNOS-EXPRESSION UND HORMONREZEPTORSTATUS, BERECHNET MIT CHI-QUADRAT-TEST.....	31
TABELLE 5: KORRELATION ZWISCHEN eNOS-EXPRESSION UND REZEPTORSTATUS, BERECHNET MIT CHI-QUADRAT-TEST	31
TABELLE 6: KORRELATION ZWISCHEN eNOS-EXPRESSION UND MENOPAUSENSTATUS, BERECHNET MIT SPEARMAN-RHO-TEST	32
TABELLE 7: KORRELATION ZWISCHEN eNOS-EXPRESSION UND ALTER DER PATIENTINNEN, BERECHNET MIT CHI-QUADRAT-TEST	33
TABELLE 8: KORRELATION ZWISCHEN eNOS-EXPRESSION UND TUMORGRÖÙE, BERECHNET MIT CHI-QUADRAT-TEST	33
TABELLE 9: KORRELATION ZWISCHEN eNOS-EXPRESSION UND GRADING, BERECHNET MIT CHI-QUADRAT-TEST	34
TABELLE 10: KORRELATION ZWISCHEN eNOS-EXPRESSION UND LYMPHKNOTENSTATUS, BERECHNET MIT EXAKTEM TEST NACH FISHER.....	34
TABELLE 11: UNIVARIATE UND MULTIVARIATE ANALYSE DER ETABLIERTEN PROGNOSEFAKTOREN (COX-REGRESSION) FÜR DAS GESAMTÜBERLEBEN.....	57
TABELLE 12: VERGLEICHBARE STUDIEN UND DEREN FALLZAHL.....	60
TABELLE 13: AUSWAHL VON ARBEITEN ÜBER MALIGNEN TUMORE IN DENEN NOS NACHGEWIESEN WURDE	63
TABELLE 14: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON eNOS IM MAMMAKARZINOMGEWEBE.....	64
TABELLE 15: eNOS-EXPRESSION UND HORMONREZEPTORSTATUS BEIM MAMMAKARZINOM	69
TABELLE 16: KORRELATIONEN VON eNOS-EXPRESSION MIT HORMONUNABHÄNGIGEN PROGNOSEFAKTOREN BEIM MAMMAKARZINOM	72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	Avidin-Biotin-Complex
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor fibroblastischer Wachstumsfaktor
cRT-PCR	competitive reverse transcription-polymerase chain reaction kompetitive reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion
DFS	disease free survival krankheitsfreies Überleben
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ER	estrogen receptor Östrogenrezeptor
HE	Hämalaun-Eosin
HR	hazard ratio Hazard-Verhältnis
IFN-γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
iNOS	inducible nitric oxide synthase induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
L-NAME	N-nitro-L-arginine-methyl ester
LPS	Lipopolysaccharide
nNOS	neuronal nitric oxide synthase neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	nitric oxide Stickstoffmonoxid
NOS	nitric oxide synthase Stickstoffmonoxidsynthase
OAS	overall survival Gesamtüberleben
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PR	progesterone receptor Progesteronrezeptor

sGC	soluble guanylyl cyclase lösliche Guanylylzyklase
SNP	sodium nitro prussid Natrium Nitroprussid
TGF-β	transforming growth factor beta transformierender Wachstumsfaktor beta
VEGF	vascular endothelial growth factor vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

1 EINLEITUNG

1.1 *Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms*

Das Mammakarzinom stellt in den westlichen Industrienationen die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau dar. In Deutschland starben im Jahre 2002 17.780 Frauen an den Folgen von bösartigen Erkrankungen der Brustdrüse. Damit verursachte Brustkrebs rund 18 Prozent aller Krebstodesfälle bei Frauen [Statistisches Bundesamt 2004]. Schätzungen zufolge verstarben im gleichen Zeitraum weltweit 410.712 Frauen an einem Mammakarzinom [GLOBOCAN 2002]. Die geschätzte Zahl der in Deutschland jährlich neu an Brustkrebs erkrankten Frauen lag für 2002 bei 55.689 [GLOBOCAN 2002] und die Anzahl der weltweit geschätzten Neuerkrankungen bei 1.151.298 [GLOBOCAN 2002].

Durch Einteilung der Patientinnen in so genannte *Risikogruppen* wird versucht, mögliche Ursachen der Brustkrebserkrankung nachzuvollziehen. Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms kommen folgende Parameter in Betracht:

- BRCA1 und BRCA2 Mutationsträgerinnen [Schrag et al 1997; Wooster et al 1995; Miki et al 1994],
- familiäre Belastung (Mutter/Schwester) [Madigan et al 1995; Slattery und Kerber 1993],
- Adipositas in der Postmenopause [Kaufmann et al 2004],
- proliferierende Mastopathie (Atypische Hyperplasie) [Dupont und Page 1985; Harris 1992],
- kontralaterales Mammakarzinom [Vaitinen und Hemminki 2000],
- Hormonsubstitution [Colditz et al 1995; Folsom et al 1995],
- Nullipara, späte Erstgebärende (>30 Jahre) [Rockhill et al 1998; Madigan et al 1995],
- frühe Menarche (<12 Jahre) [Rockhill et al 1998; Harris 1992],
- späte Menopause (>52 Jahre) [Madigan et al 1995; Colditz 1993],
- Alter über 50 Jahre [Colditz 1993].

Neben diesen inzwischen als etabliert geltenden Risikofaktoren unterstützen Daten die Hypothese, dass die Entwicklung von Mammakarzinomen auch durch Umwelt, Ernährungsfaktoren und Lebensgewohnheiten beeinflusst werden kann. Die Karzinogenese stellt somit ein multifaktorielles Geschehen dar [Gerber 2003].

1.2 Bedeutung der Prognosefaktoren für Früherkennung, Therapie und Prävention des Mammakarzinoms

Die prä- und postoperative Einschätzung von individuellen Prognosefaktoren bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom gewinnt zunehmend an Bedeutung und therapeutischer Relevanz. Durch vielfältige Therapieprinzipien, wie zum Beispiel die prä- oder postoperative Chemo-, Hormon- oder Radiotherapie, wird versucht, eine Prognoseverbesserung für Patientinnen mit schlechter Prognose zu erreichen [von Minckwitz et al 1999]. Für die Indikationsstellung zu bestimmten Therapieformen, ist die Kenntnis der individuellen Prognose entscheidend.

Prognosefaktoren lassen erkennen, mit welchem Risiko ein Wiederauftreten der Erkrankung (Rezidiv) oder eine verminderte Überlebensrate verbunden sind. Durch moderne Prognosefaktoren sollte es zusätzlich möglich werden, Aussagen über das zu erwartende Ansprechen auf die jeweilige Therapieform machen zu können. Der Befund zum Zeitpunkt der Primärbehandlung kann sowohl über die Aggressivität des Tumors (und damit über die zukünftigen Risiken der Patientin) informieren, als auch die Wirksamkeit bestimmter Therapieformen besser abschätzen lassen [Clark 1995].

Moderne Prognosefaktoren sollten eine *tumorbiologische Hypothese* zur Grundlage haben, denn nicht allein das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose, sondern auch die Biologie des Tumors bestimmen die Chancen und Risiken einer Krebserkrankung [von Minckwitz et al 1994a]. Die Prognose scheint auf einem dynamischen Entwicklungsprozess zu beruhen, welcher von der Anatomie des Karzinoms zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, sowie dessen Wachstums- und Metastasierungspotential abhängt. Zudem sind der Grad der Immunkompetenz des Wirts („Host-defense-Mechanismus“) sowie der Zeitpunkt des Therapiebeginns prozessbeeinflussende Faktoren [Kaufmann et al 1983].

Für eine zuverlässige Risikoabschätzung sind bestmögliche Prognosefaktoren erforderlich. Nur eine gute Diskriminierung dieser Parameter macht eine *gezielte, individualisierte, risikoadaptierte Therapie* möglich.

In der heutigen Zeit sind Prognosefaktoren in mindestens zwei klinischen Situationen wichtig:

- Identifizierung der Patientinnen, deren Prognose nach der Operation so gut ist, dass eine zusätzliche adjuvante systemische Therapie keine weiteren Vorteile bringen würde.
- Identifizierung der Patientinnen, deren Prognose mit der gewöhnlichen Behandlung so schlecht ist, so dass andere, aggressivere Therapieformen notwendig wären.

Studienergebnisse, welche potentielle prognostische und prädiktive Faktoren beurteilen, sollten mit Vorsicht interpretiert werden. *Clark* rät, sich an die nachfolgenden Kriterien für die Evaluierung prognostischer Faktoren zu halten [Clark 1994]. (Nachfolgende Aufzählung ist modifiziert nach *Mc Guire 1991* und *Graeff 1997*):

- Biologische Hypothese.
- Einfacher Nachweis für den Faktor.
- Biostatistische Planung der Durchführung.
- Korrelation mit etablierten Faktoren.
- Optimierte Schwellenwerte zur Untersuchung in Niedrig- und Hochrisikogruppen.
- Univariate und multivariate Analyse (Unabhängigkeit und Gewichtung von Faktoren).
- Validierung der Ergebnisse in einem anderen Patientenkollektiv durch andere Untersucher.
- Klinische Studie, Auswirkung auf die Therapie.
- Überführung in die klinische Praxis.

Zu den derzeit etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms zählen die Größe des Primärtumors, die axilläre Metastasierung (Nodalstatus), die histologische Differenzierung (Grading), das Vorhandensein von Steroidrezeptoren (Hormonrezeptorstatus) und das Alter der Patientin [Goldhirsch et al 2003].

In diesem Zusammenhang haben Stickstoffmonoxid (NO) und die NO-bildenden Enzyme (NO-Synthasen) in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Grund hierfür liegt darin, dass NO sowohl an der Progression von Tumoren beteiligt ist, als auch an deren Wachstumshemmung. Diese Beobachtungen ließen NO als möglichen Prognosefaktor oder als Ansatz neuartiger Krebstherapien in Frage kommen

Bisher sind die meisten Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet mit der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) unternommen worden, die endotheliale und neuronale NO-Synthase haben diesbezüglich deutlich weniger Beachtung erhalten (siehe hierzu Tabelle 15). Diese Tatsache war ein Grund dafür, sich in der vorliegenden Arbeit mit der Bedeutung der konstitutiv exprimierten, endothelialen NO-Synthase (eNOS) zu beschäftigen.

1.3 Stickstoffmonoxid (NO) und NO- bildende Enzyme (NO-Synthasen)

Furchgott beschrieb 1980 als erster einen "Endothelium Derived Relaxing Factor" (EDRF), welcher die Fähigkeit zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur besaß [Furchgott und Zawadzki 1980]. Palmer et al machten 1987 die Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung für die biologische Aktivität des EDRF verantwortlich. Sie stellten fest, dass es sich bei EDRF und NO um dasselbe Molekül handelt [Palmer et al 1987].

Die Entdeckung des EDRF und seine Identifikation als NO war eine der aufregendsten Entdeckungen der 80er Jahre. 1992 betitelte die renommierte Zeitschrift „Science“ NO als das „Molekül des Jahres“. In den darauf folgenden Jahren wurde immer deutlicher, dass NO wichtige Signalwege beeinflusst und die Genexpression von Zielzellen moduliert [Beck et al 1999]. Dieser transzelluläre Botenstoff ist an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt [Moncada et al 1991].

Zu den Funktionen von NO gehört neben der Relaxation von Gefäßmuskulatur, die Hemmung der Plättchenaggregation [Radomski et al 1990], die Leukozytenadhäsion [Kubes et al 1991], die Proliferation von Gefäßmuskelzellen und deren Mitogenese [Garg und Hassid 1989]. Innerhalb des zentralen Nervensystems ist NO ein entscheidender Bestandteil von Signaltransduktionswegen des Gedächtnisses, der sensorischen Verarbeitung und der Regulation des zerebralen Blutflusses [Xu und Liu 1998]. Des Weiteren ist NO für das Vernichten von Mikroorganismen und Tumorzellen mittels aktivierter Makrophagen zuständig [Beck et al. 1999].

Das Wachstum solider Tumore wird von Interaktionen zwischen Endothelzellen der Tumorgefäße, tumorinfiltrierenden Immunzellen (wie z.B. T-Lymphozyten oder Makrophagen) und den Tumorzellen selbst reguliert [Sutherland et al 1988]. Für die meisten dieser zellulären Komponenten konnte eine NO-Expression in vitro nachgewiesen werden [Stuehr und Marletta 1987; Radomski et al 1991; Jenkins et al 1994].

Die genaue Funktion des NO in der Tumorbilogie ist nach wie vor umstritten. Mittlerweile gibt es mehrfache Hinweise dafür, dass NO möglicherweise eine duale Rolle im Zusammenhang mit dem Krebsleiden einnehmen könnte, sozusagen Pro- und Anti-Tumor-Effekte bewirkt [Xu et al 2002].

Einerseits kann NO die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) induzieren [Weidner et al 1992; Ziche et al 1997]. Charakteristika der Angiogenese sind eine starke, anhaltende Vasodilatation und eine gesteigerte Gefäßpermeabilität. Im weiteren Verlauf der Bildung neuer Blutgefäße kommt es zu Endothelproliferation, Auswanderung von Endothelzellen und Freisetzung von Proteasen [Rakusan 1995].

Eine Induktion dieser Gefäßneubildung mittels NO kann über unterschiedliche Mechanismen erfolgen, beispielsweise über

- eine Verstärkung der endothelialen Migration [Ziche et al 1994; Murohara et al 1999],
- eine Beteiligung an der VEGF-induzierten Angiogenese [Morbideilli et al 1996; Ziche et al 1997; Murohara et al 1998; Frank et al 1999],
- eine Steigerung der Integrin $\alpha\beta 3$ -Expression [Murohara et al 1999], oder
- über eine Erhöhung der basic fibroblast growth factor (bFGF)-induzierten Endothelzellproliferation [Ziche et al 1997a].

Andererseits wirkt NO gegenüber Tumorzellen zytostatisch/zytotoxisch und kann zu dessen Lyse führen [Keller et al 1990]. Dieser NO-induzierte, programmierte Zelltod (Apoptose) durch DNA-Schäden ist auf unterschiedlichen Wegen möglich, beispielsweise über

- eine Stimulation des Tumorsuppressorgens p53 [Messmer et al 1994; Messmer und Brune 1996],
- die Aktivierung der Poly (ADP-Ribose) Synthetase (PARS) [Zhang et al 1994; Filep et al 1997],
- eine Deamination von Desoxynukleotiden und Basen innerhalb intakter DNA [Nguyen et al 1992; Wink et al 1991] oder
- über einen Anstieg von cGMP erfolgt die Aktivierung von Proteinkinasen (PKG) [Loweth et al 1997].

Erste Daten deuten daraufhin, dass die lokale Konzentration des NO-Moleküls dafür verantwortlich sein könnte, ob NO einen Pro- oder Anti-Tumor-Effekt ausübt [Jenkins et al 1995].

Für die Biosynthese des NO existieren drei verschiedene Isoformen aus der Familie der NO-Synthasen: eNOS, iNOS und nNOS. Alle drei wandeln L-Arginin in L-Citrullin und NO um [Ignarro 1990]. Diese NO-Synthasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- Kalziumabhängige, konstitutiv exprimierende NO-Synthasen (cNOS), welche Neurotransmission (neuronal NOS [nNOS]) und Vasodilatation (endotheliale NOS [eNOS]) vermitteln [Knowles und Moncada 1994; Nathan 1992]. Für ihre Aktivierung benötigen sie ein kalziumbindendes Molekül, wie zum Beispiel Calmodulin, die NO-Produktion erfolgt als Antwort auf steigende intrazelluläre Kalziumspiegel [Bredt und Snyder 1990]. Dieses konstitutive, kalzium-/calmodulinabhängige Enzym findet sich im Gefäßendothel [Palmer et al 1988; Mulsch et al 1989], im Gehirn [Knowles et al 1989; Bredt und Snyder 1990], in Thrombozyten [Radomski et al 1990] und in den Nebennieren [Palacios et al 1989]. Das auf diese Weise generierte NO agiert als Transduktionsmechanismus für die Stimulation der löslichen Guanylylzyklase (sGC), über welche u. a. die Regulation des Gefäßtonus, die Thrombozytenaktivierung und die Neurotransmission erfolgen [Knowles et al 1989; Bredt und Snyder 1990].
- Kalziumunabhängige, induzierbare NOS (iNOS), dessen Expression nur durch eine längere Induktion mit Zytokinen, wie etwa das Interferon gamma (IFN- γ) und/oder mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) ausgelöst wird [Stuehr und Marletta 1987]. Diese Form der NOS vermag 1000fach größere Mengen an NO zu generieren als die konstitutiven Isoformen (eNOS und nNOS) und ist überwiegend in der tumorinduzierten Immunsuppression und der makrophagenvermittelten Zytotoxizität involviert [Ignarro 1990; Stuehr et al 1991]. Dieses kalziumunabhängige Enzym kommt in aktivierten Makrophagen [Hibbs et al 1987; Marletta et al 1988], Kupferzellen [Billiar et al 1989], Hepatozyten [Curran et al 1989] und neutrophilen Granulozyten [McCall et al 1991] vor.

Beide Gruppen der NO-Synthasen sind löslich, benötigen Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als Kofaktor, bilden Citrullin als Koprodukt und können kompetitiv durch N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) oder ähnliche L-Arginin Analoga gehemmt werden [Leone et al 1991].

Während cNOS in geringem Umfang und über einen Zeitraum von einigen Minuten NO generieren kann, vermag iNOS über eine lange Zeitspanne (Tage) große Mengen an NO zu produzieren. Demzufolge hängt die Dauer und Menge der NO-Produktion von der beteiligten NOS-Isoform ab [Reveneau et al 1999].

Eine spezifische Expression von NO-Synthasen konnte in verschiedenen humanen, malignen Geweben nachgewiesen werden, so zum Beispiel im Kolonkarzinom [Ambs et al 1998], Prostatakarzinom [Klotz et al 1998], Lungenkarzinom [Liu et al 1998], Kopf-Hals-Karzinom [Gallo et al 1998], Melanom [Tschugguel et al 1999a], gynäkologischen Karzinomen [Thomsen et al 1994], Ovarialkarzinom [Raspollini et al 2004] und Brustkrebszelllinien [Zeillinger et al 1996].

Thomsen et al untersuchten 1995 als erste die Bedeutung von eNOS bei Brustkrebs. Sie fanden einen positiven Zusammenhang zwischen der Expression von eNOS und der Tumordifferenzierung, konnten aber das Enzym nur in tumorinfiltrierenden Makrophagen, Endothel- und Myoepithelzellen und nicht in Tumorzellen nachweisen [Thomsen et al 1995].

Im Gegensatz dazu lokalisierten Duenas-Gonzalez 1997 NOS-Aktivität in den Tumorzellen von Mammakarzinomen [Duenas-Gonzalez et al 1997] und einige andere Arbeitsgruppen kamen zum gleichen Ergebnis [Reveneau et al 1999; Mortensen et al 1999; Loibl et al 2002].

Ähnlich wie bei den Aufgaben von NO in der Karzinogenese, existieren auch in der Lokalisation der NO-Synthasen gegensätzliche Resultate. Diese bedürfen einer Evaluierung, wozu die vorliegende Arbeit beitragen sollte.

eNOS – ein östrogenregulierter Faktor ?

Studien konnten zeigen, dass der NO-Spiegel seinen höchsten Wert in der Zyklusmitte des Menstruationszyklus erreicht, zeitgleich mit dem des Östrogen [Rosselli et al 1994; Cicinelli et al 1996]. Zudem führte die Gabe von Östradiol zu einer Steigerung der Endothel-abhängigen Relaxationen [Miller und Vanhoutte 1991], der kalzium-abhängigen NO-Produktion und der eNOS-Protein-Spiegel [Hishikawa et al 1995]. Darüberhinaus fanden andere Arbeitsgruppen, dass sowohl am Endothel wirkende Scherkräfte [Nishida et al 1992], als auch eine Schwangerschaft die eNOS-Aktivität steigerten [Weiner et al 1994]. Auch in Endothelzellen der Pulmonalarterien vermochten physiologische Östrogenkonzentrationen die Expression von eNOS zu erhöhen, woraufhin die Autoren schlußfolgerten, die eNOS-Expression werde durch Östrogen reguliert [Mac Ritchie et al 1997]. Diese Hypothese unterstützten die Ergebnisse von Arbeiten mit dem Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen, welche zeigten, dass diese

imstande sind, die Aktivierung von eNOS rückgängig zu machen [Chen et al 1999].

Da die eNOS-Aktivität demzufolge durch Östrogen beeinflusst wird und Brustkrebs eine hormonabhängige Erkrankung darstellt, könnte die Expression von eNOS von der endokrinen Umgebung des Tumors abhängen.

Besonders in den letzten Jahren hat die Auffassung, NO und die NO-Synthasen könnten einen entscheidenden Beitrag auf dem Gebiet der Karzinogenese leisten, zunehmend an Bedeutung gewonnen. Infolgedessen haben viele verschiedene Gruppen ihre Arbeit auf die NO-Forschung im Allgemeinen und im Zusammenhang mit Krebserkrankungen im Speziellen fokussiert. Obwohl reichliche viel versprechende Ergebnisse berichtet worden sind, bildet dieses Forschungsgebiet nach wie vor eine hochinteressante und spannende Herausforderung. Es gilt, das delikate Netzwerk zahlreicher Interaktionen zu entwirren, um die erwünschten Einsichten zu erhalten, die für die Entwicklung neuer, wirksamer Therapien erforderlich sind.

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen

Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten NOS-Expression in Tumorzellen von in situ und invasiven Mammakarzinomgeweben demonstriert, während benigne Gewebeproben weder iNOS noch cNOS exprimierten [Loibl et al 2002]. Da ein Unterschied in der NOS-Expression zwischen benignen und malignen Tumoren der Brust zu bestehen schien, ergab sich die Zielsetzung, den Einfluss von eNOS auf die Prognose von Mammakarzinomen zu untersuchen. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen die folgenden drei Fragen beantwortet werden:

1. Wo ist eNOS innerhalb des Mammakarzinomgewebes lokalisiert?
2. Bestehen Korrelationen von eNOS mit den etablierten Prognosefaktoren (Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Alter, Grading, Hormonrezeptor- und Menopausenstatus)? Besonderes Interesse gilt der Korrelation mit den endokrinen Faktoren.
3. Hat eNOS einen Einfluss auf das Überleben der Patientinnen?

2 PATIENTEN UND METHODEN

2.1 *Patientenkollektiv*

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben von 163 Patientinnen untersucht, welche nach Diagnose eines primären Mammakarzinoms zwischen 1995 und 1998 in der Frauenklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt operiert worden waren.

Ausgangspunkt für das Kollektiv stellten sämtliche pathologischen Berichte aus dem o. g. Zeitraum mit der Diagnose eines Mammakarzinoms dar. Patientinnen mit einem Tumorrezidiv oder in-situ Karzinom waren nicht Gegenstand der Untersuchung. Weitere Ausschlusskriterien waren die Anwendung einer neoadjuvanten Chemotherapie, antihormonellen- oder Immuntherapie vor dem operativen Eingriff.

Ferner führten präoperativ vorliegende Fernmetastasen, eine zu lückenhafte Krankengeschichte¹ und mangelhaftes Tumorgewebe zum Ausschluss. Unter Berücksichtigung aller genannten Ausschlusskriterien verblieben 163 Datensätze, welche die Grundlage für die vorliegende Untersuchung bildeten.

Die Art des chirurgischen Vorgehens resultierte aus den Empfehlungen der Consensus Conference des National Institute of Health (NIH) in Washington 1990 zur operativen Behandlung eines Mammakarzinoms. Diese befürworteten entweder ein brusterhaltendes oder ein ablatives Operationsverfahren [Kaufmann et al 1990]. In Anlehnung daran erhielten alle betrachteten Frauen entweder eine modifizierte radikale Mastektomie mit axillärer Lymphnodektomie oder eine brusterhaltende Segmentresektion unter Einschluss des Tumors mit Lymphnodektomie und anschließender Bestrahlung. Entsprechend des jeweiligen Menopausen-, Lymphknoten- und Steroidrezeptorstatus schloss sich eine risikoadaptierte systemische Therapie an.

Im Rahmen der klinischen Routinediagnostik wurde postoperativ bei allen Gewebeproben die durchschnittliche Tumorgröße, das TNM-Stadium, die Tumordifferenzierung (Grading) und der Hormonrezeptorstatus bestimmt. Das TNM-Stadium lag gemäß der TNM-Klassifikation 2002 [Singletary et al 2002]

¹ Ausschlusskriterium war das Vorhandensein von weniger als 5 bekannten Merkmalen.

vor, die Tumordifferenzierung erfolgte entsprechend der Elston und Ellis Modifikation [Elston und Ellis 1991] des Bloom und Richardson Grading Systems [Bloom und Richardson 1957]. Die gesamten Angaben hierzu wurden aus den histopathologischen Berichten des Senckenbergischen Instituts für Pathologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt übernommen.

Bei Angabe eines Wertebereichs für den Differenzierungsgrad der Tumore wurde der höhere Wert in die Datensätze übernommen. Der ebenfalls im Zuge der klinischen Routinediagnostik bestimmte Hormonrezeptorstatus galt bei einem Östrogen- und/oder Progesteronrezeptorgehalt von ≥ 10 fmol/mg bzw. eines immunhistochemischen Wertes von > 3 als positiv. Dies erfolgte in Anlehnung an den „Remmele-Score“, welcher besagt, dass ein Wert ≤ 3 von 12 möglichen Punkten als hormonrezeptornegativ gilt [Remmele und Stegner 1987].

Mammakarzinome stellen histologisch eine heterogene Gruppe dar, die sich aus invasiv-duktalem, invasiv-lobulärem sowie Sonderformen zusammensetzt. Zu den selten auftretenden Sonderformen zählen inflammatorische, medulläre, muzinöse, papilläre und tubuläre Karzinomtypen. In dieser Arbeit wurden diese Sonderformen unter „sonstige“ zusammengefasst.

Als Grundlage für die klinische Datenerhebung der Patientinnen dienten die Patientenakten. Bei dem Alter der Frauen wurde zwischen über und unter 50 Jahren unterschieden, Patientinnen die 50 Jahre alt waren zählten zu den über 50-jährigen. Der Lymphknotenbefall wurde gemäß der TNM-Klassifikation von 2002 [Singletary et al 2002] in die Subgruppen 1 bis 3, 4 bis 9 und mehr als 9 befallene Lymphknoten unterteilt.

Wenn der Menopausenstatus aufgrund fehlender Angaben unbekannt und die Patientinnen älter als 55 Jahre waren, wurden sie als postmenopausal eingestuft.

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Bearbeitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die immunhistochemische Bestimmung der eNOS-Expression an 163 Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen vorgenommen. Als Ausgangsmaterial hierfür dienten Paraffinblöcke aus dem Archiv des Senckenbergischen Institutes für Pathologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt. Diese waren für die histologische Routine mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden.

Um die für die Untersuchung am besten geeigneten Präparate und Paraffinblöcke auszusuchen, wurden alle zur Verfügung stehenden HE-Schnitte der ausgewählten Gewebeproben mit dem Mikroskop bei 100- bzw. 250-facher Vergrößerung durchgesehen. Präparate die einen zu kleinen Tumorauschnitt enthielten, nicht fixiert oder unzureichend gefärbt waren wurden ausgeschlossen. So wurde sichergestellt, dass für jeden Patientenfall ein verwertbarer Gewebeschnitt angefertigt werden konnte.

Alle ausgewählten Paraffinblöcke wurden dann an einem Mikrotom in einer Dicke von 3µm geschnitten und auf Objektträger gezogen. Es wurde darauf geachtet, dass genügend Gewebe für weitere oder ergänzende Untersuchungen zur Verfügung stand. Anschließend trockneten die Schnitte über Nacht für mindestens zwölf Stunden bei 37 °C auf einer Wärmeplatte. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgte bei Raumtemperatur.

2.2.2 Immunhistochemische Darstellung der eNOS-Expression

2.2.2.1 Vorbereitungen und Kontrollen

Bevor die 163 Gewebeproben gefärbt wurden, musste diejenige Konzentration des verwendeten Antikörpers (Anti-eNOS) ermittelt werden, welche eine optimale Darstellung der eNOS-Expression erlaubte. Hierfür wurde die Konzentration in aufsteigenden Reihen an der menschlichen Nabelschnur mit ihren charakteristischen Gefäßen getestet. Da dieses Gewebe das gesuchte Antigen (eNOS) aufweist, kam die Nabelschnur als Positiv-Kontrolle in Frage [Zanetti et al 2000]. Aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass es

bei Fibroadenomen der Brust zu keiner Expression von eNOS kommt [Loibl et al 2002]. Demzufolge erfüllte dieses Gewebe die Kriterien für eine Negativ-Kontrolle. Nach Festlegung der optimalen Antikörperverdünnung wurden mehrere positive und negative Präparate angefärbt, um die Spezifität des Antikörpers sicherzustellen. Bei jedem sich anschließenden Färbegang wurden eine Positiv-Kontrolle sowie eine Negativ-Kontrolle (ohne Primär-Antikörper) mitgefärbt.

Der Gebrauch solcher Kontrollen dient der Beseitigung unspezifischer Färbungen und deren Ursachen und bewirkt eine Qualitätsverbesserung der immun-histochemischen Methode. Sie sollen sicherstellen, dass eine positive Anfärbung das Ergebnis einer spezifischen Bindung an das fragliche Antigen darstellt [Bourne 1983; Boenisch 1989].

2.2.2.2 Bestimmung der eNOS-Expression mittels APAAP-Methode

a) Prinzip

Für die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) -Technik nach Cordell [Cordell et al 1984] werden vier Reagenzien benötigt: Primärantikörper, Sekundärantikörper, der APAAP-Komplex (bestehend aus dem Enzym alkalische Phosphatase und einem Antikörper gegen die alkalische Phosphatase) und eine Entwicklungslösung. Der in der Regel in Mäusen hergestellte Primärantikörper ist spezifisch gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet. Der aus einer anderen Tierspezies stammende Sekundärantikörper ist gegen Immunglobuline der Tierspezies des Primärantikörpers sowie des in der gleichen Tierspezies hergestellte Anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper des APAAP-Komplexes gerichtet. Daher kann dieser Sekundärantikörper sowohl an den Primärantikörper als auch an den APAAP-Komplex binden und somit eine Brücke herstellen. Er wird deshalb auch als „Brückenantikörper“ bezeichnet [Bourne 1983].

Die im APAAP-Komplex gebundene alkalische Phosphatase katalysiert eine chemische Reaktion, deren Endprodukt ein roter Farbstoff ist [Schaumburg-Lever 1987; Falini et al 1986]. Empfohlen wird die APAAP-Methode angesichts ihrer hohen Spezifität und Sensitivität [Li et al 1987].

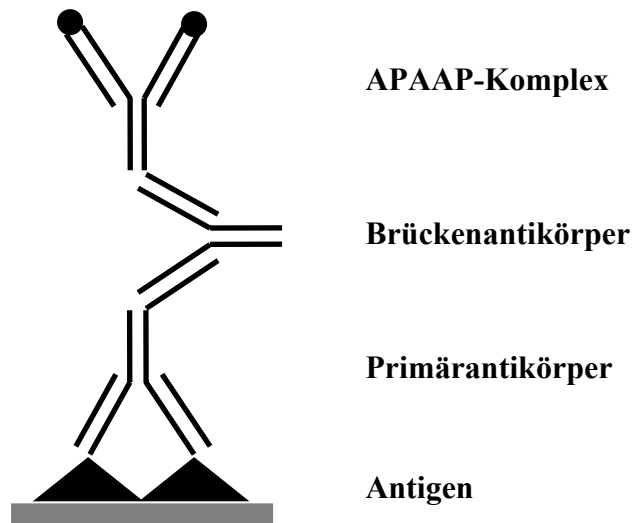


Abbildung 1: Schema der APAAP-Methode mit Darstellung sowohl des Primär- und Brückenantikörpers als auch des APAAP-Komplexes (Quelle: Noll und Schaub-Kuhnen 2000, S. 16).

b) Färbeprotokoll

Die vorbereiteten Schnitte (siehe Abschnitt Histologische Bearbeitung) wurden 30 min lang bei 60°C im Brutschrank inkubiert, dann mittels Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend standen sie für jeweils 5 min in Aqua dest und PBS-Puffer. In einer Citratlösung wurden die Präparate für 7 min bei 700 Watt und nach Auffüllen mit Aqua dest für weitere 3 x 3 min bei ebenfalls 700 Watt in einem Mikrowellenherd erhitzt. Dieser Vorgang dient dem Aufbrechen von Proteinvernetzungen, welche ansonsten zu Maskierungen des gesuchten Antigens im Rahmen der Formalinfixierung führen können. Das nachzuweisende Antigen wird dadurch leichter zugänglich gemacht, es kommt zu deutlich besseren Färbeergebnissen [Shi et al 1991].

Um ein Austrocknen des Tumorgewebes zu verhindern, wurde zwischen den einzelnen Gängen der Mikrowellenbehandlung bei Bedarf Aqua dest nachgefüllt.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte 20 min lang in einem Wasserbad mit Aqua dest (bei Raumtemperatur) abgekühlt. Nach einer Spülung von 2 x 5 min mit PBS-Puffer, wurde das Tumorgewebe auf den Objektträgern mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet, um einem „Wegschwimmen“ des Gewebes zuvorzukommen. Damit die Schnitte nicht austrockneten wurden sie mit PBS-Puffer beträufelt und anschließend in die Vorrichtungen des Färbeautomaten

einsortiert. Einer kurzen Spülung mit Waschpuffer folgte das Auftragen des Primärantikörpers in einer Konzentration von 1: 1500 und einer Lösungsmenge von 200 µl pro Schnitt. Die Inkubation dauerte 60 min. Nach Einwirken des Primärantikörpers sowie aller weiteren Färbeschritte wurden die Präparate jeweils mit Waschpuffer gespült. Danach wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Hierbei handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper des Kaninchens, der gegen das Immunglobulin G der Maus gerichtet ist. Freie Valenzen dieses Antikörpers präsentieren Bindungsstellen für den APAAP-Komplex, welcher als nächstes aufgetragen wurde. Die letzten zwei Schritte hatten Einwirkzeiten von jeweils 30 min, darauf folgte das Spülen mit Waschpuffer. Zur Entwicklung der Färbereaktion wurde eine Fast Red Substrat-Lösung 15 min lang angesetzt. Das Reaktionsprodukt ist eine klare Rotfärbung, welche einfach und schon mit bloßem Auge sichtbar ist. Aufgrund der Eigenschaft der APAAP-Technik, selbst minimale Antigenmengen nachzuweisen, ist sie für diese Arbeit gut geeignet [Cordell et al 1984]. Zur Hemmung der endogenen alkalischen Phosphatase wurde die Lösung mit 2 Tropfen Levamisole versetzt. Zum wiederholten Male wurden die Präparate mit Waschpuffer gespült. Als nächstes wurde die angesetzte Fast Red Substrat-Lösung aufgetragen, welche eine Inkubationsdauer von 20 min benötigte. Ein Spülen mit Waschpuffer schloss sich an. Nach einer 5 Minuten dauernden Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgte eine Spülung der Schnitte, erst unter fließendem Leitungswasser und anschließend mit Aqua dest. Bevor die Gewebeproben unter dem Mikroskop begutachtet werden konnten, mussten sie mit Aquatex eingedeckt werden. Eine spezifische Rotfärbung bedeutete, dass eNOS von dem vorliegenden Tumor exprimiert wird. Solche Tumore wurden als „positiv“ gewertet.

Schema :

- Trocknung der Paraffinschnitte über Nacht für mind. 12 Stunden bei 37°C auf Wärmeplatte
- Inkubation 30 min bei 60°C im Brutschrank
- Entparaffinierung in Xylol (4 x 5 min)
- Rehydratisierung in absteigender Alkoholreihe:
 - Ethanol 100 % 2 x 5 min
 - Ethanol 95 % 2 x 5 min
 - Ethanol 70 % 1 x 5 min
- Spülen in Aqua dest und PBS-Puffer (jeweils 1 x 5 min)
- Mikrowellenbehandlung in Citratpuffer (1 x 7 und 3 x 3 min bei 700 Watt)
- 20 min Abkühlen in Wasserbad
- Spülen in PBS-Puffer (2 x 5 min)
- Umrandung der Tumorgewebe auf den Objektträgern mit PAP-Pen
- Aufträufeln von PBS verhindert Austrocknung der Schnitte
- Einsortieren der Präparate in die Racks des Färbeautomaten
- Auftragen des Primärantikörpers Anti-eNOS in 1: 1500 PBS (60 min)
- Spülen mit Waschpuffer
- Auftragen des Sekundärantikörpers (30 min)
- Spülen mit Waschpuffer
- Auftragen des APAAP-Komplexes (30 min)
- In der Zwischenzeit Fast Red Substrat-Lösung ansetzen (15 min)
- Zugeben von 2 Tropfen Levamisole
- Spülen mit Waschpuffer
- Auftragen der Fast Red Substrat-Lösung (20 min)
- Spülen mit Waschpuffer

- Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (5 min)
- Spülen unter fließendem Leitungswasser (10 min), dann mit Aqua dest (2 min)
- Eindecken der Schnitte mit Aquatex

2.2.3 Reagenzien

PBS (Phosphate Buffered Saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung):

Ohne Kalzium und Magnesium (Fa. Life Technologies Ltd.)

Aqua dest. (destilliertes Wasser):

Aqua ad iniectabilia Braun (Fa. Braun)

Xylol:

Reinstoff (Fa. Mallinckrodt Baker B.V)

Ethanol:

100 % - 95 % - 70 % (Apotheke des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt)

Wärmeplatte:

(Fa. MEDAX Nagel GmbH)

Brutschrank:

(Fa. HERAEUS Instruments)

Mikrowelle:

Küchenmikrowelle Modell Micromat (Fa. AEG)

Citratpuffer:

Antigen Retrieval Citra Plus Solution 10x concentrate, 100 ml mit 400 ml Aqua dest. auffüllen (Fa. BioGenex)

Primär-AK:

monoklonaler Anti-eNOS der Maus, 140 kDa, Konzentration 250µl/ml; mit PBS auf 1: 1500 verdünnen (Fa. Transduction Laboratories)

Sekundär-AK:

Super Sensitive Detection Kit: Multi Link Secondary Antibody
biotinillierter Anti-Maus IgG des Kaninchens
in PBS mit Trägerprotein und 0,09 % sodium
azid, fertige Lösung (Fa. BioGenex)

APAAP-Komplex:

Super Sensitive Detection Kit: Alkaline Phosphatase Label
in PBS mit Trägerprotein und 0,09 % sodium
azid, fertige Lösung (Fa. BioGenex)

Substratlösung:

Fast Red Substrate Pack (Fa. BioGenex)

Blockierendes Reagenz:

Levamisole Solution (Fa. VECTOR Laboratories)

Gegenfärbung:

Hämalaun nach Mayer (Apotheke des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-
Universität Frankfurt)

Eindeckmittel:

Aquatex, wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie (Fa. MERCK)

Deckgläser:

24 x 58 mm (Fa. Mariendorf)

Objektträger:

Super Frost® Plus Objektträger (Fa. Menzel)

PAP-Pen:

Hydrophobic Slide Marker (Fa. DCS Innovative Diagnostik-Systeme)

OptiMax® Plus:

Automated Cell Staining System Model (Fa. BioGenex)

Reagenzfläschchen:

OptiMax® Plus Reagent Vials, Vial holders (Fa. BioGenex)

Waschpuffer:

OptiMax® Wash Buffer 20x concentrate, 500 ml mit Aqua dest. auf 10 l auffüllen, pH-Wert checken, wenn notwendig auf $7,4 \pm 0,2$ einstellen (Fa. BioGenex)

Pipetten: (Fa. Eppendorf)

2.2.4 Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden lichtmikroskopisch mit 10- bis 40-fach vergrößernden Objektiven betrachtet und hinsichtlich der Anfärbung untersucht. Besondere Aufmerksamkeit galt den positiven Tumorzellen, auszuschließen waren Hintergrund- und unspezifische Färbungen. Diese Auswertung erfolgte durch mich und zwei voneinander unabhängige Pathologen. Ihnen waren weder Details zur Patientin, noch zur entsprechenden Gewebeprobe bekannt. Die Anfärbbarkeit der Tumore ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Skalierung der Anfärbbarkeit von Tumoren

Score	Anfärbung
0	keine (negativ)
1	schwach positiv
2	mäßig positiv
3	stark positiv
4	sehr stark positiv

Wenn die Intensität der Färbung nicht eindeutig bestimmt werden konnte (z.B. 2 bis 3), wurde immer der höhere Wert übernommen. In den Fällen, in denen einer der beiden Pathologen das Tumorgewebe als negativ (0) und der andere dieses mit mindestens zwei Abstufungen höher (2 bis 4) beurteilte, wurde die niedrigere Bewertung verwendet. Bei zweifelhaften Ergebnissen wurden diese gemeinsam mit den Pathologen am Diskussionsmikroskop besprochen. Dieses Vorgehen verhinderte eine Verfälschung der Statistik.

Die endgültigen Werte für die statistische Auswertung entstanden durch Bilden des Mittelwerts aus den Bewertungen beider Pathologen zu denselben Schnitten.

Bei den gebildeten Score-Werten der immunhistochemischen Untersuchungen wurden neben der Rangskalierung (0 – 4) zusätzlich dichotomisierte Daten begutachtet. Hierfür wurde der Wert 0 in der Gruppe 0 (= keine Expression, negativ) und die Werte 1, 2, 3 und 4 in der Gruppe 1 (= Expression, positiv) zusammengefasst.

2.2.5 Datenerhebung und Nachbeobachtung

Letzter Zeitpunkt der Datenerhebung war der 31.05.2002. Die Erhebung dieser Daten sowie die Dokumentation des klinischen Verlaufs der Erkrankung, erfolgte über die Sicherung der erhobenen Anamnese, sowie der sich ergebenden aktuellen Daten aus den Nachsorgeuntersuchungen. Diese wurden in den ersten zwei postoperativen Jahren alle drei Monate, bis zu fünf Jahre nach der Operation halbjährlich und nach mehr als fünf Jahren jährlich durchgeführt. Auftretende Lokalrezidive wurden mittels Tastbefund, Sonographie und/oder Mammographie nachgewiesen und im Rahmen einer Probeexzision oder einer Stanzbiopsie gesichert. Fernmetastasen fielen entweder durch einen erneuten Anstieg der Tumormarker oder in der Bildgebung (Sono-, Computer-, Szintigraphie, Röntgen) auf. Arbeitsgrundlage für die Datenerhebung der Patientinnen stellten die Patientenakten dar. Für diejenigen Patientinnen welche ihre Nachsorgeuntersuchung nicht in der Universitäts-Frauenklinik Frankfurt durchführen ließen, wurde ein standardisierter Fragebogen erstellt und ihnen zugesandt. Dieser Fragebogen enthielt u. a. Fragen nach:

- dem momentanen Wohlbefinden der Patientin,
- besonderen Vorkommnissen im Verlauf der Erkrankung,
- Auftreten von Rezidiv oder Metastasen (wenn dies der Fall war deren Lokalisation und Diagnosezeitpunkt),
- dem Datum der letzten Nachsorgeuntersuchung und
- dem aktuell betreuenden Arzt.²

² Der Fragebogen befindet sich im Anhang ab Seite 99

Patientinnen, welche den Fragebogen nicht nach vier Wochen ausgefüllt zurücksendeten, wurden anschließend telefonisch zum Verlauf ihrer Erkrankung befragt. Bei Unklarheiten oder noch ausstehenden Fragen wurden die jeweiligen Haus- oder Frauenärzte angerufen. Schwierigkeiten ergaben sich bei Arztwechsel oder Praxisaufgabe des betreuenden Arztes. Besonders problematisch gestaltete sich die Erhebung der Daten bei Patientinnen die verzogen waren. In diesen Fällen wurde zunächst der momentane Wohnort der Patientin von den bis dahin betreuenden Ärzten erfragt. War dies erfolglos, wurde mit Hilfe verschiedener elektronischer Telefonbücher nach dem derzeitigen Wohnort gefahndet. Zeigte auch dieses Vorgehen keinen Erfolg, wurden die Einwohnermeldeämter angeschrieben.

War keine Aktualisierung der Daten möglich, gingen die bis zur letzten bekannten Nachsorge erhobenen Daten in die Auswertung ein. Die so erhaltenen klinischen Daten wurden mit den immunhistochemischen Ergebnissen korreliert.

2.3 Statistik

Nach Erfassen und Auswerten der Daten wurden die Informationen mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft[®] Excel 2002 (Microsoft Corp., USA) in Tabellenform übertragen. Dies diente als Grundlage für die statistische Auswertung, welche mit dem Programm SPSS für WINDOWS, Version 9.0 (SPSS Inc., USA) erfolgte.

Für die deskriptive Statistik wurden Häufigkeitstabellen erstellt, für quantitative Variablen erfolgte die Berechnung von Mittelwert, Median, Standardabweichung und Spannweite.

Zur statistischen Berechnung mit dem Statistikprogramm SPSS wurden die folgenden Verfahren angewandt:

- Bei der Berechnung von Kreuztabellen wurde die prognostische Signifikanz mit dem *Chi-Quadrat-Test* berechnet.
- Für 2x2-Tabellen (Vierfeldertafeln) erfolgte die Berechnung der prognostischen Signifikanz mit dem *Exakten Test nach Fisher*.
- Für Werte die sich in Ränge einteilen lassen erfolgte die Korrelation nach *Spearman-Rho*.

Als Beobachtungseinheit für das Überleben diente das Gesamtüberleben („overall survival“). Dieses beschreibt die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und entweder Tod der Patientin oder Ende der Datenerhebung. Für die Lokalrezidiv- und Metastasenraten wurde die Zeit bis zum Auftreten des ersten Ereignisses (event) berechnet, das sogenannte krankheitsfreie Überleben („disease free survival“).

- Die univariate Analyse des Gesamt- und krankheitsfreien Überlebens erfolgte mit Berechnungen nach der *Kaplan-Meier-Methode* [Kaplan und Meier 1958]. Hier wurde die Überlebenszeit in Monate angegeben. Zur Beurteilung der Signifikanz der erhaltenen Werte wurden *Log-Rank-Tests* durchgeführt.
- Für die multivariate Analyse wurde die *Cox-Regression* [Cox 1972] angewendet. Hierbei wurden mit der *Rückwärts-Methode* (Wald-Statistik) die Parameter T-Stadium, Grading, Alter, Hormon-, Lymphknotenstatus und eNOS auf Unabhängigkeit getestet.

Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ wurden als hoch signifikant, solche mit $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Lagen die Ergebnisse bei $0,05 < p < 0,1$ wurde ein Trend zur Signifikanz angenommen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Unterstützung des Institutes für medizinische Informatik und Statistik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.

3 ERGEBNISSE

3.1 *Eigenschaften der Patientinnen*

Das Patientinnengut bestand aus 163 Frauen mit primärem Mammakarzinom, welche an der Frauenklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt operiert worden waren. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei 55 Jahren (Range: 31-88 Jahre). Mehr als ein Drittel der Patientinnen (38 %) war prämenopausal und 60,7 Prozent waren postmenopausal. Bei 65,6 Prozent war das operative Vorgehen brusterhaltend gewesen, 31,9 Prozent erhielten eine modifizierte radikale Mastektomie mit axillärer Lymphnodektomie. Hierbei erfolgte im Mittel eine Exstirpation von 15 Lymphknoten (Range: 5-31). Deutlich mehr als 50 Prozent (56,4 %) hatten einen negativen Nodalstatus, solche mit Befall der Lymphknoten (40,5 %) wurden in Subgruppen eingeteilt. Bei 57,6 Prozent waren 1 bis 3 Lymphknoten befallen (pN1), in 22,7 Prozent der Fälle waren es 4 bis 9 (pN2) und bei 19,7 Prozent lag ein Befall von mehr als neun Lymphknoten vor (pN3). Der Hormonrezeptorstatus fiel bei über 80 Prozent (84 %) positiv aus, 14,1 Prozent hatten einen negativen Rezeptorstatus. Für weitere Eigenschaften der Patientinnen siehe Tabelle 2 und Tabelle 3.

Die jeweiligen Differenzen der Prozentangaben zu 100 Prozent kommen durch die fehlenden Angaben zustande. Die beiden nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über das Patientinnenkollektiv und die Verteilung der darin untersuchten Variablen.

Tabelle 2: Patientinnenkollektiv

Variable	No	%	Mittelwert	Median	Range
Alter			54,82	55	31-88
< 50	63	38,7			
≥ 50	100	61,3			
Menopausenstatus					
Prä	62	38,0			
Post	99	60,7			
Fehlend	2	1,2			
OP-typ					
Ablatio	52	31,9			
BET	107	65,6			
Fehlend	4	2,5			
Histologie					
Invasiv ductal	120	73,6			
Invasiv lobulär	25	15,3			
Sonstige	17	10,4			
Fehlend	1	0,6			
Tumorgrösse (cm)			2,44	2	0,2-10
T-Stadium					
T1	81	49,7			
T2	62	38			
T3	10	6,1			
T4	10	6,1			
Grading					
Hoch differenziert (G1)	37	22,7			
Mäßig differenziert (G2)	95	58,3			
Entdifferenziert (G3)	29	17,8			
Fehlend	2	1,2			
Lymphknoten					
Anzahl untersucht	158	96,9	15,54	15	5-31
Negativ	92	56,4			
Positiv	66	40,5	5,52	3	1-20
1-3 (pN1)	38	57,6			
4-9 (pN2)	15	22,7			
> 9 (pN3)	13	19,7			
Nicht untersucht	5	3,1			

Tabelle 3: Einteilung Rezeptorstatus

	No	Hormon-rezeptorstatus		Östrogen-rezeptorstatus		Progesteron-rezeptorstatus	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
ER+/PR++	108	108	-	108	-	108	-
ER+/PR-	20	20	-	20	-	-	20
ER-/PR+	9	9	-	-	9	9	-
ER-/PR-	23	-	23	-	23	-	23
fehlend	3	-	-	-	-	-	-
Summe [abs.]	163	137	23	128	32	117	43
Summe [%]	100	84	14,1	78,5	19,6	71,8	26,4

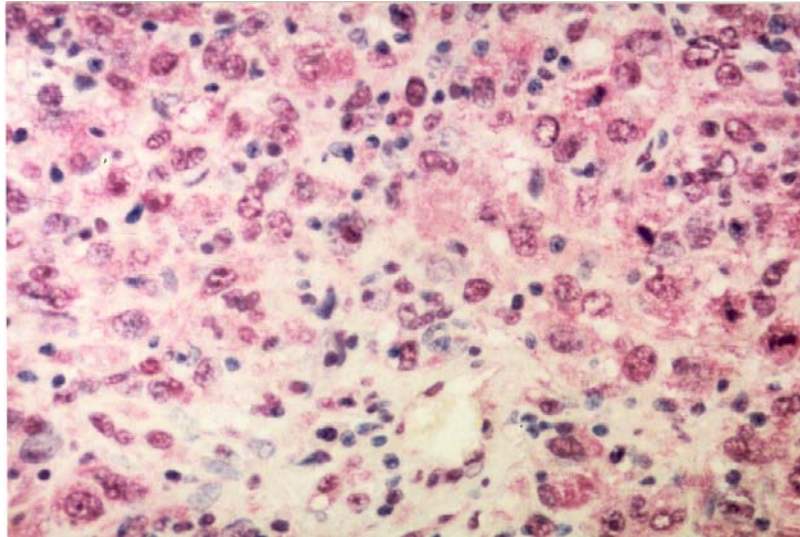
Der Untersuchungszeitraum betrug im Mittel 41 Monate, mit einem Minimum von 0 und einem Maximum von 76 Monaten. Bei 26 der 163 Patientinnen (16 %) trat während dieses Zeitraums ein Lokalrezidiv auf, primäre Fernmetastasen fanden sich bei 39 Patientinnen (23,9 %). Insgesamt erlitten 47 Patientinnen (30,1 %) ein Rezidiv oder Metastasen, welche im Weiteren als Ereignis (event) bezeichnet werden.

Bis zum Ende der Datenerhebung verstarben 25 Patientinnen (15,3 %), Grundlage der Überlebensstatistik waren Krankenakten und Auskünfte der Einwohnermeldeämter.

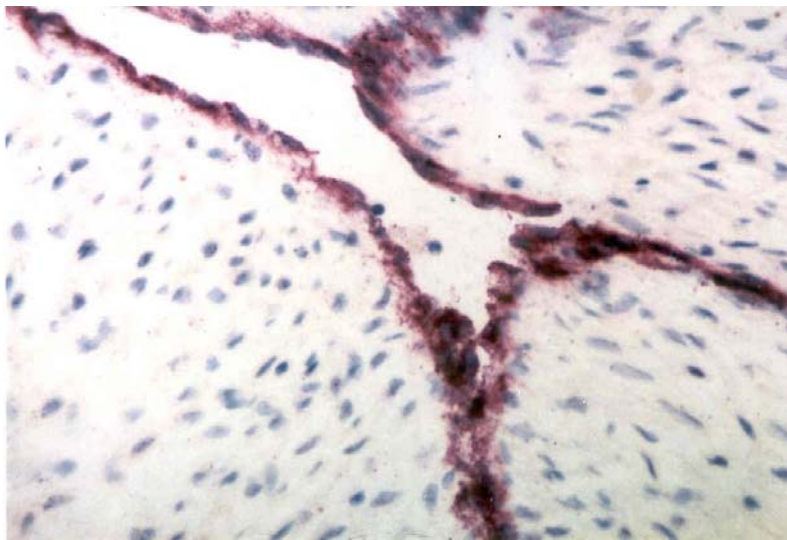
3.2 Immunhistochemische Auswertung der eNOS-Expression

Die Tumore wurden nach dem in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen APAAP-Verfahren angefärbt. Als immunhistologisches Resultat kam es zu einer spezifischen Rotfärbung von sowohl Brustkrebszellen als auch Endothelzellen innerhalb der Tumorzellnester und deren Umgebung. Diese Rotfärbung entsprach einer Expression von eNOS.

Der eNOS-Antikörper färbte endotheliale Zellen kleiner Kapillaren und epitheliale Zellen der Brustdrüsen an. Kleine Kapillaren mit einer positiven Immunreaktion für eNOS befanden sich vorwiegend in der Invasionsfront des Tumors und waren gewöhnlich von einer begleitenden lymphatischen Reaktion umgeben. Kapillaren, welche keine Reaktion mit dem eNOS-Antikörper zeigten, fanden sich häufiger in den Tumorzentren.



**Abbildung 2: Darstellung der rotgefärbten Tumorzellen im Mamma-
karzinomgewebe**



**Abbildung 3: Darstellung der rotgefärbten Endothelzellen in der
Nabelschnur (Positiv-Kontrolle)**

Eine eNOS-Expression zeigte sich bei 101 (62 %) der Tumore. Hiervon färbten sich die meisten Tumore (32,5 %) schwach positiv an, während 21,5 Prozent eine mäßige Anfärbung und nur 8 Prozent eine starke bzw. sehr starke eNOS-Expression zeigten. Verbleibende 38 Prozent der gefärbten Tumore exprimierten kein eNOS (negativ).

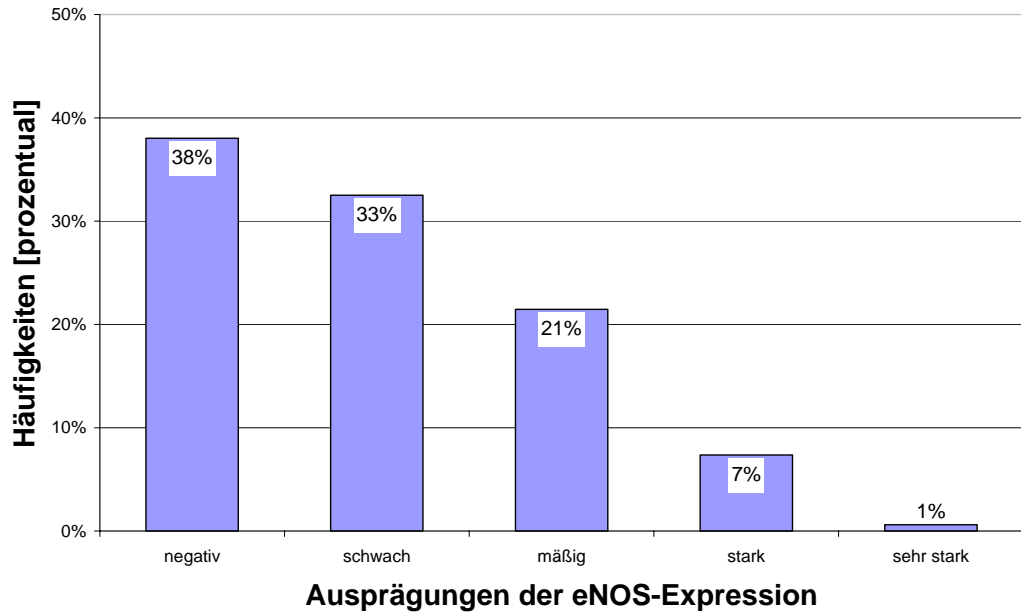


Abbildung 4: Verteilung der Ausprägungen der eNOS-Expression

Als Trennwert (Cut-Off-Punkt) zur Gruppeneinteilung dieser Werte, wurde der Median festgelegt. Dieser wurde im vorliegenden Kollektiv bei „schwach“ positiver Anfärbung überschritten. Tumore mit dieser Ausprägung und darüber zählten als eNOS-positiv, solche die ohne Anfärbung blieben wurden der Gruppe der eNOS-negativen Karzinome zugeordnet.

3.3 Auswertung der etablierten Prognosefaktoren

Um die prognostische Bedeutung der etablierten Prognosefaktoren zu ermitteln und sie in Beziehung zur eNOS-Expression setzen zu können, wurde deren Verteilung im Patientinnengut untersucht. Den Berechnungen liegt eine Gesamtzahl von 163 zugrunde.

Entsprechend des gegenwärtigen Kenntnisstandes gelten folgende Parameter als klinisch etabliert:

- Tumorgröße
- Tumorgrading
- Alter/Menopausenstatus
- Hormonrezeptorstatus
- Nodalstatus

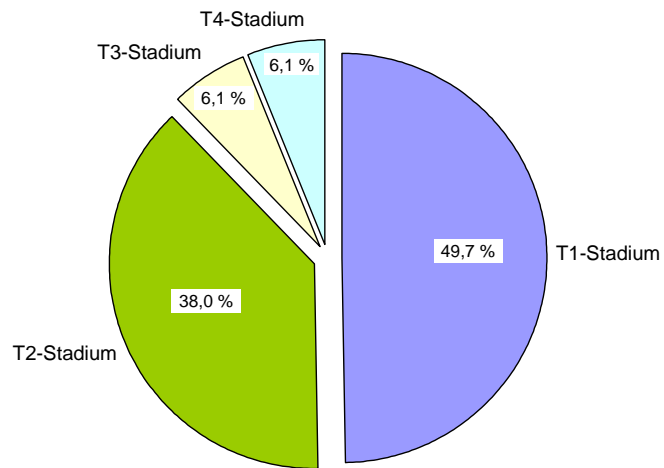


Abbildung 5: Prozentuale Verteilung der T-Stadien

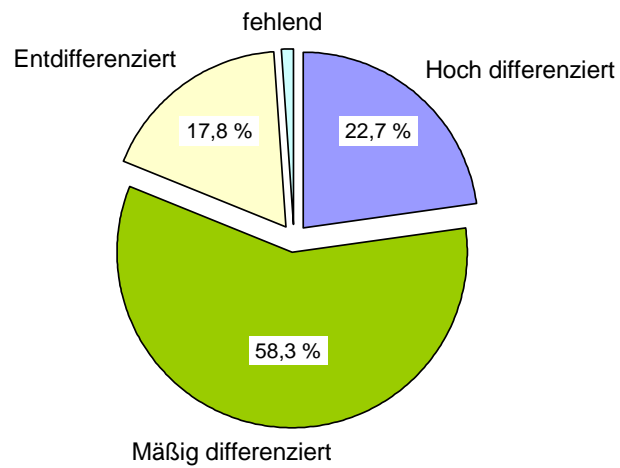


Abbildung 6: Prozentuale Verteilung des Differenzierungsgrades

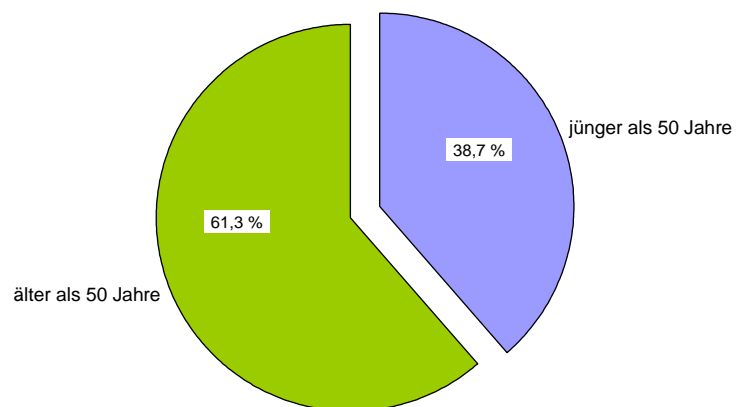


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung des Alters

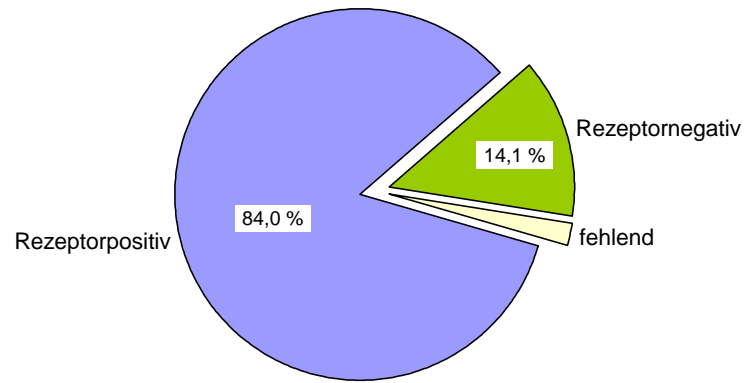


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung des Hormonrezeptorstatus

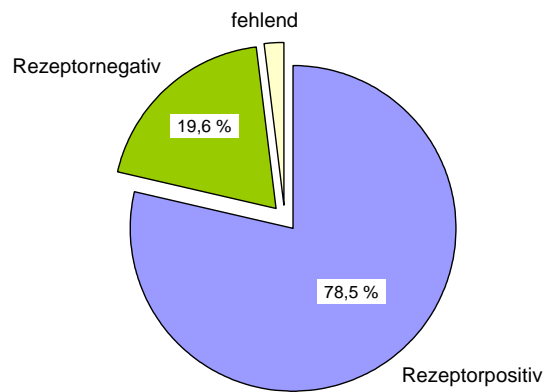


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung des Östrogenrezeptorstatus

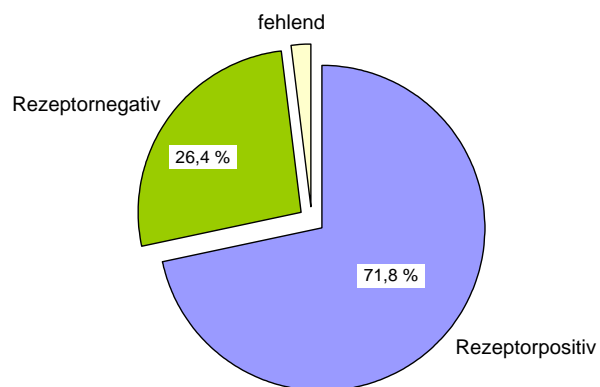


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung des Progesteronrezeptorstatus

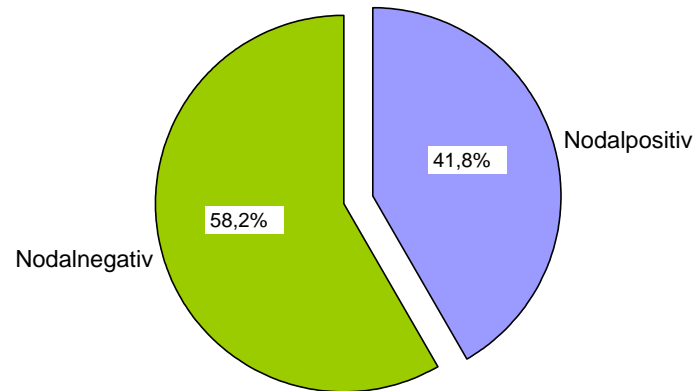


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung des Lymphknotenstatus

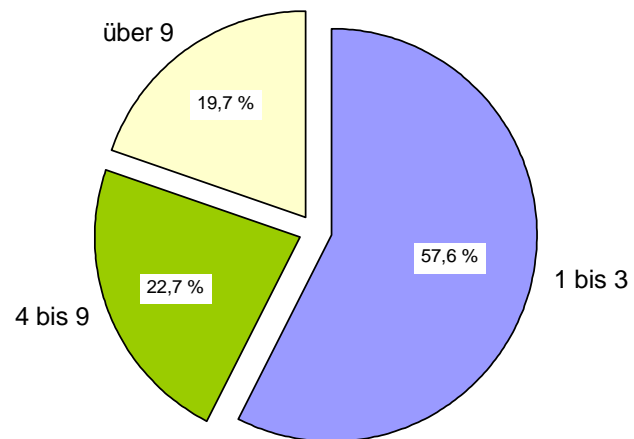


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der befallenen Lymphknoten

3.4 Korrelation der eNOS-Expression mit den prognostischen Parametern

a) eNOS und Rezeptorstatus

Es konnte ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen eNOS und dem Hormonrezeptorstatus nachgewiesen werden ($p = 0,031$). Rezeptornegative Tumore waren signifikant häufiger eNOS-positiv als rezeptorpositive. Für die Einteilung des Rezeptorstatus vgl. Tabelle 3. Bei der genaueren Aufteilung in Östrogen- und Progesteronrezeptoren bestand keine signifikante Korrelation.

Tabelle 4: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Hormonrezeptorstatus, berechnet mit Chi-Quadrat-Test

Hormonrezeptorstatus	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
Positiv	56	81	0,031
Negativ	4	19	

Tabelle 5: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Rezeptorstatus, berechnet mit Chi-Quadrat-Test

Rezeptorstatus	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
ER+/PR+	43	65	0,224
ER+/PR-	8	12	
ER-/PR+	5	4	
ER-/PR-	5	19	

Tabelle 6: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Östrogenrezeptorstatus, berechnet mit Chi-Quadrat-Test

Östrogenrezeptorstatus	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
Positiv	51	77	0,221
Negativ	9	23	

Tabelle 7: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Progesteronrezeptorstatus, berechnet mit Chi-Quadrat-Test

Progesteronrezeptorstatus	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
Positiv	47	69	0,079
Negativ	10	30	

b) eNOS und Menopausenstatus

Auch zwischen den Scorewerten der eNOS-Expression und dem Menopausenstatus der Patientinnen bestand eine signifikante Korrelation ($p = 0,049$). Diese Korrelation zeigt, dass prämenopausale Patientinnen eher eNOS-positive Tumore als postmenopausale besaßen.

Tabelle 8: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Menopausenstatus, berechnet mit Spearman-Rho-Test

Menopausenstatus	Scorewerte der eNOS-Expression					p
	0	1	2	3	4	
Postmenopausal	40	36	18	5	-	0,049
Prämenopausal	20	17	17	7	1	

c) eNOS und Menstruationszyklus

Die Untersuchung auf einen möglichen Zusammenhang zwischen eNOS-Expression und der Zyklushälfte zum OP-Zeitpunkt zeigte eine signifikante Korrelation ($p = 0,048$). Patientinnen, welche in der ersten Zyklushälfte operiert wurden hatten signifikant häufiger eNOS-positive Tumoren.

Tabelle 6: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Menstruationszyklus, berechnet mit Spearman-Rho-Test

Zyklus	Scorewerte der eNOS-Expression					p
	0	1	2	3	4	
1. Zyklushälfte	5	5	9	3	1	0,048
2. Zyklushälfte	8	6	2	2	-	

d) eNOS und Alter der Patientinnen

Zwischen eNOS und dem Alter der Patientinnen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p = 0,428$).

Tabelle 9: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Alter der Patientinnen, berechnet mit Chi-Quadrat-Test

Alter	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
< 50	25	38	0,428
≥ 50	37	63	

e) eNOS und Tumorgröße

Zwischen eNOS und der Tumorgröße konnte kein nennenswerter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p = 0,850$).

Tabelle 10: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Tumorgröße, berechnet mit Chi-Quadrat-Test

Tumorgröße	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
T1	31	50	0,850
T2	22	40	
T3	5	5	
T4	4	6	

f) eNOS und Grading

Folgender Zusammenhang ließ sich zwischen eNOS und dem Grading der Tumore erfassen: entdifferenzierte Tumore waren häufiger als erwartet eNOS-positiv. Diese Korrelation erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p = 0,271$).

Tabelle 11: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Grading, berechnet mit Chi-Quadrat-Test

Grading	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
Hoch differenziert	15	22	0,271
Mäßig differenziert	38	57	
Entdifferenziert	7	22	

g) eNOS und Lymphknotenstatus

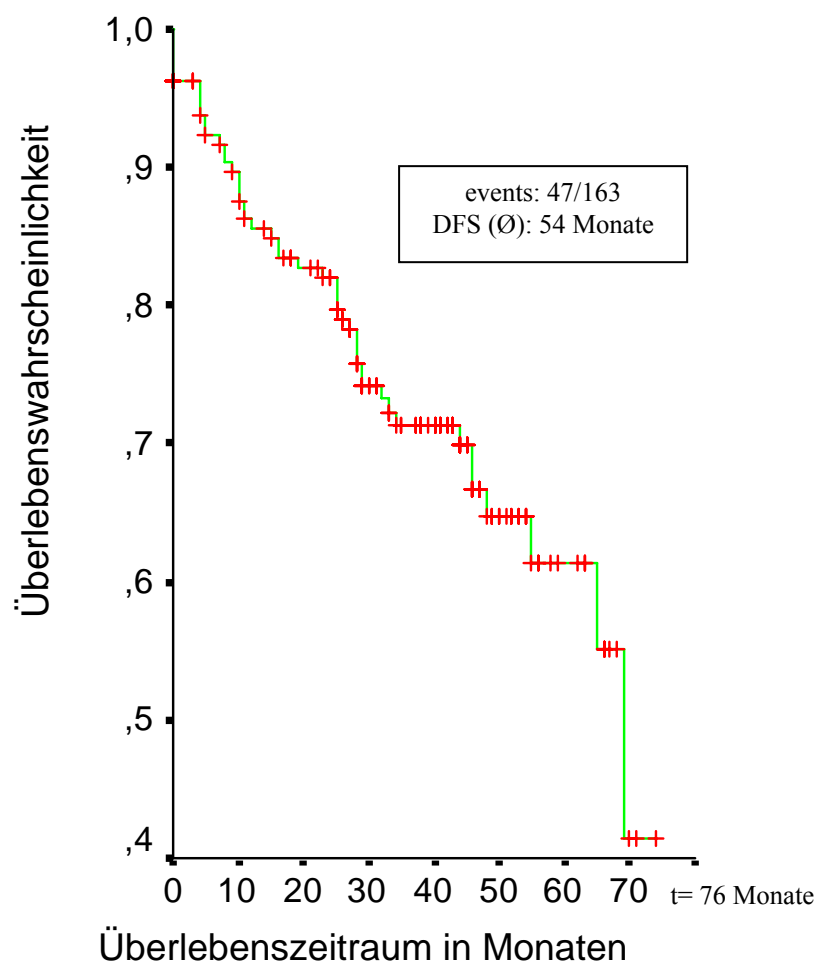
Ein ähnlicher Zusammenhang konnte zwischen der eNOS-Expression und dem Lymphknotenstatus nachgewiesen werden. Tumore, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose eine Absiedelung in die Lymphknoten erfolgt war, exprimierten häufiger das eNOS-Antigen, jedoch nicht signifikant ($p = 0,302$).

Tabelle 12: Korrelation zwischen eNOS-Expression und Lymphknotenstatus, berechnet mit Exaktem Test nach Fisher

Lymphknotenstatus	eNOS-negativ	eNOS-positiv	p
Negativ	37	55	0,302
Positiv	23	43	

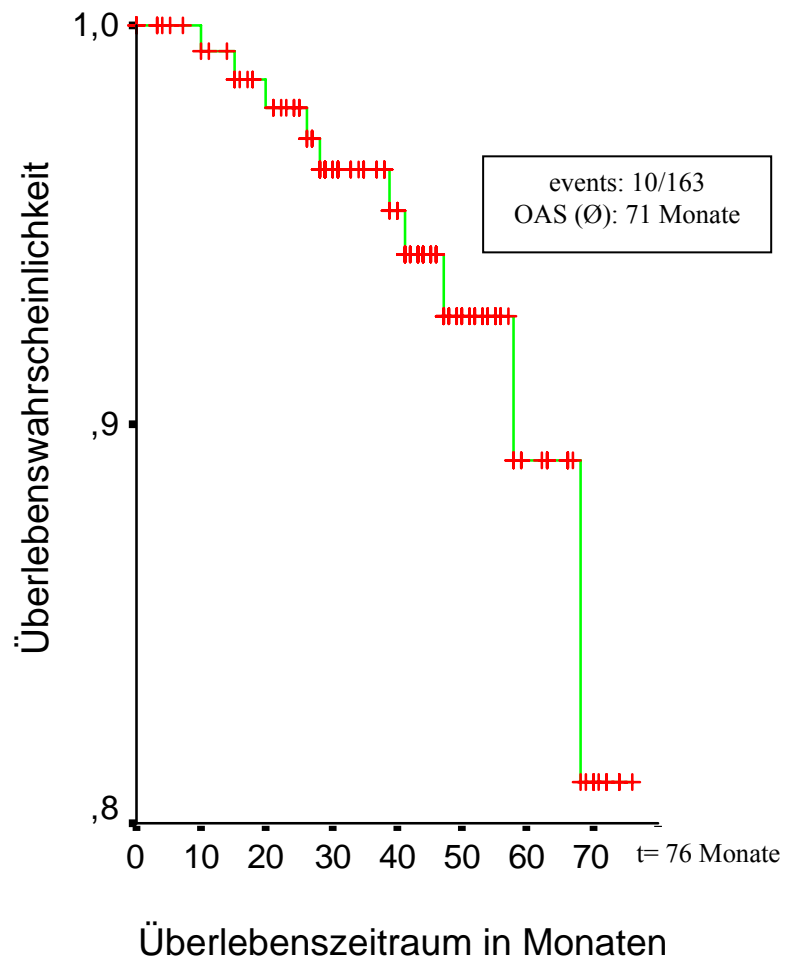
3.5 Uni- und Multivariate Überlebensanalyse

Es folgen Kaplan-Meier-Überlebenskurven, welche sowohl für das krankheitsfreie als auch für das Gesamtüberleben erstellt wurden. Nach der Darstellung des gesamten Kollektives folgt die Betrachtung der relevanten Prognosefaktoren. Die Reihenfolge richtet sich an der in Kapitel 3.3 erwähnten Aufzählung der Prognosefaktoren.



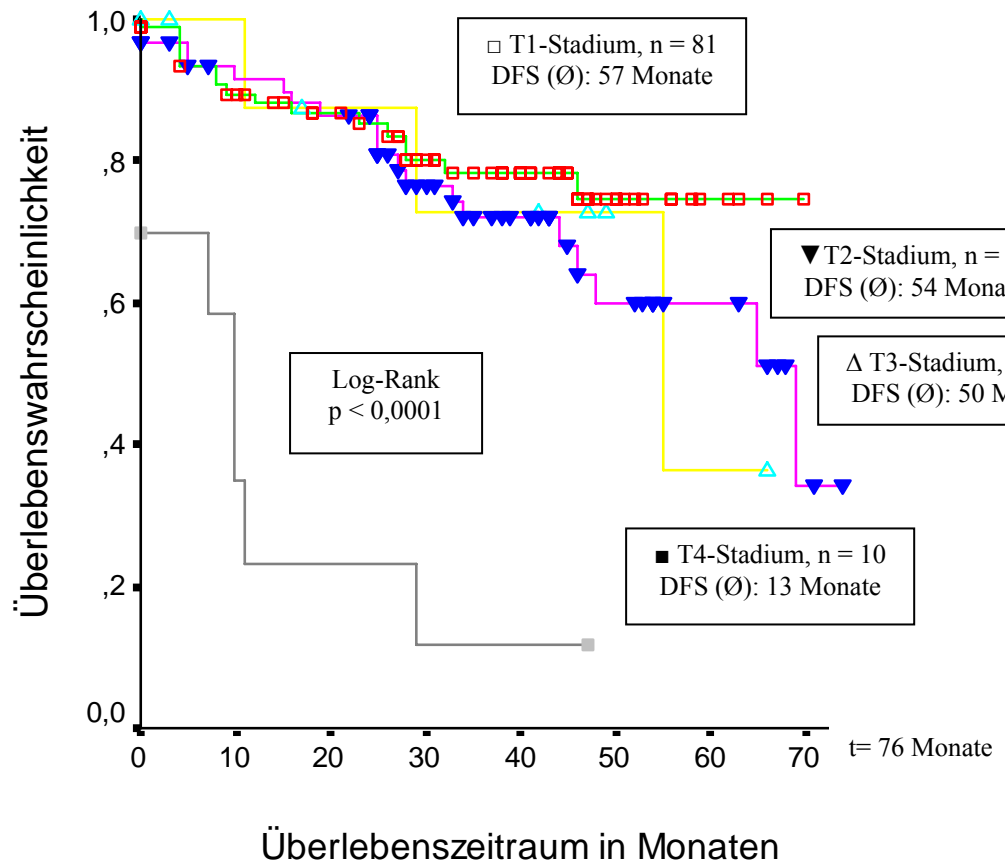
Patients at risk: 163 129 115 85 64 28 13 3

Abbildung 13: Krankheitsfreies Überleben des Gesamtkollektives (disease free survival)



Patients at risk: 163 149 138 112 90 46 20 7

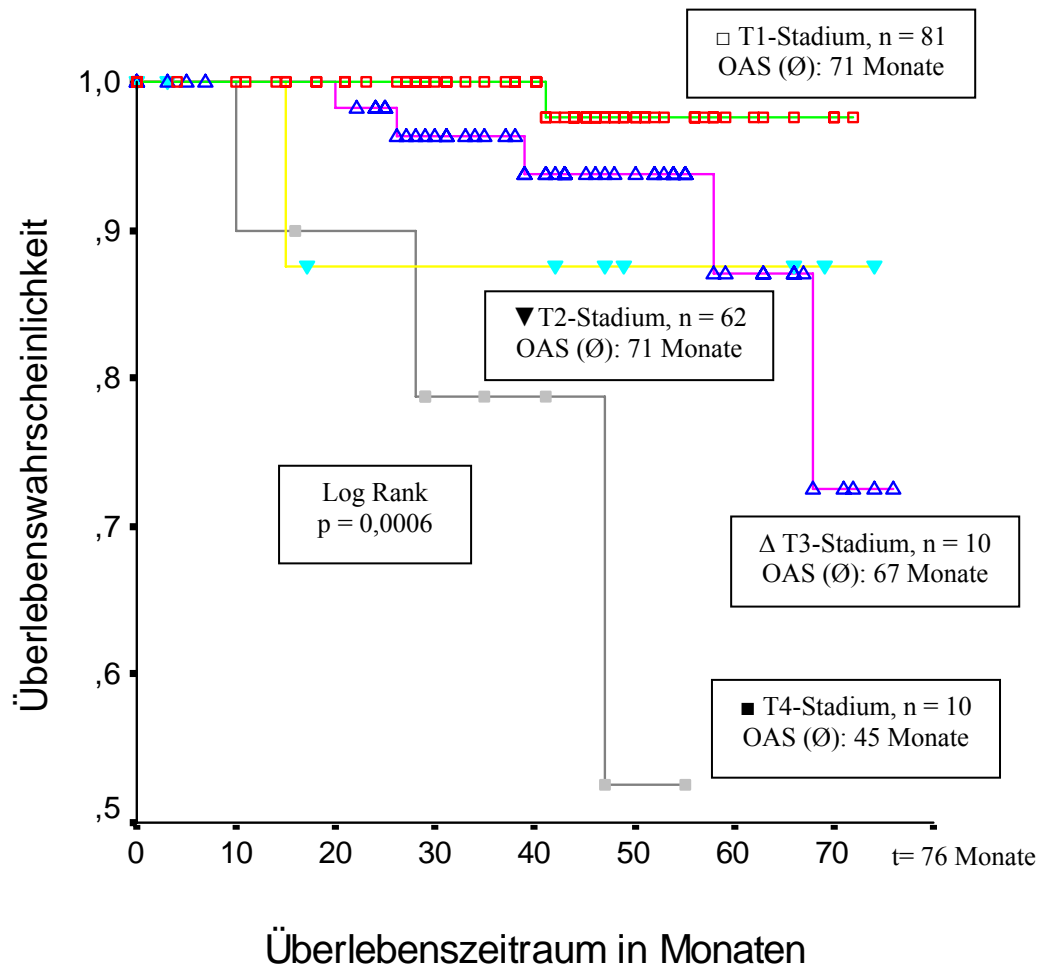
Abbildung 14: Gesamtüberleben des Gesamtkollektivs (overall survival)



Patients at risk:

T1-Stadium	81	65	57	44	33	12	4	0
T2-Stadium	62	52	49	34	25	14	8	2
T3-Stadium	10	7	6	5	4	2	1	0
T4-Stadium	10	4	2	1	0	0	0	0

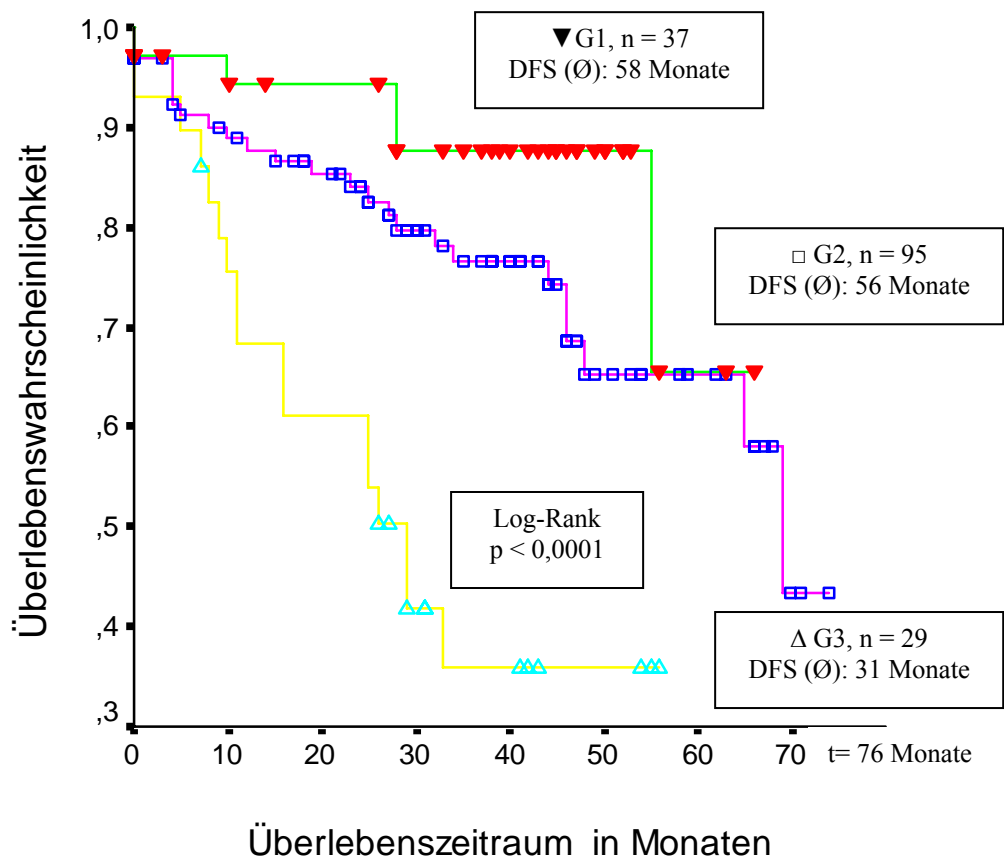
Abbildung 15: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom T-Stadium (disease free survival)



Patients at risk:

T1-Stadium	81	74	67	55	45	18	6	2
T2-Stadium	62	57	56	45	34	23	11	3
T3-Stadium	10	7	5	5	5	3	2	1
T4-Stadium	10	9	8	5	3	1	0	0

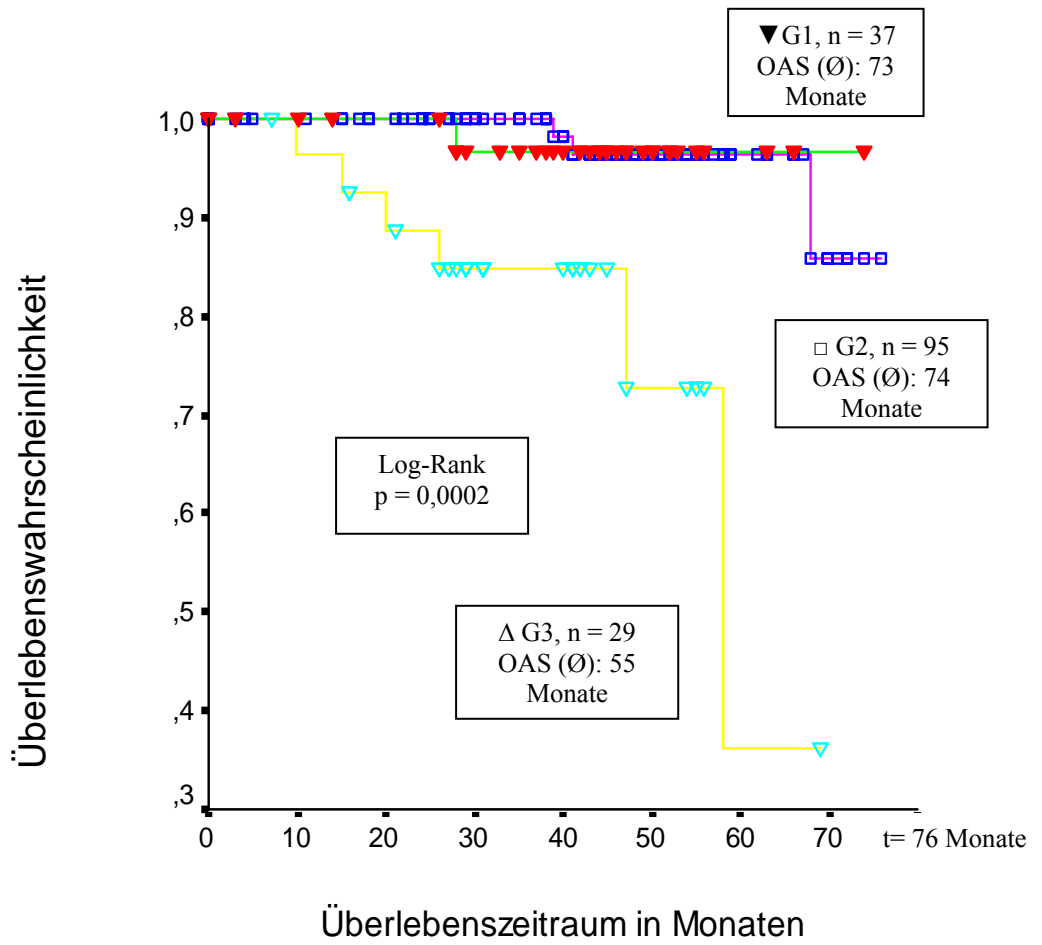
Abbildung 16: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom T-Stadium (overall survival)



Patients at risk:

G1	37	31	29	24	18	8	2	0
G2	95	76	68	51	39	17	11	2
G3	29	21	17	9	6	3	0	0

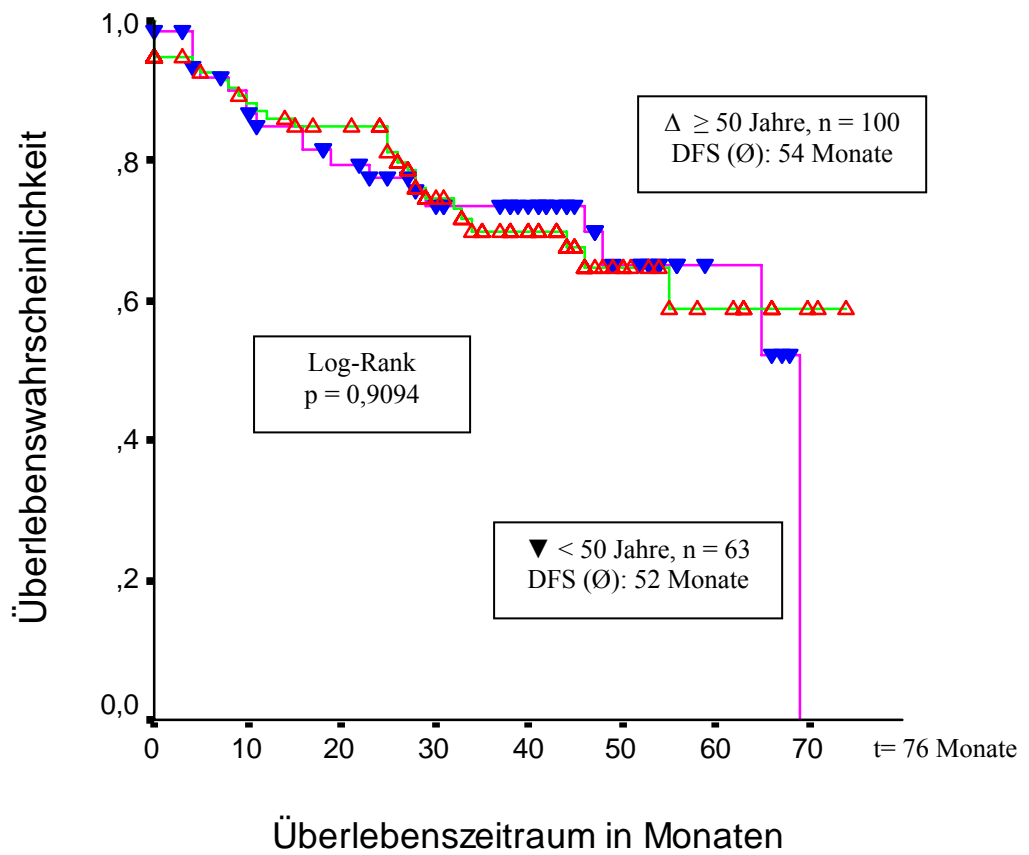
Abbildung 17: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit von der Tumordifferenzierung (disease free survival)



Patients at risk:

G1	37	33	32	27	21	9	3	1
G2	95	88	82	68	55	31	16	6
G3	29	26	23	16	12	5	1	0

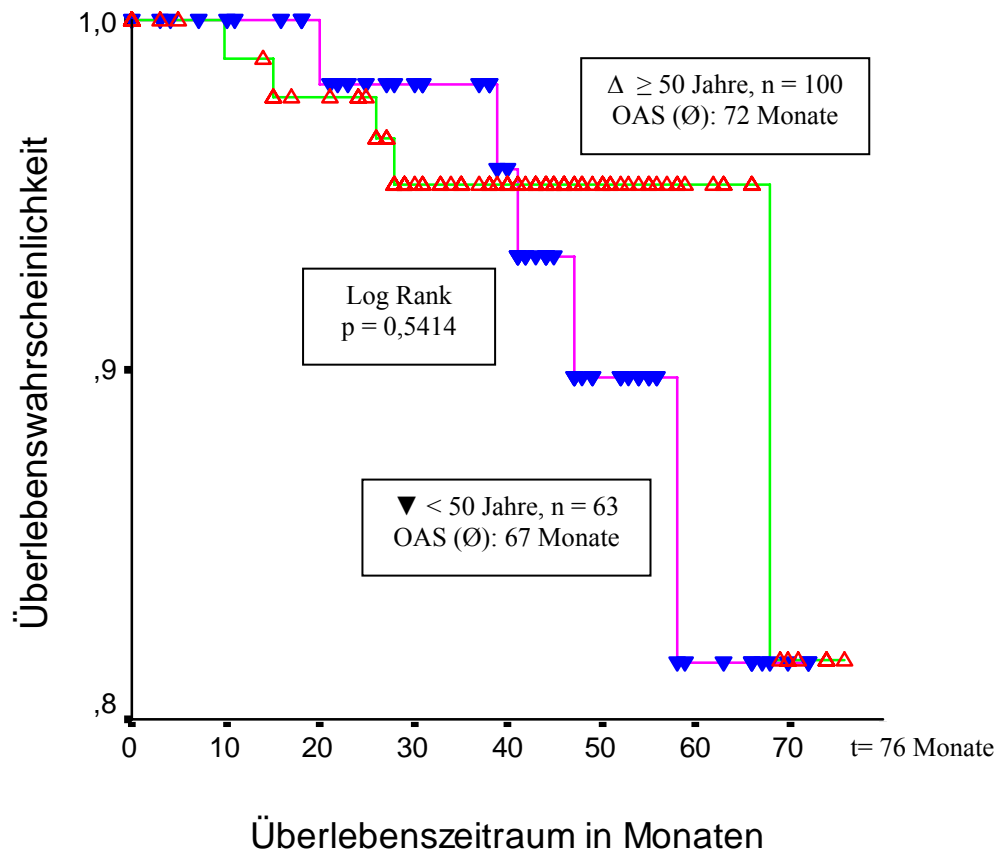
Abbildung 18: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Tumordifferenzierung (overall survival)



Patients at risk:

≥ 50 Jahre	100	78	72	50	36	15	8	2
< 50 Jahre	63	52	43	34	27	13	5	0

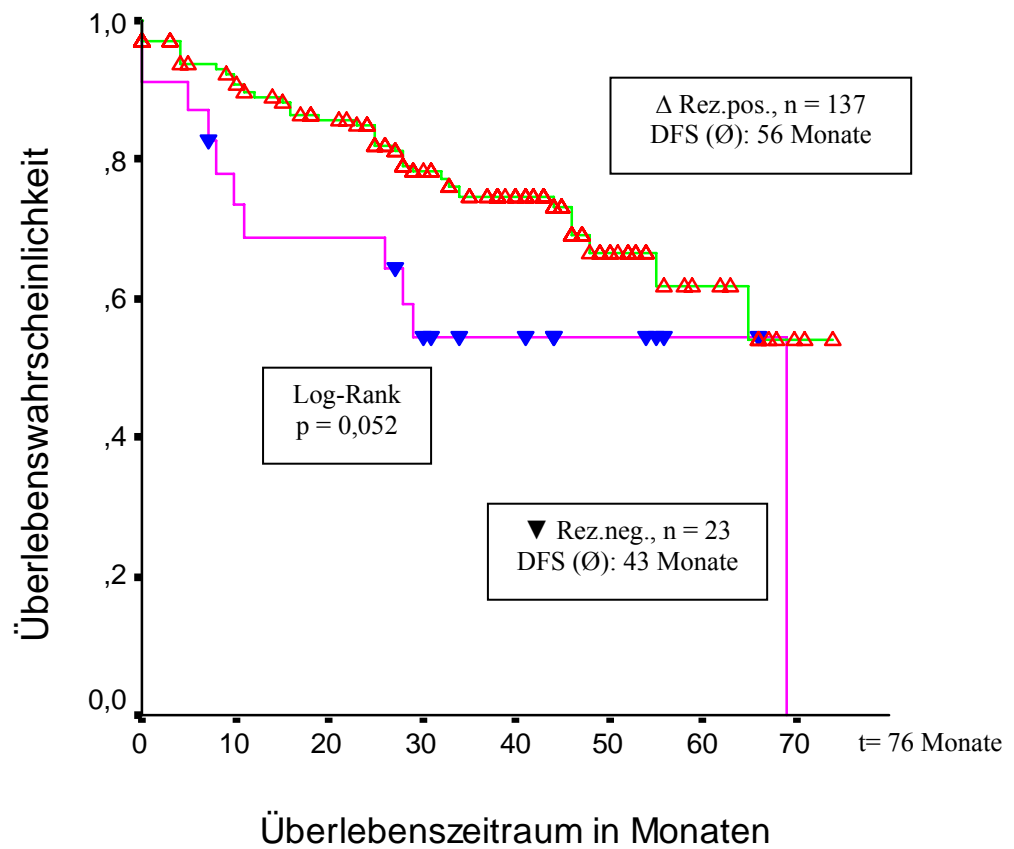
Abbildung 19: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom Alter (disease free survival)



Patients at risk:

≥ 50 Jahre	100	90	86	65	51	26	12	4
< 50 Jahre	63	58	53	46	38	20	8	2

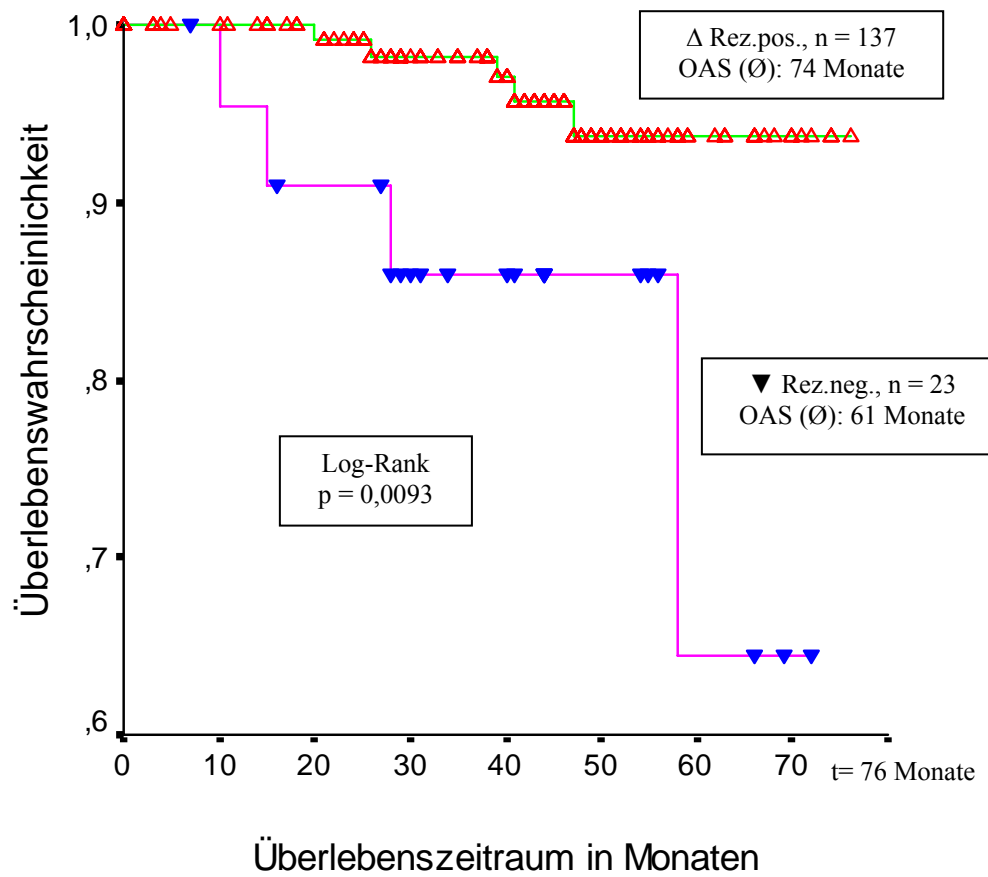
Abbildung 20: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Alter (overall survival)



Patients at risk:

Rez.pos.	137	113	99	73	55	22	10	2
Rez.neg.	23	16	15	10	8	5	2	0

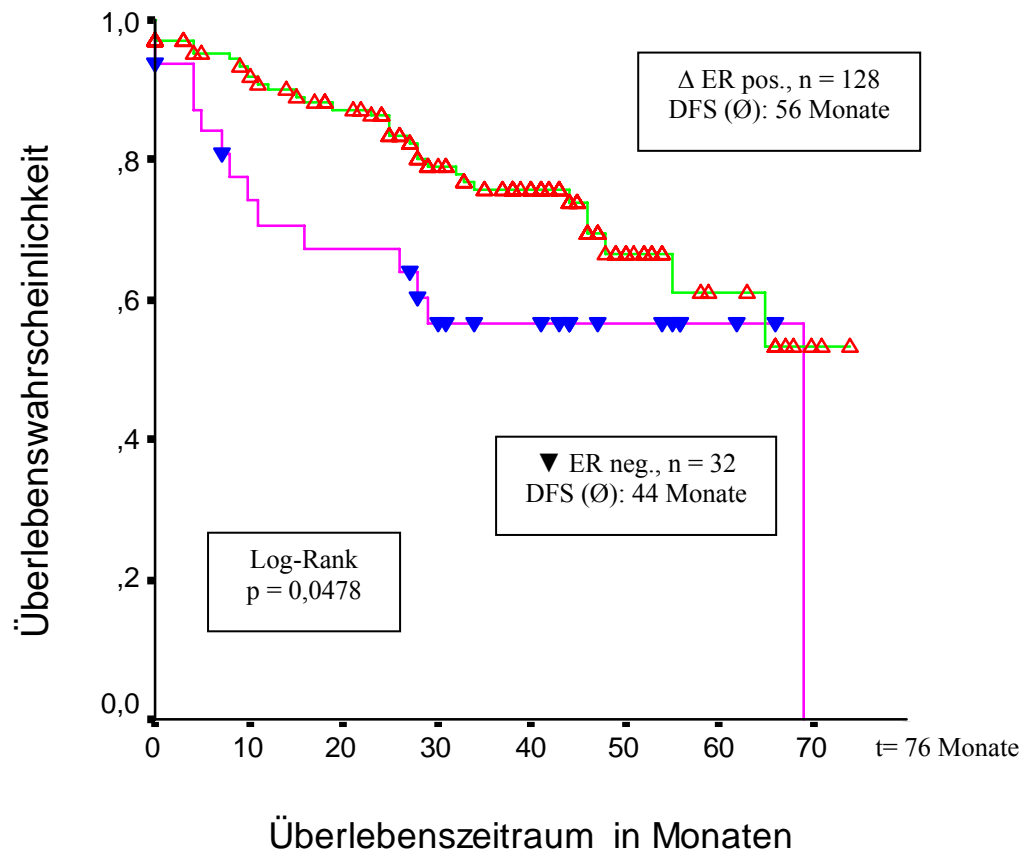
Abbildung 21: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (disease free survival)



Patients at risk:

Rez.pos.	137	125	117	95	76	37	15	6
Rez.neg.	23	21	19	14	11	7	3	1

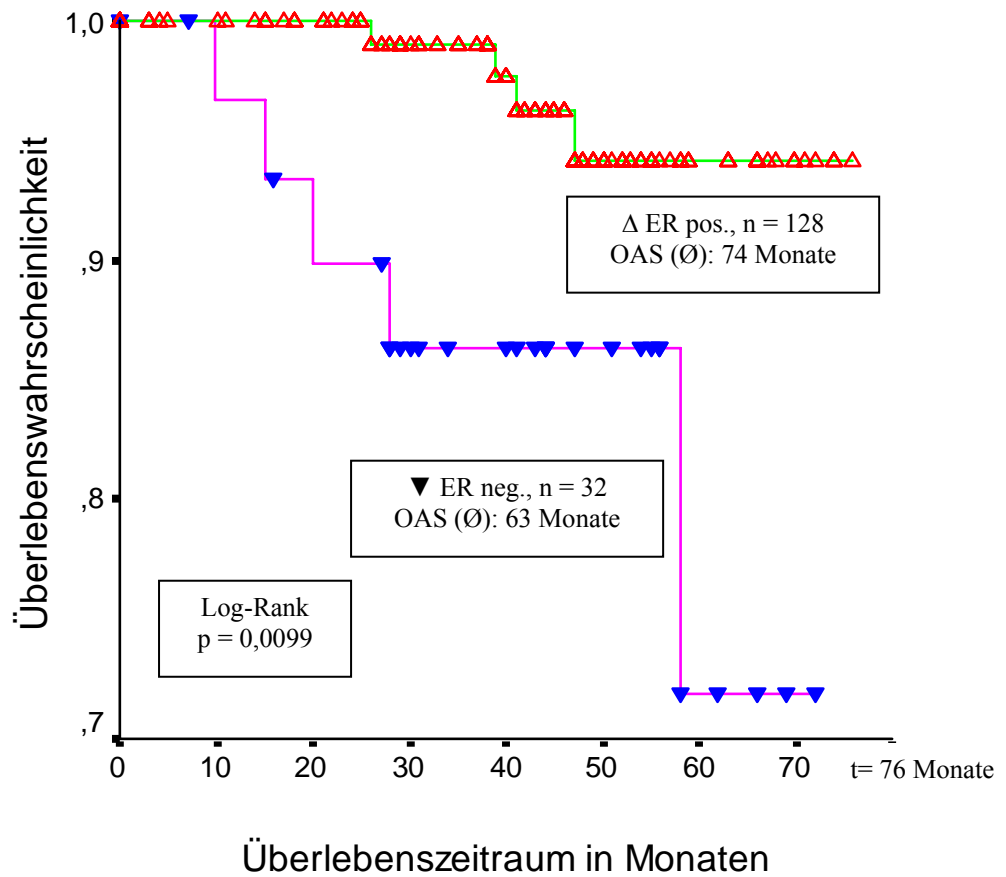
Abbildung 22: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (overall survival)



Patients at risk:

ER pos.	128	107	94	69	51	20	9	2
ER neg.	32	22	20	14	12	7	3	0

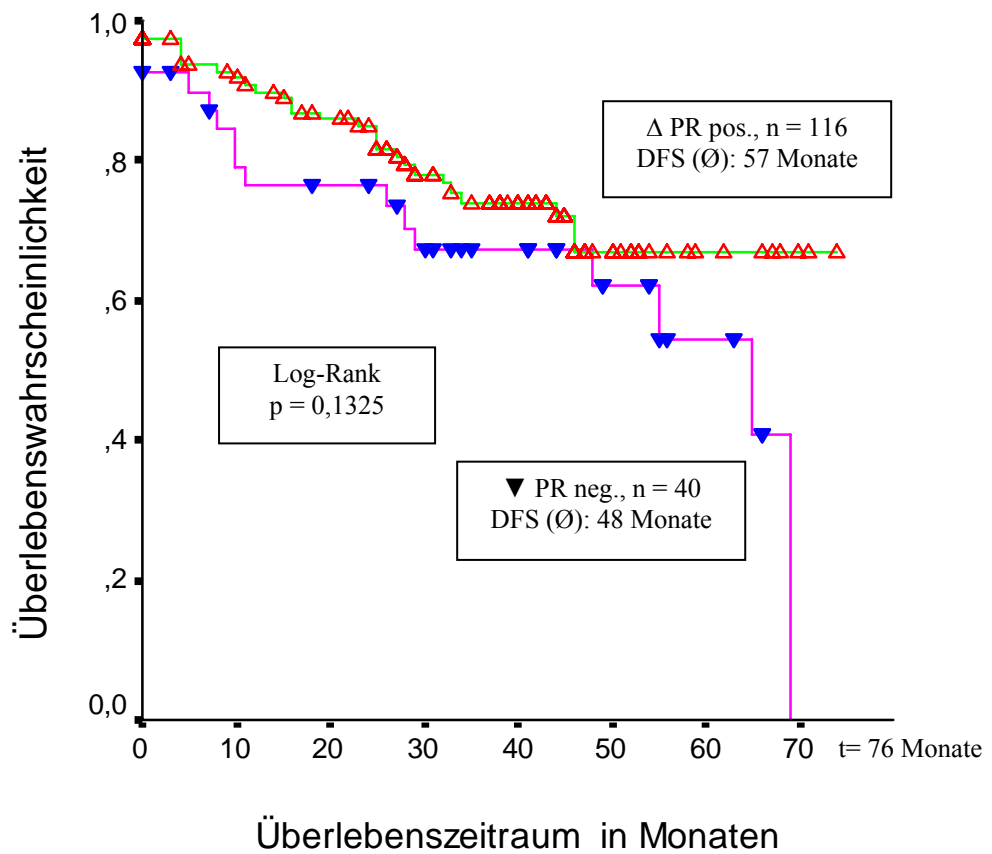
Abbildung 23: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (disease free survival)



Patients at risk:

ER pos.	128	117	110	89	70	33	14	6
ER neg.	32	29	26	20	17	11	4	1

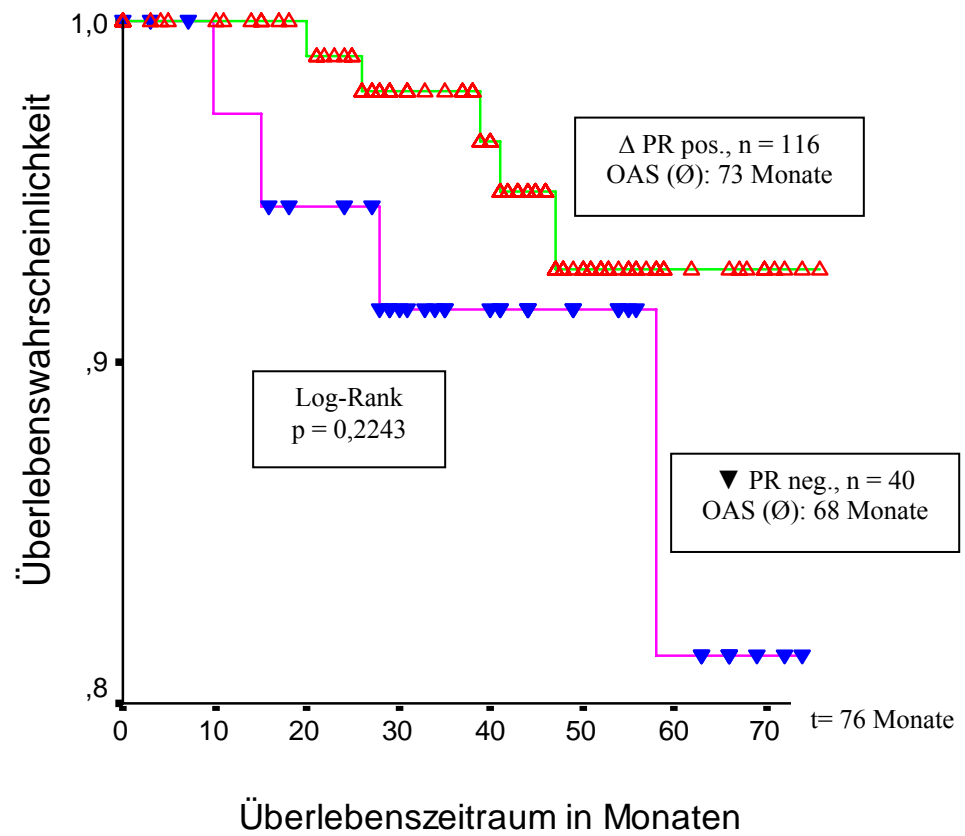
Abbildung 24: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (overall survival)



Patients at risk:

PR pos.	116	96	84	61	46	17	7	2
PR neg.	40	30	27	21	17	10	5	0

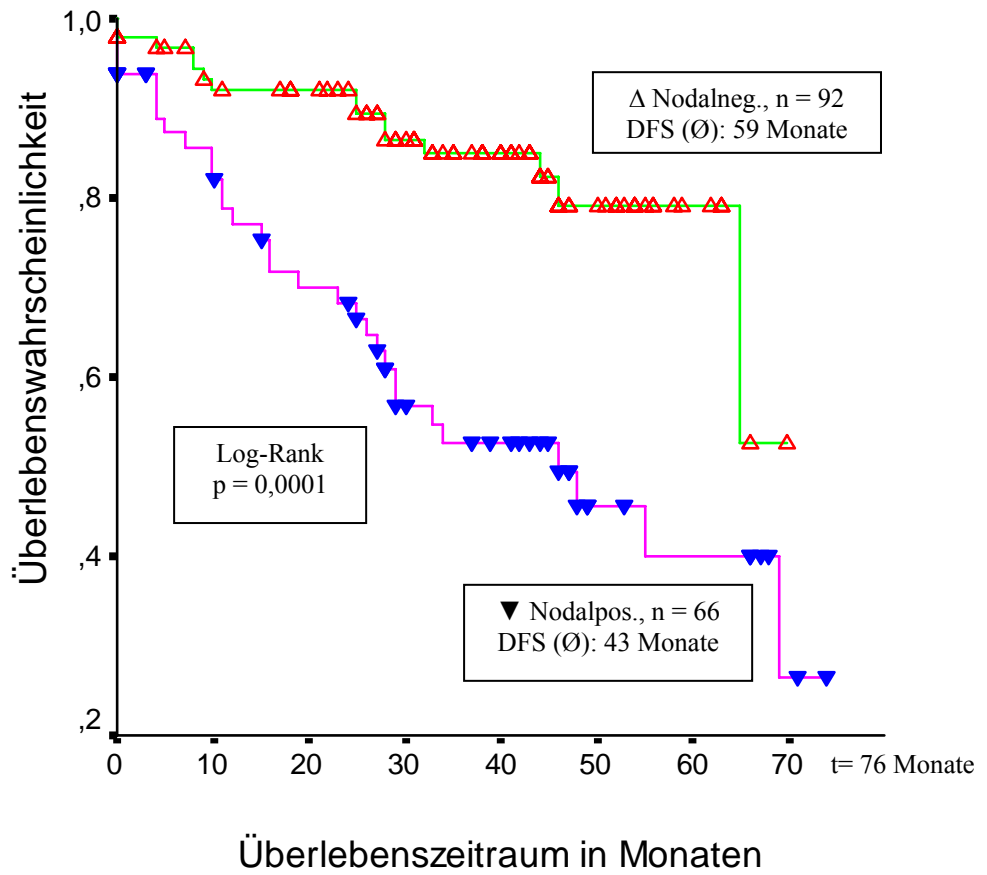
Abbildung 25: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus (disease free survival)



Patients at risk:

PR pos.	116	106	99	80	65	31	10	5
PR neg.	40	36	33	26	20	13	8	2

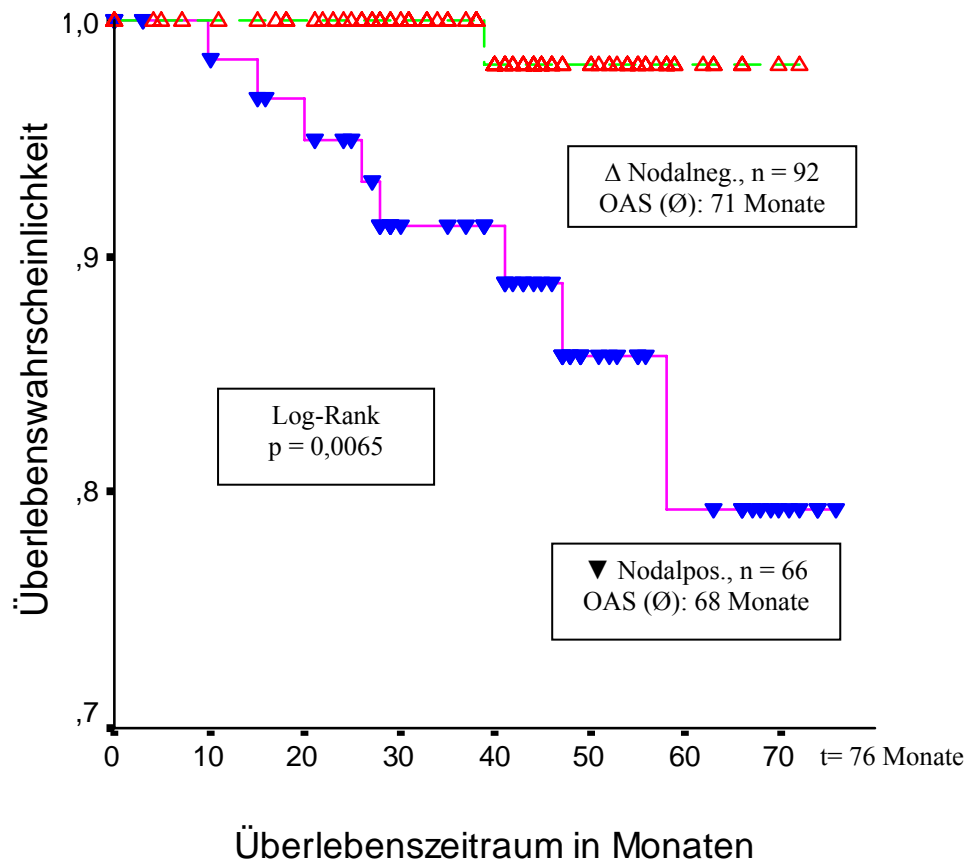
Abbildung 26: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptorstatus (overall survival)



Patients at risk:

Nodalneg. 92	78	74	57	41	18	6	0
Nodalpos. 66	50	40	26	22	9	7	2

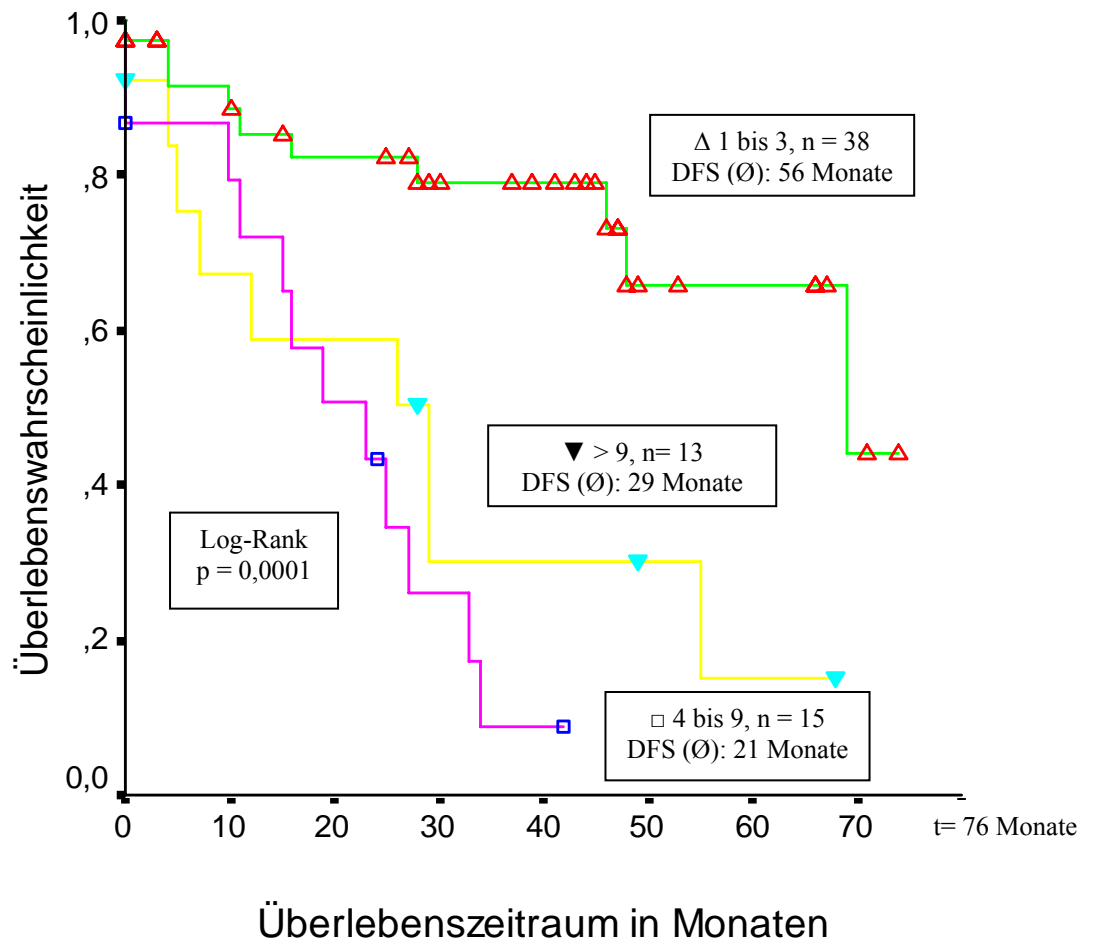
Abbildung 27: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus (disease free survival)



Patients at risk:

Nodalneg.	92	86	81	67	50	25	7	1
Nodalpos.	66	60	55	42	38	19	12	5

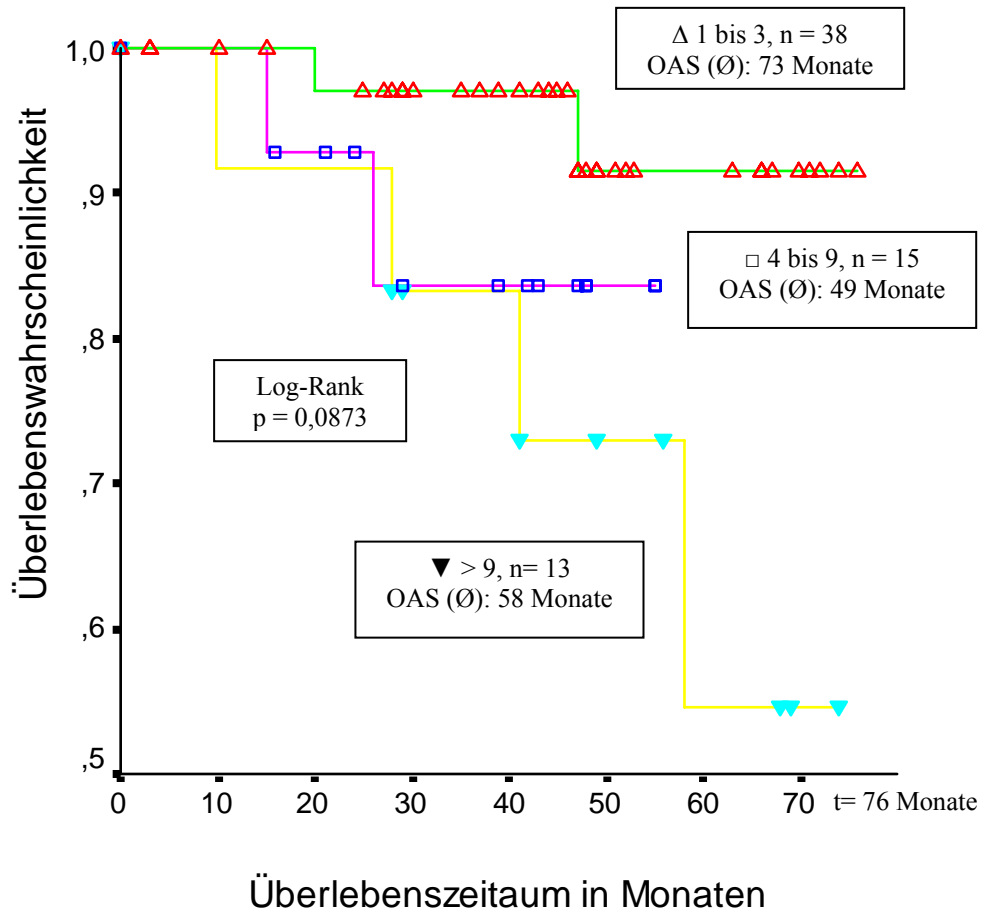
Abbildung 28: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus (overall survival)



Patients at risk:

1 bis 3	38	30	26	20	18	7	6	2
4 bis 9	15	11	7	3	1	0	0	0
> 9	13	8	7	3	3	2	1	0

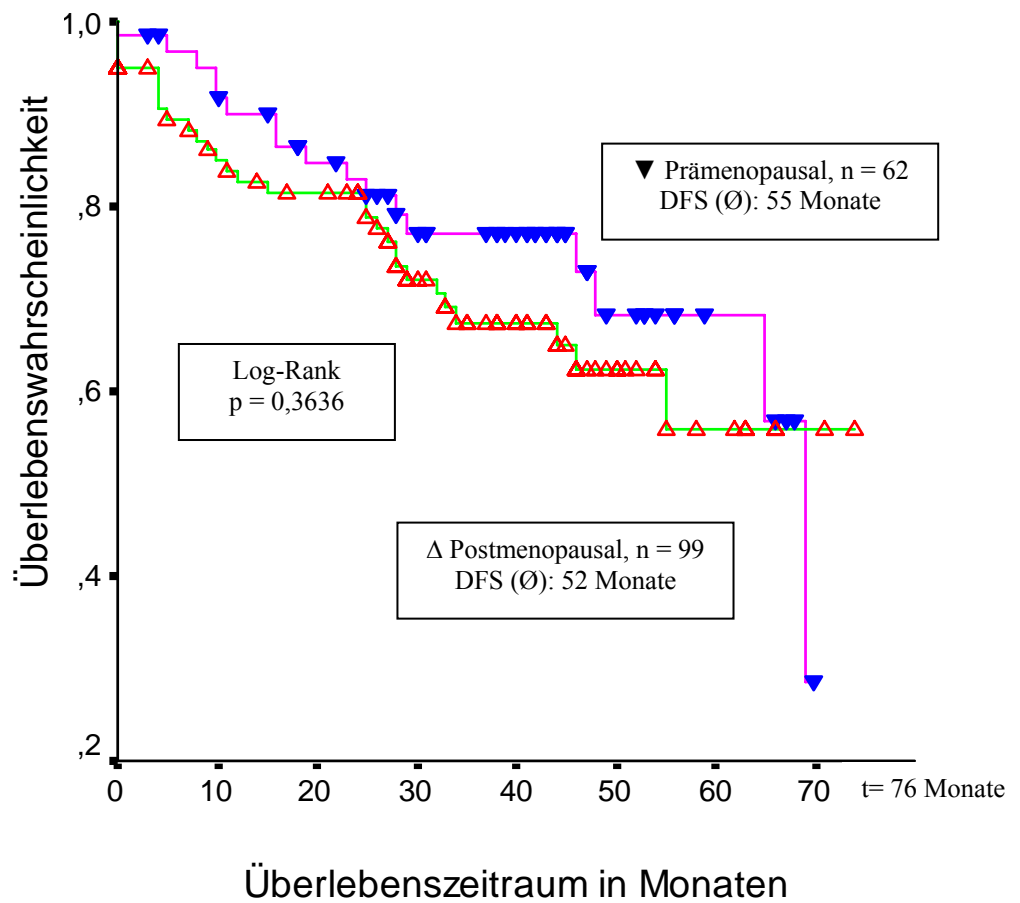
Abbildung 29: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus (overall survival)



Patients at risk:

1 bis 3	38	34	32	26	23	12	9	4
4 bis 9	15	14	12	8	7	2	0	0
> 9	13	11	11	8	8	5	3	1

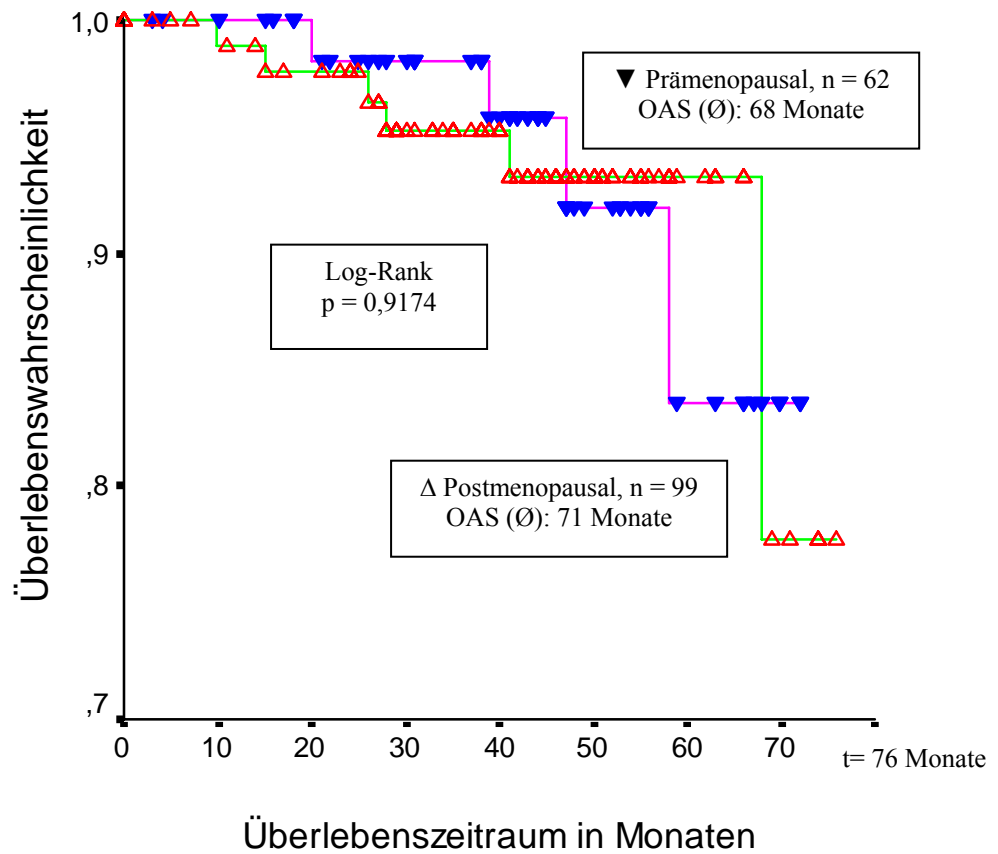
Abbildung 30: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Anzahl der befallenen Lymphknoten (overall survival)



Patients at risk:

Prämeno pausal	62	56	47	37	30	13	6	1
Postmeno pausal	99	74	68	46	33	15	7	2

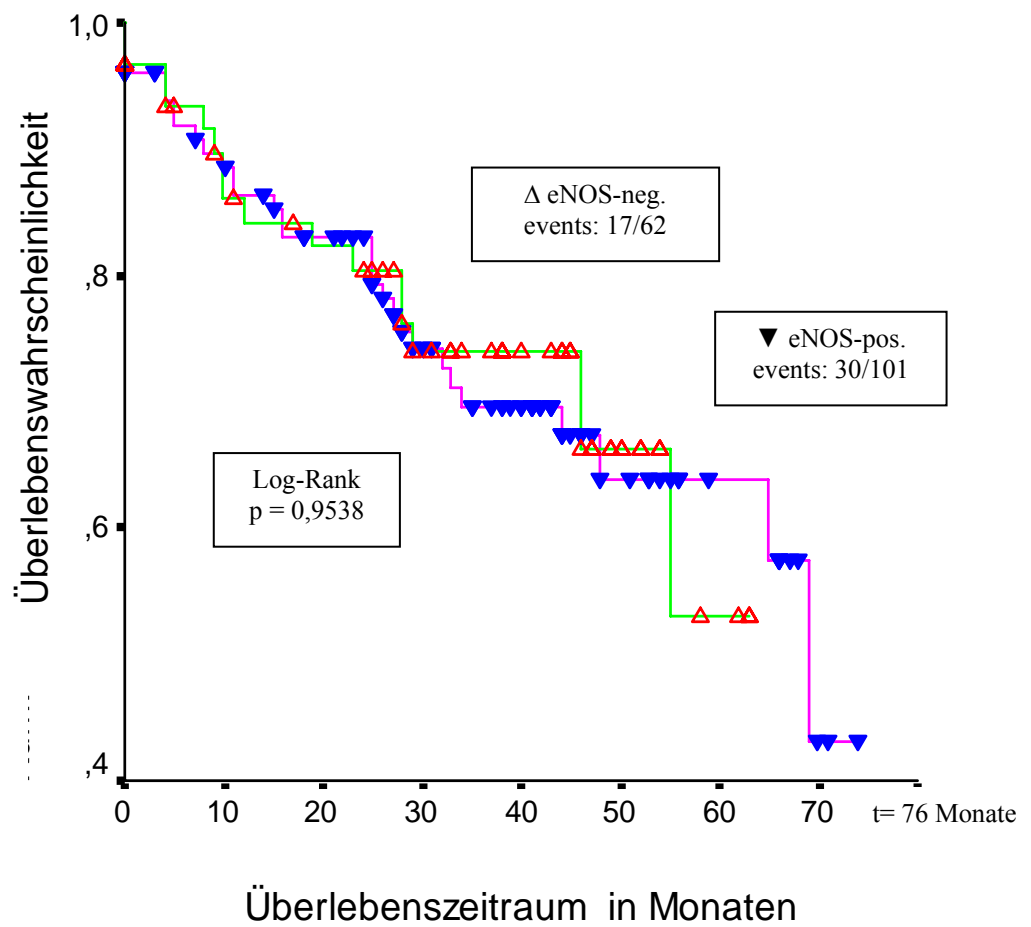
Abbildung 31: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit vom Menopausenstatus (disease free survival)



Patients at risk:

Prämeno pausal	62	59	54	47	38	19	9	3
Postmeno pausal	99	89	84	64	51	27	11	4

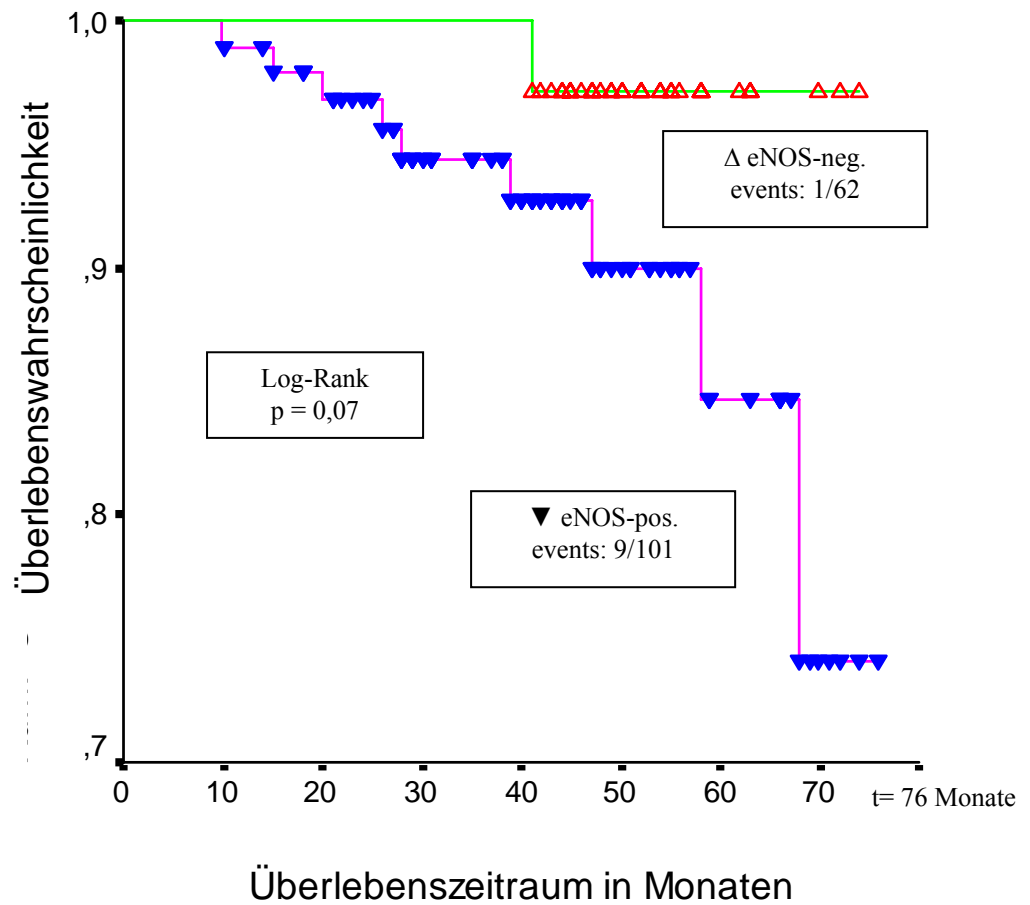
Abbildung 32: Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Menopausenstatus (overall survival)



Patients at risk:

eNOS- pos.:	101	81	72	51	39	19	10	2
eNOS- neg.:	62	47	43	33	24	9	3	0

Abbildung 33: Krankheitsfreies Überleben in Abhängigkeit von der eNOS-Expression (disease free survival)



Patients at risk:

eNOS- pos.:	101	94	87	67	54	27	15	9
eNOS- neg.:	62	55	51	44	35	18	6	2

Abbildung 34: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der eNOS-Expression (overall survival)

Die Expression von eNOS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen. Dennoch ist mit einem $p = 0,07$ im Gesamtüberleben ein Trend zu erkennen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patientinnen mit eNOS-negativen Tumoren war höher als für solche, deren Tumore eNOS exprimierten.

Um festzustellen, ob ein repräsentatives Patientenvorkommen die Grundlage für die vorliegende Arbeit bildet, wurden die als etabliert geltenden Prognosefaktoren auf ihre prognostische Signifikanz hin geprüft. Die uni- und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben erfolgte mit der Cox-Regression, nach der Rückwärts-Methode (Wald-Statistik). Dieses Verfahren wurde mit den etablierten Prognosefaktoren und eNOS angewendet, für die Gruppierung der Faktoren vgl. Kap. 2.1. Das mediane Follow-up der Patientinnen betrug 41 Monate, vgl. Kap. 3.1

Tabelle 13: Uni- und multivariate Analyse der etablierten Prognosefaktoren (Cox-Regression) für das Gesamtüberleben

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	Konfidenz- Intervall	P-Wert	HR	Konfidenz- Intervall	P-Wert
T-Stadium	2.68	1.47-4.88	0.001	2.37	1.25-4.50	0.008
Grading	5.51	1.75-17.31	0.003	4.17	1.25-13.91	0.02
Rezeptorstatus	4.85	1.30-18.08	0.019	-	-	-
LK-status	10.30	1.29-82.60	0.028	-	-	-
eNOS	5.29	0.67-41.87	0.11	-	-	-
Alter	1.47	0.42-5.09	0.54	-	-	-

In der univariaten Analyse wurden die Variablen aufgrund nicht-hochsignifikanter Regressionskoeffizienten ($> 0,01$) in der Reihenfolge Alter, eNOS, LK-status und Rezeptorstatus verworfen. Das T-Stadium und das Grading der Tumore stellen für das Gesamtüberleben statistisch hoch signifikante Prognosefaktoren dar. Signifikante Werte wurden für den Rezeptor- und den Lymphknotenstatus festgestellt.

Nach Durchführung der multivariaten Analyse mit den beiden hochsignifikanten Variablen T-Stadium und Grading zeigte sich, dass beide unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben sind (Regressionskoeffizient $< 0,05$).

Zusammenfassung der Ergebnisse:

1. eNOS-Expression ließ sich in Endothel- und Tumorzellen nachweisen.
2. T-Stadium und Grading sind in diesem Kollektiv hoch signifikante Prognosefaktoren für Gesamt- und krankheitsfreies Überleben. Lymphknoten- und Hormonrezeptorstatus waren signifikante Prognosefaktoren für beide Überlebenszeiten, Alter und Menopausenstatus waren in diesem Kollektiv keine Prognosefaktoren.
3. Zwischen der eNOS-Expression und dem Hormonrezeptorstatus bestand eine signifikante negative Korrelation. Hormonrezeptornegative Tumore waren häufiger eNOS-positiv.
4. Prämenopausale Patientinnen und diejenigen, welche in der ersten Zyklushälfte operiert worden waren, hatten signifikant häufiger eNOS-positive Tumore.
5. Die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patientinnen mit eNOS-positiven Tumoren war geringer als für solche mit eNOS-negativen Tumoren. Dennoch konnte kein signifikanter Einfluss von eNOS auf das Überleben nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

Seit Thomsen und ihre Mitarbeiter 1995 zeigen konnten, dass NO-Synthasen in Brustkrebs exprimiert werden [Thomsen et al 1995], besteht großes Interesse an der Rolle von NO in der Karzinogenese. Die Aufklärung der genauen pathophysiologischen Aufgaben von NO beim Mammakarzinom ist bis heute nicht gelungen. Dies liegt an der unzureichenden Größe der bisher untersuchten Kollektive und an der Heterogenität von Brustkrebs.

Ob eNOS eine entscheidende Rolle bei der Progression von Brustkrebs spielt, ist nach wie vor ungeklärt. Studien zeigten, dass sowohl am Endothel wirkende Scherkräfte (shear stress) [Nishida et al 1992] als auch die hormonalen Veränderungen einer Schwangerschaft die eNOS-Aktivität steigern [Weiner et al 1994]. Es ist bekannt, dass in Endothelzellen des Herz-Kreislaufsystems die eNOS-Aktivität durch Östrogen reguliert wird [MacRitchie et al 1997]. Beim Mammakarzinom dagegen ist eNOS sowohl in intratumoralen Endothelzellen als auch in Tumorzellen vorhanden [Loibl et al 2002; Tschugguel et al 1996; Zeillinger et al 1996; Vakkala et al 2000]. Da Brustkrebs eine hormonabhängige Erkrankung darstellt, könnte die eNOS-Expression von der endokrinen Umgebung des Tumors abhängen.

4.1 Patientinnen

In der vorliegenden Studie wurden 163 Patientinnen mit der Diagnose eines Mammakarzinoms ausgewählt. Zur Erhebung der klinischen Daten wurden die histopathologischen Berichte und die entsprechenden Patientenakten ausgewertet. Zu den Einzelheiten hierfür siehe Kapitel 2.1. Mit dieser Arbeit wurde zum ersten Mal an einem Kollektiv dieser Größe der Einfluss der endothelialen NO-Synthase auf die Prognose des Mammakarzinoms untersucht.

Tabelle 14 verdeutlicht die Größe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fallzahl (163), verglichen mit anderen Studien über NOS-Expression beim Mammakarzinom.

Tabelle 14: Vergleichbare Studien und deren Fallzahl

Autoren	Jahr	Fallzahl	Thema der Studie
Reveneau et al	1999	40	NOS in humanem Mammakarzinom ist assoziiert mit Tumorgrad, Proliferationsrate und PR-Expression.
Martin et al	2000	71	eNOS-Expression korreliert mit Grading, Lymphknotenstatus und ER-Expression beim Mammakarzinom.
Tschugguel et al	1999	80	Beim Mammakarzinom ist die iNOS-Expression abhängig vom Tumorgrad
Vakkala et al	2000	80	eNOS-Expression ist mit dem Östrogen- und Progesteronstatus in invasiven Mammakarzinomen assoziiert.
Mortensen et al	1999	118	ecNOS in peritumoralen Gefäßen ist ein günstiger Prognosefaktor bei prämenopausalen Brustkrebspatientinnen.

Von den 163 Patientinnen unserer Untersuchung befanden sich zum Zeitpunkt der Erkrankung 99 in der Post- und 62 in der Prämenopause (3 unbekannte Angaben). Diese Verteilung steht im Einklang mit den publizierten Daten des Statistischen Bundesamtes, da ein Großteil der Mammakarzinome erst bei Frauen in der Postmenopause entsteht [Statistisches Bundesamt 1992].

Die Anzahl der für das Mammakarzinom untersuchten Prognosefaktoren nimmt stetig zu und ist inzwischen zahlreich, sodass es nicht sinnvoll erscheint, alle Prognosefaktoren in einer Arbeit zu untersuchen. Daher wurden für diese Arbeit die klinisch relevanten und als etabliert angesehenen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms [Goldhirsch et al 2003] ausgewählt. Dazu zählen:

- Tumorgröße
- Tumorgrading
- Alter/Menopausenstatus
- Hormonrezeptorstatus
- Nodalstatus

Um zu zeigen, dass es sich in der vorliegenden Studie um ein repräsentatives Patientengut handelt, wurden die o.g. Parameter auf ihre prognostische Signifikanz hin überprüft (Einzelheiten siehe Kapitel 3.5). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Grundvoraussetzungen und Anforderungen an das untersuchte Patientinnen- und Tumorkollektiv sicher erfüllt wurden [Harris 1992; Harris 1992a].

4.2 Methodische Aspekte

Das eNOS-Protein kann immunohistochemisch im Tumorgewebe [Mortensen et al 1999; Vakkala et al 2000; Martin et al 2000; Loibl et al 2002], seine mRNA durch cRT-PCR [Zeillinger et al 1996] sowie Northern-Blot-Analyse [Teng et al 1998] nachgewiesen werden. Der immunohistochemischen Darstellung werden eine Reihe von Vorteilen zugesprochen:

- im Vorgehen reproduzierbar,
- rasch und einfach auch an kleinen Tumorproben durchführbar,
- gängige Methode,
- die Schnitte können mittels Lichtmikroskops wiederholt inspiziert werden,
- Erhalt der Ergebnisse am Tag der Untersuchung.

Des Weiteren besteht ein großer Vorteil der Methode darin, dass Normalzellen von Tumorzellen unterschieden, deren morphologische Kriterien im Gefüge ihres umgebenden Gewebes beurteilt werden können [Li et al 1987]. Damit war eine wesentliche Voraussetzung erfüllt, eNOS sicher lokalisieren zu können.

Ein Nachteil liegt darin, dass durch technische Probleme, vor allem bei in Paraffin eingebettetem Gewebe, die immunhistochemische Färbung bedeutsam verändert werden kann. Durch Fixation und Gewebeaufbereitungsverfahren wird ein großer Teil der Oberflächenantigene zerstört und so könnte fälschlicherweise weniger eNOS nachgewiesen werden als tatsächlich exprimiert wurde. In anderen Untersuchungen fanden sich abhängig von der Fixation der Zellen, unterschiedliche Färbemuster [Penault-Llorca et al 1994]. Studien über die verschiedenen, im Handel erhältlichen Antikörper, zeigten ebenfalls eine weite Vielfalt an Sensitivität und Spezifität bei Verwendung an fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe [Busmanis et al 1994; Press et al 1994].

Diesen Nachteil sollte das Färbeverfahren nach der APAAP-Technik ausgleichen, da hierbei die Verwendung unkonjugierter Antikörper eine größere Empfindlichkeit und demzufolge eine stärkere Anfärbung erzielt. Damit wird der Antigenverlust kompensiert und auch eine Anwendung mit paraffiniertem Gewebe führt zu qualitativ guten und verlässlichen Ergebnissen [Bourne 1983, S. 12-13].

Für den Nachweis der eNOS-Expression in Mammakarzinomen haben wir eine der gebräuchlichsten immunhistochemischen Methoden, die APAAP-Technik, angewendet. Diese Methode besitzt eine hohe Nachweisempfindlichkeit [Cordell et al 1984] und wird für das immunhistochemische Untersuchen von Gewebeproben empfohlen [Li et al 1987]. Grundsätzlich steht zur Lokalisierung von Antigenen eine Vielzahl immunenzymatischer Färbetechniken zur Verfügung. Die am häufigsten durchgeführten sind Immunperoxidase-Färbemethoden, von denen es vier Varianten gibt: die direkte Methode, die indirekte Methode, die Avidin-Biotin-(Avidin-Biotin-Complex=ABC-)Methode, die PAP- oder die hier zur Anwendung gebrachte APAAP-Methode [Boenisch 1989, S. 22-23]. Der große Vorteil von APAAP gegenüber der PAP-Färbung ist der Wegfall der störenden endogenen Peroxidase-Aktivität, erzielt durch den Zusatz von Levamisole (Einzelheiten siehe Kapitel 2.2.2.2) [Ponder und Wilkinson 1981].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet. Die beiden wichtigsten Vorteile eines monoklonalen Antikörpers im Vergleich zu einem polyklonalen sind eine starke Homogenität und die Abwesenheit unspezifischer Antikörper [Boenisch 1989, S.10-12].

Die Einführung der Immunhistochemie hat für die Klassifikation, Zytogenese und prognostische Beurteilung menschlicher Tumore bisher große Fortschritte mit klinischer Relevanz gebracht [Daugaard 2004; de Jong et al 2004]. Durch monoklonale und polyklonale Antikörper können Gefäße, Rezeptoren, Bindungsstellen, Onkogene und Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Die Immunhistochemie stellt somit eine Möglichkeit zur optimalen Behandlung von Tumoren dar.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Nachweis von NOS in Tumoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei Mammakarzinomen mit einem Antikörper gegen eNOS immunhistochemisch die eNOS-Expression untersucht. Ziel hierbei war, diese in bestimmten Strukturen des Mammakarzinomgewebes nachzuweisen, um dann von der Lokalisation eine mögliche Rolle von eNOS in der Karzinogenese von Brustkrebs ableiten zu können. Die Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass alle drei NOS-Isoformen (eNOS, iNOS, nNOS) für die tumorfördernden/-hemmenden Effekte von NO verantwortlich sein könnten [Xu et al 2002]. Sie wurden bisher in mehreren humanen Tumoren nachgewiesen, welche die nachfolgende Tabelle zeigt.

Tabelle 15: Auswahl von Arbeiten über maligne Tumore in denen NOS nachgewiesen wurde

Autoren	Jahr	Tumor	NOS-Isoform
Thomsen et al	1994	Ovar und Uterus	NOS-Aktivität
Thomsen et al	1995	Brust	eNOS/iNOS
Cobbs et al	1995	ZNS	eNOS/nNOS
Zeillinger et al	1996	Brust	eNOS
Liu et al	1998	Lunge	iNOS
Gallo et al	1998	Kopf-/Hals	iNOS
Klotz et al	1998	Prostata	iNOS
Hajri et al	1998	Pankreas	iNOS
Ambs et al	1998	Colon	iNOS
Weninger et al	1998	Kaposi Sarkom	iNOS
Wilson et al	1998	Ösophagus	iNOS
Goto et al	1999	Magen	iNOS
Klotz et al	1999	Harnblase	eNOS/iNOS
Tschugguel et al	1999	Melanom	iNOS
Reveneau et al	1999	Brust	iNOS
Tschugguel et al	1999	Brust	eNOS/iNOS
Mortensen et al	1999	Brust	eNOS
Martin et al	2000	Brust	eNOS
Vakkala et al	2000	Brust	eNOS
Loibl et al	2002	Brust	eNOS/iNOS
Raspollini et al	2004	Ovar	iNOS
Adithi et al	2005	Retinoblastom	eNOS/iNOS
Li et al	2005	Endometrium	iNOS

In unserer Studie konnte die eNOS-Expression sowohl in Endothelzellen als auch im Zytoplasma von Tumorzellen lokalisiert werden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass eNOS an der Regulation der NO-Synthese in malignen Brusttumoren beteiligt ist.

Neben den eigenen Untersuchungen wurde in verschiedenen Studien anderer Autoren ebenfalls die Expression von eNOS im Mammakarzinom untersucht. Die Resultate der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien [Mortensen et al 1999; Martin et al 2000; Loibl et al 2002], während die Arbeitsgruppen um Thomsen [1995] und Tschugguel [1996] NOS-Expression in Endothelzellen, aber nicht in Tumorzellen nachweisen konnten.

Tabelle 16 fasst die eben erwähnten Arbeiten über die eNOS-Expression bei Mammakarzinomen zusammen.

Tabelle 16: Immunhistochemischer Nachweis von eNOS im Mammakarzinomgewebe

Autoren	Jahr	Material	IHC-Methode	Lokalisation von eNOS
Thomsen et al	1995	Gefrierschnitte	ABC	Endothelzellen
Tschugguel et al	1996	Gefrierschnitte	ABC	Endothelzellen
Mortensen et al	1999	Paraffinschnitte	ABC	Endothelzellen, Tumorzellen
Martin et al	2000	Paraffinschnitte	PAP	Endothelzellen, Tumorzellen
Loibl et al	2002	Paraffinschnitte	APAAP	Endothelzellen, Tumorzellen

Die Gegenüberstellung dieser Studien verdeutlicht, dass eine Expression von eNOS ausnahmslos in Endothelzellen lokalisiert werden konnte, aber nicht immer in Tumorzellen. Alle oben genannten Arbeiten wendeten die Immunhistochemie (IHC) als Nachweismethode an, welche die eNOS-Expression in Endothel- und Tumorzellen getrennt erfassen lässt [Li et al 1987]. Demnach ist ein Grund für die voneinander abweichenden Ergebnisse bezüglich der Lokalisation von eNOS möglicherweise in den verschiedenen Materialien (Gefrier-/Paraffinschnitte) und unterschiedlichen Färbetechniken der IHC (ABC-, PAP- und APAAP-Methode)

zu finden. Einzelheiten zu Färbemethoden der IHC siehe Abschnitt über die methodischen Aspekte.

Bei der weitergehenden lichtmikroskopischen Betrachtung der angefärbten Tumore fiel eine makrophagozytäre Infiltration auf, deren funktionelle Bedeutung in Mammakarzinomen ein komplexes Phänomen darstellt. Einerseits besitzen Makrophagen eine tumorizide Aktivität [van Ravenswaay-Claasen et al 1992], andererseits stimulieren diese die Produktion von Angiogenese- und Wachstumsfaktoren, wodurch sie die Tumorausbreitung wesentlich begünstigen [Visscher et al 1995].

Der Nachweis von eNOS-Protein und -Aktivität in humanen Makrophagen läßt eine immunmodulatorische Rolle dieses Enzyms vermuten. Am ehesten könnte es sich hierbei um einen pro-inflammatorischen Parameter handeln [Muhl und Pfeilschifter 2003]. Demnach kann vom tumorbiologischen Standpunkt eher eine kooperative Aktivität zwischen Tumorzellen und Makrophagen als eine kontraproduktive Wirkung beider Komponenten angenommen werden [Visscher et al 1995].

Darüber hinaus läßt auch die in dieser Arbeit beobachtete Expression von eNOS in Endothelzellen auf eine Bedeutung dieses Enzyms bei der Karzinogenese schließen. Es ist bekannt, dass Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese spielen, welche wiederum für Tumorwachstum und Metastasierung verantwortlich ist [Folkman und Shing 1992]. Demzufolge könnte eNOS ein entscheidender Mediator der in vivo Angiogenese sein und gleichzeitig die Tumorprogression fördern. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse aus Tier- und Zellkulturmodellen unterstützt [Lala und Orucevic 1998; Orucevic et al 1999].

Bei der histomorphologischen Beurteilung der Tumorpräparate konnte eine Verstärkung des Färbemusters für eNOS an der Invasionsfront der Karzinome beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der biologischen Eigenschaft von eNOS, die Angiogenese zu fördern [Murohara et al 1998], könnte diese Beobachtung als morphologisch sichtbare Manifestation der wachstumsfördernden Wirkung verstanden werden.

Der Befund einer erhöhten eNOS-Expression sowohl in Endothelzellen als auch in Tumorzellen an der Invasionsfront der Tumoren, unterstützt die Annahme einer engen Beziehung dieses Enzyms zur Metastasierungspotenz des Tumors.

4.3.2 Korrelationen zwischen eNOS-Expression und den Prognosefaktoren

Das Mammakarzinom zählt zu den hormonabhängigen Tumoren. Hormonale therapeutische Maßnahmen, wie die Tamoxifen-Therapie, sind seit längerer Zeit mit gutem klinischem Erfolg in der Behandlung von Brustkrebs-Patientinnen etabliert [Jaiyesimi et al 1995; Jordan und Morrow 1999; Gelber et al 1996]. Die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus gehört heute zu den wichtigsten Kriterien für Prognose und Therapie beim Mammakarzinom [Scharl et al 1989]. Ein positiver Hormonrezeptorstatus ist mit einer günstigen Prognose, sowohl hinsichtlich der Überlebenszeit [Costa et al 2002; Hess et al 2003] als auch des Ansprechens auf eine hormonelle adjuvante Therapie, assoziiert [Jonat et al 1994]. Diese bekannte biologische und klinische Wichtigkeit von Östrogenrezeptoren in maligne entartetem Brustdrüsengewebe hat zu einem wachsenden Interesse an Östrogen-regulierten Proteinen geführt. Es ist bekannt, dass Östrogen die eNOS-Expression aktiviert [Simoncini et al 2000; Hishikawa et al 1995; Shaul 1999; MacRitchie et al 1997].

Aufgrund des eben genannten Zusammenhangs erwarteten wir Korrelationen zwischen eNOS und den durch Hormone beeinflussten Parametern. Zu diesen gehören das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Diagnose, der Menopausen- und der Hormonrezeptorstatus. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse stimmen teilweise mit den erwarteten überein.

Bei der Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen eNOS und dem **Alter der Patientinnen** konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen. Bisher ist eine mögliche Beziehung dieser beiden Faktoren selten untersucht worden, das Ergebnis der vorliegenden Studie wird durch das einer weiteren Arbeit unterstützt [Mortensen et al 1999]. Dagegen beobachteten andere Untersuchungen, dass jüngere Patientinnen (< 50 Jahre) signifikant häufiger eNOS-positive Tumorzellen als ältere Patientinnen (\geq 50 Jahre) besaßen [Loibl et al 2002]. Allerdings war das Kollektiv der zuletzt erwähnten Arbeit wesentlich kleiner (n = 54) als das der vorliegenden, welches die Signifikanz des Ergebnisses fraglich macht. Bezüglich der Verteilung des Alters war das Kollektiv der gegenwärtigen Arbeit repräsentativ. Als Kriterium hierfür gilt, dass 2 Prozent der Patientinnen < 35 Jahre alt sind, welches für fünf von 163 Patientinnen (3,2 %) zutrifft und damit innerhalb der Vorgaben liegt. Ein Mangel an Repräsentativität ist

demzufolge nicht für die Differenz zu dem erwarteten Ergebnis verantwortlich. Möglicherweise war die Größe des verwendeten Kollektives trotz der 163 partizipierenden Patientinnen nicht groß genug, um einen vielleicht vorhandenen Zusammenhang aufzudecken.

Zwischen eNOS-Expression und dem **Menopausenstatus** der Patientinnen konnte eine signifikante Korrelation hergestellt werden, prämenopausale Patientinnen hatten häufiger eNOS-positive Tumore. Dieser Befund wurde bislang in der Literatur nicht aufgegriffen, allerdings existieren Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Menopausen- und Hormonrezeptorstatus. Prämenopausale Frauen haben eher einen negativen Rezeptorstatus als postmenopausale Frauen [Colditz et al 2004]. Diese Beobachtung wird durch Ergebnisse gestützt, bei denen mit dem Alter die Proliferationsrate von östrogenrezeptor-positiven Zellen zunimmt [Tarone und Chu 2002]. Dieser Zusammenhang ist wiederum passend zu einem weiteren Ergebnis der vorliegenden Arbeit, wobei rezeptornegative Tumore häufiger eNOS-positiv sind (vgl. folgenden Abschnitt über eNOS und Hormonrezeptorstatus). Folglich sind prämenopausale Patientinnen eher rezeptornegativ und beide Variablen einzeln betrachtet gehen mit erhöhter eNOS-Expression einher.

Darüber hinaus zeigen Untersuchungen über den Menstruationszyklus, dass prämenopausale Mammakarzinompatientinnen, welche während der folliculären Phase operiert worden waren, ein schlechteres Gesamtüberleben hatten [Fentiman 2002; von Minckwitz et al 1994]. In der vorliegenden Arbeit waren die Tumore der Patientinnen, welche ihren operativen Eingriff während der folliculären Phase hatten, ebenfalls eher eNOS-positiv (vgl. Kreuztabelle im Anhang ab Seite 99).

Zusammenfassend geht ein erhöhter Östrogenspiegel im Serum mit einer erhöhten eNOS-Expression einher und bei eNOS könnte es sich um einen tumorfördernden Faktor handeln.

Hinsichtlich der Beziehung zwischen eNOS und dem **Hormonrezeptorstatus** konnten wir eine signifikante negative Korrelation aufzeigen. Rezeptornegative Tumore waren signifikant häufiger eNOS-positiv als rezeptorpositive Tumore. In der Literatur wird eine Beziehung im Allgemeinen zwischen eNOS und Hormonrezeptorstatus bestätigt [Mortensen et al 1999; Vakkala et al 2000; Martin et al 2000]. Allerdings fanden einige Arbeitsgruppen bei hormonrezeptorpositiven

Tumoren eine signifikant häufigere eNOS-Expression [Vakkala et al 2000; Martin et al 2000]. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Resultate könnten die bei den anderen Studien verwendeten, deutlich niedrigeren, Fallzahlen sein (vgl. hierzu Tabelle 15). Hierdurch verringert sich die Aussagekraft der zitierten Studienergebnisse. Die Diskrepanzen könnten aber auch auf die unterschiedliche Zusammensetzung der untersuchten Stichproben zurückzuführen sein. Bei unserer Studie haben wir sehr strenge Ein- und Ausschlusskriterien definiert (Einzelheiten hierzu siehe Kap 2.1). Derartige wurden nicht in den zur Gegenüberstellung herangezogenen Arbeiten erwähnt, eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist demzufolge nur eingeschränkt zulässig.

Des Weiteren mussten in unseren Untersuchungen die Tumore entweder Östrogen- oder Progesteronrezeptoren exprimieren um als hormonrezeptorpositiv zu gelten. Diese Vorgehensweise ist durchaus angebracht und spiegelt den klinischen Nutzen des Rezeptorstatus wider. Auch hierzu findet sich keine Erläuterung in den herangezogenen Studien.

Die Aufteilung der hormonrezeptorpositiven Tumore in die Subgruppen östrogen- oder progesteronrezeptorpositiv ergab keine signifikanten Korrelationen mit der Expression von eNOS. Bezüglich des **Progesteronrezeptors** ließ sich aber die Tendenz einer Beziehung zur eNOS-Expression erkennen ($p = 0,079$). Das Ergebnis steht prinzipiell mit dem des Hormonrezeptorstatus in Einklang: Progesteronrezeptornegative Tumoren waren häufiger eNOS-positiv. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Vakkala unterstützen einen Zusammenhang zwischen der eNOS-Expression und dem Progesteronrezeptor. Aber ähnlich wie bei ihren Untersuchungen mit dem Östrogenrezeptor handelt es sich hierbei um eine positive Korrelation und widerspricht somit unseren Befunden [Vakkala et al 2000]. Mögliche Erklärungen hierfür entsprechen den beim Hormonrezeptor erwähnten, kleineres Kollektiv und mögliche Inkongruenz der Stichproben.

Zusammenfassend machen diese Ergebnisse deutlich, dass **eNOS, Hormonhaushalt und Brustkrebs in einer Beziehung zueinander stehen.**

Tabelle 17: eNOS-Expression und Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom

Autor	Jahr	Anzahl	Korrelation von eNOS mit Hormonrezeptoren
Mortensen et al	1999	113	eNOS-Expression in peritumoralen Gefäßen korreliert positiv mit PR
Vakkala et al	2000	80	Positive Korrelation mit ER und PR
Martin et al	2000	80	Positive Korrelation mit ER

Die Assoziation zwischen eNOS-Expression und Hormonrezeptorstatus der Tumore weist darauf hin, dass diese durch die hormonalen Rezeptoren reguliert werden könnte. Ergebnisse von Versuchen mit Brustkrebszelllinien unterstützen diese These [Martin et al 1999; Zeillinger et al 1996]. Es ist bekannt, dass Östrogen/Östradiol die Expression von eNOS stimuliert [Hayashi et al 1995; Ziche et al 1997; Cautin-Glaser et al 1997] und die Permeabilität von Endothelzellen moduliert [Cho et al 1999]. Untersuchungen mit den ER-Antagonisten Tamoxifen und ICI 162,780 zeigten, dass dieser Effekt über ein ER-vermitteltes System erfolgen könnte [Chen et al 1999; Hayashi et al 1995].

Vor dem Hintergrund, dass die Expression von eNOS östrogen-induziert erfolgt und von einem funktionell aktiven ER abhängig ist, erscheinen die bei der vorliegenden Studie erhaltenen Befunde vorerst ungewöhnlich. Demnach würde man eine Expression von eNOS in ER-negativen Karzinomen nicht erwarten. Folgende Hypothese soll zur Klärung dieses Sachverhaltes beitragen. Die molekularen Mechanismen, durch welche Östrogen die eNOS-Expression stimuliert, sind vielfältig und geschehen primär auf Transkriptionsebene [Chambliss und Shaul 2002]. Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht einige dieser Mechanismen, von denen manche noch nicht vollständig verstanden oder bekannt sind. Diese sind in der Darstellung mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

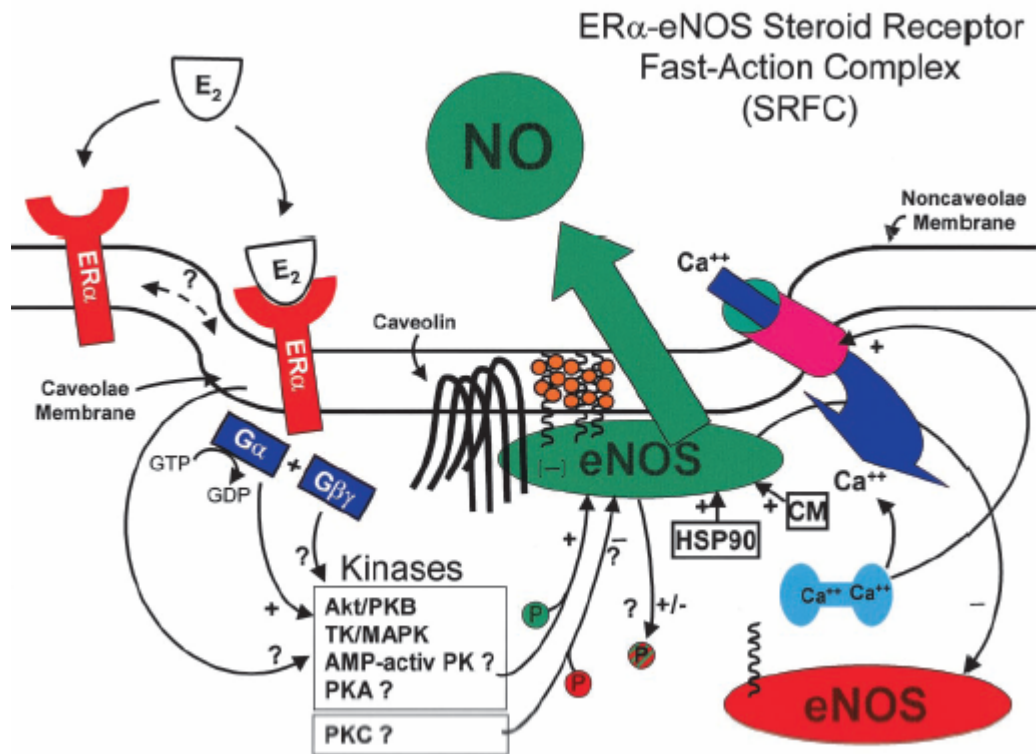


Abbildung 35: Östrogen-induzierte Aktivierung von eNOS (Quelle: Chambliss und Shaul 2002, Seite 682)

Dieser komplexe Signaltransduktionsmechanismus wird am ehesten durch ER vermittelt [Chambliss und Shaul 2002], es kommen aber auch andere Abläufe in Frage. Erste Daten deuten darauf hin, dass die östrogen-induzierte eNOS-Expression durch rezeptorunabhängige Mechanismen induziert wird. Untersuchungen an ER-defizienten Mäusen wiesen trotz des mangelhaften ER Effekte des Östrogens nach [Iafrati et al 1997; Karas et al 1999].

Für die Konstellation hormonrezeptornegativ/eNOS-positiv (Ergebnis der vorliegenden Studie, vgl. entsprechenden Abschnitt) ist möglicherweise eine variable Aktivität aufgrund einer geringfügig veränderten strukturellen Beschaffenheit des Rezeptors verantwortlich, welche nicht aufgedeckt werden kann und so zu einem phänotypisch negativen Hormonrezeptor führt. Andere mögliche Erklärungen wären entweder ein bis heute noch nicht beschriebener Hormonrezeptor-unabhängiger Regulationsmechanismus der östrogen-induzierten eNOS-Expression, oder dass die Steigerung der eNOS-Expression auch unabhängig von Östrogen ablaufen kann. Diese vielfältigen Erklärungsansätze verdeutlichen, wie differenziert und komplex Interaktionen zwischen Faktoren wie eNOS und den Hormonrezeptoren ablaufen können. Viele Fragen hinsichtlich

dieser Wechselbeziehung bleiben ungeklärt und müssen durch weitere Studien eruiert werden.

Die Korrelation von eNOS und hormon-unabhängigen Prognosefaktoren (Tumorgröße, -differenzierung und Lymphknotenstatus) erreichte in keinem Fall statistische Signifikanz. Dennoch ließen sich einige interessante Aspekte und Zusammenhänge herstellen.

Zwischen der **Tumorgröße** und der eNOS-Expression fanden wir keinen nennenswerten Zusammenhang. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten [Mortensen et al 1999; Martin et al 2000; Vakkala et al 2000; Loibl et al 2002].

Auch wenn wir keine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein von eNOS und der **Differenzierung der Tumore** zeigen konnten, so ließ sich dennoch eine stärkere eNOS-Expression in gering differenzierten Tumoren beobachten. Diese Tendenz unterstützen die Ergebnisse einer weiteren Arbeitsgruppe [Thomsen et al 1995], während andere in gut differenzierten Tumoren die stärkere eNOS-Expression vorfanden [Martin et al 2000; Loibl et al 2002]. In anderen Untersuchungen wiederum [Vakkala et al 2000; Mortensen et al 1999] ließ sich keine Beziehung zwischen eNOS und dem Tumorgrad herstellen.

Vom tumorbiologischen Verhalten gesehen würde man eher eine negative Korrelation zwischen eNOS-Expression und Tumorgrad erwarten, da in gut differenzierten Tumoren die funktionelle Integrität von biochemischen Synthesemechanismen erhalten ist [Nakopoulou et al 1995]. Andererseits könnte ein Überwiegen der ebenfalls bekannten tumorfördernden Eigenschaften von NO [Andrade et al 1992] den positiven Zusammenhang von NO-Biosynthese und Differenzierungsgrad erklären, welche in der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte.

Ein weiterer möglicher Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte die unterschiedliche Verteilung der Differenzierungsgrade innerhalb der untersuchten Kollektive sein.

Die Untersuchung einer möglichen Beziehung zwischen eNOS und dem **Lymphknotenstatus** ergab kein signifikantes Ergebnis. Wir beobachteten jedoch, dass Tumore, bei denen ein Befall der Lymphknoten vorlag, tendenziell häufiger eNOS-positiv waren. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung konnte eine weitere

Arbeitsgruppe eine signifikante negative Korrelation nachweisen [Martin et al 2000], während Ergebnisse anderer Studien keinen Zusammenhang dieser beiden Faktoren vorfanden [Mortensen et al 1999; Vakkala et al 2000]. Es ist bekannt, dass ein Befall der Lymphknoten zum Zeitpunkt der Diagnose mit einer schlechteren Prognose einhergeht [Clark 1995]. Ausgehend von der weiter oben erwähnten tumorbiologischen Hypothese, eNOS fördere möglicherweise eine Tumorprogression, unterstützen die hier gemachten Beobachtungen (stärkere eNOS-Expression bei Lymphknotenbefall) diese Theorie. Eine mögliche Ursache für die erhebliche Diskrepanz der Ergebnisse der erwähnten Arbeiten könnte die Verwendung von zu heterogenen, kleinen Kollektiven sein. Ferner könnten diese widersprüchlichen Ergebnisse reflektieren, dass eNOS keine weitergehende prognostische Aussagekraft über die des Lymphknotenstatus hinaus liefert.

Tabelle 18: Korrelationen von eNOS-Expression mit hormonunabhängigen Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Autor	Jahr	Anzahl	Korrelationen der eNOS-Expression mit den Prognosefaktoren		
			T-Stadium	Grading	Lk-status
Thomsen et al	1995	15	Nicht untersucht	Positiv	Nicht untersucht
Mortensen et al	1999	118	Keine	Keine	Keine
Vakkala et al	2000	80	Keine	Keine	keine
Martin et al	2000	80	Keine	Negativ	negativ
Loibl et al	2002	54	Keine	Negativ	Negativ (Trend)

4.3.3 Überlebensanalyse der Prognosefaktoren – spielt eNOS eine Rolle ?

Die **Tumorgröße** hatte einen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patientinnen. Mit steigender Tumorgröße nahm die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung zu, das Gesamtüberleben und die rezidivfreie Zeit dagegen ab. Diese Korrelation konnte auch von anderen Untersuchern festgestellt werden [McGuire und Clark 1992; Crowe et al 1992; Carter et al 1989]. Der Zusammenhang mit dem wichtigsten Prognosefaktor beim Mammakarzinom, dem Lymphknotenstatus, stützt dieses Ergebnis. Hierbei kam es bei größeren Tumoren signifikant häufiger zu einem Befall der Lymphknoten als dies bei kleineren

Tumoren zutraf (vgl. entsprechende Tabelle im Anhang ab Seite 99). Diese Beobachtung bestätigte eine andere Arbeit [Shetty und Reiman 1997].

In unserer Studie zeigte sich das **Tumorgrading** als signifikanter Prognoseparameter. In der Analyse verdeutlichte sich, dass die Patientinnen mit einem niedrigen Grading eine bessere Prognose hatten. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien [Hopton et al 1989; Fisher 1986].

Entgegen unseren Erwartungen beobachteten wir keinen Einfluss des **Alters** der Patientinnen auf das Überleben. Im Gegensatz dazu wird in einigen Studien das Alter als ein unabhängiger, signifikanter Prognosefaktor beschrieben. In diesen haben jüngere Patientinnen ein signifikant kürzeres Überleben [Grosclaude et al 2001; Dubsy et al 2002]. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte an der Größe des Kollektives liegen. Möglicherweise reichten 163 Patientinnen nicht aus, um vorhandene kleine Zusammenhänge aufzudecken.

Ein positiver **Hormonrezeptorstatus** (Östrogen und/oder Progesteron) ging mit einem signifikant längeren Überleben einher. Dieser Zusammenhang konnte in der Literatur mehrfach bestätigt werden [Grann et al 2005; Costa et al 2002; Clark 1994; Clark 1995]. Die genauere Analyse nach Progesteron- und Östrogengehalt ergab, dass sich für das untersuchte Kollektiv nur der Östrogenrezeptorstatus als Prognosefaktor eignete.

Seitdem der Östrogenrezeptorstatus 1977 in der Literatur zum ersten Mal als unabhängiger Prognosefaktor erwähnt wurde [Knight et al 1977], ist eine große Anzahl an Publikationen dazu erschienen. Die prognostische Bedeutung des Hormonrezeptorstatus (Progesteron und Östrogen) wird in diesen Publikationen kontrovers diskutiert, sein prädiktiver Wert für eine endokrine Therapie ist allerdings unbestritten.

Der Hormonrezeptorstatus, welcher zum Zeitpunkt der Operation ermittelt wird, kann mit zunehmendem rezidivfreien Intervall an Bedeutung verlieren [Gebauer et al 2002]. Somit besitzt dieser für Patientinnen kurz nach Diagnosestellung eine prognostisch größere Aussagekraft, als es mehrere Jahre später der Fall ist [Hess et al 2003; Costa et al 2002]. Andererseits kann die Bedeutung des Hormonrezeptorstatus um ein Vielfaches zunehmen, wenn weitere Prognosefaktoren berücksichtigt werden [Millis 1980; Collett et al 1996].

In unserer Studie stellte sich der **Lymphknotenstatus** als signifikanter Prognosefaktor heraus. In der Literatur findet sich die Bestätigung unserer Beobachtungen. Nach wie vor gilt der Lymphknotenstatus als wichtigster Prognosefaktor für Patientinnen mit Mammakarzinom [Kaufmann et al 2004; Clark 1995] und ist einer der bedeutungsvollsten Parameter für die sich anschließende Therapie [Rack et al 2003].

Das untersuchte Patientenkollektiv wurde zudem in Subgruppen aufgeteilt (1 bis 3, 4 bis 9 und mehr als 9 befallene Lymphknoten). Hierbei zeigte sich, dass eine zunehmende Anzahl der befallenen Lymphknoten die Prognose der Patientinnen verschlechtert. Sowohl das Gesamtüberleben als auch das Intervall bis zum Auftreten von Metastasen waren verkürzt. Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein [Fisher et al 1983; Saez et al 1989].

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der hormonellen Umgebung und deren Einfluß auf die Prognose beim Mammakarzinom lag, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen **Menopausenstatus** und dem Überleben untersucht. Da prämenopausale Frauen eher einen negativen Hormonrezeptorstatus [Colditz et al 2004; vgl. entsprechende Kreuztabelle im Anhang ab Seite 99] und rezeptornegative Patientinnen eine schlechtere Prognose haben (vgl. Abschnitt über Hormonrezeptorstatus), erwarteten wir eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit für prämenopausale Patientinnen. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine Auswirkung des Menopausenstatus auf das Überleben der Patientinnen. Dagegen beobachtete eine andere Studie den von uns erwarteten Zusammenhang [Chang et al 2000]. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben des erwarteten Ergebnisses ist, dass eine zu kleine Kollektivgröße bestehende Zusammenhänge verdeckt haben könnte.

Zusätzlich zu möglichen Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern untersuchten wir mit Hilfe der uni- und multivariaten Überlebensanalyse die prognostische Relevanz einer eNOS-Expression für das rezidivfreie **Überleben** und das Gesamtüberleben. In diesen Analysen erwies sich eNOS nicht als unabhängiger Prognosefaktor, dennoch war ein deutlicher Trend erkennbar. In den Überlebenskurven nach Kaplan-Meier zeigte sich, dass bei Patientinnen mit eNOS-positiven Tumoren ein kürzeres Gesamtüberleben abzusehen war ($p = 0,07$). Der Einfluss von eNOS auf das Überleben beim Mammakarzinom ist

bisher selten untersucht worden. Während einige Studien keine Auswirkung von eNOS-Expression in Mammakarzinomzellen auf das Überleben feststellen konnten [Vakkala et al 2000; Mortensen et al 1999], fanden Mortensen und ihre Mitarbeiter in weiter gehenden Untersuchungen einen signifikanten Einfluss von eNOS-Expression in peritumoralen Gefäßen auf das krankheitsfreie Überleben und Gesamtüberleben von als prämenopausal eingestuften Patientinnen. Allerdings galt dies weder für die eNOS-Expression in Tumorzellen und intratumoralen Gefäßen, noch hatte die eNOS-Expression eine Auswirkung auf das Überleben postmenopausaler Patientinnen [Mortensen et al 1999]. Die fehlende Signifikanz des Ergebnisses der vorliegenden Arbeit könnte durch zu niedrige Fallzahlen und eine zu kurze Beobachtungszeit bedingt sein. Möglicherweise könnte ein signifikanter Zusammenhang bei entsprechender Ausweitung dieser beiden Größen, in sich anschließenden Studien, aufgedeckt werden.

Im Gegensatz zur eNOS-Expression fanden Studien einen signifikanten Einfluß der iNOS-Expression auf die Überlebenschancen. In einer korrespondierenden Untersuchung stellte sich diese NOS-Isoform als unabhängiger Prognosefaktor für das Überleben der Patientinnen heraus [Loibl et al 2005].

Die beobachtete Tendenz der kürzeren Überlebensdauer bei eNOS-positiven Tumoren, steht im Einklang mit den meisten der eigenen und bisher diskutierten Ergebnisse (stärkere eNOS-Expression bei rezeptornegativen, schlecht differenzierten Tumoren und solchen mit positivem Lymphknotenstatus; vgl. entsprechende Abschnitte). Es ist bekannt, dass die drei eben genannten Prognosefaktoren, Rezeptor-, Lymphknotenstatus und Grading der Tumore, mit einer schlechten Überlebenschancen einhergehen [Clark 1995; Saez et al 1989]. Demzufolge deuten die Ergebnisse dieser Studie in ihrer Gesamtheit daraufhin, eNOS könnte ein tumorfördernder Parameter sein. Als unabhängiger Prognosefaktor ist eNOS damit nicht geeignet, das Enzym kann jedoch als Differenzierungsmarker verstanden werden und gibt Hinweis auf eine ungünstigere Prognose.

Die Angiogenese, definiert als Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden, ist ein wichtiger Schritt für Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung [Folkman 1995; vgl. auch entsprechenden Abschnitt in der

Einleitung]. Reguliert werden die einzelnen Prozesse der Angiogenese durch Zytokine, z.B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) [Folkman und Shing 1992]. Für NO konnte eine stimulatorische Rolle in der Angiogenese gezeigt werden [Ziche et al 1994; Leibovich et al 1994; Babaei et al 1998] und Ergebnisse von Untersuchungen an Tumor- und Tiermodellen weisen auf eine entscheidende Funktion von NO in der Tumorgenese hin. In diesen wurde eine NO-vermittelte Stimulation der Tumorphysion beobachtet [Lala und Orucevic 1998; Doi et al 1996; Jadeski et al 2002; Lala und Chakraborty 2001]. Dass NO eine wichtige Funktion in der Ausbildung von Tumoren haben könnte, wird von Resultaten aus Forschungen mit Zelllinien bekräftigt, in denen die Hemmung der NOS-Aktivität das Wachstum der Tumore verlangsamte [Orucevic und Lala 1996]. Diese Effekte wurden vorerst auf eine verringerte Invasivität der Tumorzellen zurückgeführt [Orucevic et al 1999], in weitergehenden Untersuchungen kam die Arbeitsgruppe aber zu dem Schluß, dass diese Befunde auch durch eine Hemmung der Neovaskularisation mittels NOS-Inhibition erklärt werden könnten [Jadeski und Lala 1999]. Mit dieser Annahme bestätigten sie die Ergebnisse einer früheren Arbeit [Andrade et al 1992].

Die Auffassung, NO sei entscheidend an der Angiogenese beteiligt, wird von Studien mit dem stark angiogen wirkenden VEGF [Keck et al 1989] gestützt, welche zeigen, dass die VEGF-induzierte Angiogenese zu einem großen Teil von der NO-Produktion abhängt [Morbidelli et al 1996; Ziche et al 1997; Murohara et al 1998; Frank et al 1999]. Es ist bekannt, dass VEGF eine Schlüsselrolle in der Tumorangiogenese spielt [Plate et al 1992; Brown et al 1993], das Tumorstadium steigert [Zhang et al 1995] und dessen Expression beim Mammakarzinom für eine schlechte Prognose steht [Toi et al 1996]. Andere Forschungsgruppen konnten beobachten, dass VEGF die NO-Produktion stimuliert [Ku et al 1993; van der Zee et al 1997], indem es einen Anstieg der Proteinspiegel von eNOS veranlasst [Hood et al 1998; Papapetropoulos et al 1997]. eNOS im Speziellen könnte demzufolge Mediator der VEGF-vermittelten Angiogenese und damit für die Progression von Tumoren verantwortlich sein. Die Ergebnisse der nachfolgenden Studien beschreiben die angiogenen Eigenschaften von eNOS und unterstützen damit diese Auffassung [Murohara et al 1998; Jadeski und Lala 1999; Murohara et al 1999; Jadeski et al 2000]. Die genauen

molekularen Mechanismen, welche für die angiogenen Funktionen von eNOS verantwortlich sind, bleiben ungewiß. Erste Daten deuten darauf hin, dass dies im Zusammenhang mit der Expression von Integrin $\alpha\beta 3$ stehen könnte [Brooks et al 1994a; Brooks et al 1994; Murohara et al 1999], jedoch sind weitere Arbeiten zur Auflösung notwendig.

Aber nicht nur ein stimulatorischer, sondern auch ein inhibitorischer Effekt von NO auf die Tumorprogression scheint nach den Ergebnissen verschiedener Studien durchaus möglich [Xie et al 1995; Son und Kim 1995; Hajri et al 1998; Tschugguel et al 1998; Dong et al 1994]. Die nachfolgenden Arbeiten fanden heraus, dass die NO-induzierte Apoptose über eine Stimulation des Tumorsuppressorgens p53 erfolgt [Forrester et al 1996; Messmer et al 1994; Messmer und Brüne 1996; Fehsel et al 1995].

Diese gegensätzlichen Funktionen lassen auf eine duale Rolle von NO für Tumorwachstum und Metastasierung schließen. Das Entstehen dieser paradoxen Aufgaben könnte durch die ungleiche genetische Ausstattung der Tumorzellen und deren Empfänglichkeit für NO-vermittelte Wirkungen sein. Ferner könnte es zur Entwicklung von NO-resistenten und -abhängigen Zellgruppen kommen, deren Zusammensetzung im Tumorgewebe den jeweiligen Effekt von NO bestimmt. Verantwortlich dafür, ob es Pro-Tumor oder Anti-Tumor-Effekte ausübt, könnte die Höhe der NO-Produktion sein. Studien zeigten, dass hohe Konzentrationen zur Apoptose führen [Mortensen et al 1999a; Jenkins et al 1995], niedrige dagegen vor dem programmierten Zelltod schützen [Kim et al 1997; Dimmeler et al 1997; von Knethen und Brüne 1997] und sogar die Tumorprogression unterstützen [Jenkins et al 1995]. Den hierbei vorliegenden Zusammenhang erklärt die tumorbiologische Hypothese, nach welcher angenommen wird, dass hohe NO-Konzentrationen produzierende Tumorzellen an Apoptose zu Grunde gehen, während geringe NO-Mengen herstellende Tumorzellen einen Überlebensvorteil erfahren. Dieser wiederum beruht auf einer NO-vermittelten Stimulation der Invasivität von Karzinomzellen, des Tumorblutflusses oder der Tumorangiogenese [Lala und Orucevic 1998].

Darüber hinaus ist bekannt, dass eNOS nur nanomolare NO-Konzentrationen produziert [Bredt und Snyder 1990], während iNOS-vermitteltes NO in mikromolarer Größenordnung vorliegt [Nathan und Xie 1994]. Aus diesen

Aussagen läßt sich schließen, dass eNOS für die tumorfördernden und iNOS für die –hemmenden Eigenschaften verantwortlich ist, diese Schlußfolgerung entspricht mehrheitlich den Ergebnissen der bisher hierzu durchgeführten Arbeiten. Die endotheliale NO-Synthase förderte die Tumorprogression [Mortensen et al 1999a; Lala und Orucevic 1998; Thomsen et al 1994; Thomsen et al 1995] während die induzierbare diese hemmte [Xie et al 1995; Son und Kim 1995; Tschugguel et al 1999; Tschugguel et al 1999a; Dong et al 1994].

Das Outcome der paradoxen Aufgaben von NO könnte auch durch eine differierende NOS-Aktivität zwischen Tumorzellen und tumor-infiltrierenden Makrophagen bedingt sein. Ebenso könnte es von unterschiedlichen Aktivitätsgraden beider NOS-Isoformen abhängen, da induzierbare und konstitutive NOS unterschiedlich reguliert werden und unabhängig voneinander arbeiten [Martin et al 2000]. eNOS wirkt eher als Signaltransduktionsmechanismus, während iNOS zytostatische und -toxische Effekte des Immunsystems vermittelt [Martin et al 1993]. Diesen gesamten diskutierten Auffassungen zufolge ist es möglich, dass iNOS-Expression in tumorinfiltrierenden Makrophagen dem zytotoxischen Effekt von NO auf Tumorzellen beisteuert, während eine eNOS-Expression in Gefäßendothelzellen den Blutfluß im Tumor steigert und die Angiogenese fördert [Weidner et al 1992; Thomsen et al 1995]. Die Schlußfolgerung wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigt, welche auf eine tumorfördernde Rolle von eNOS hindeuten.

Unsere Untersuchungen an den Tumoren von 163 Patientinnen stellen den bisher größten Stichprobenumfang dar, an welchem bisher die eNOS-Expression in primären Mammakarzinomen nachgewiesen werden konnte. Dennoch ist die mangelnde prognostische Aussagekraft von eNOS höchstwahrscheinlich der Kollektivgröße zuzuschreiben. Es ist denkbar, dass die Größe des Kollektivs nicht dazu ausgereicht hat, die erwarteten Zusammenhänge statistisch signifikant nachzuweisen.

Zwei Hauptgründe können für die unterschiedlichen Ergebnisse unserer Studie im Vergleich zu anderen angeführt werden. Zum einen stellten wir sehr strikte Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien auf (Einzelheiten siehe Kapitel 2.1), welche aus den Veröffentlichungen anderer Studien nicht hervorgingen. Aufgrund dessen lagen möglicherweise unterschiedlichere Kollektive vor als zunächst

angenommen, welches eine mangelnde Vergleichbarkeit zur Folge hat. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass sich die Effekte der NO-Produktion auf den Tumor während der Tumorprogression verändern. Diese Vermutung unterstützen Studien, welche von einer niedrigeren NOS-Expression in Kolonkarzinomen vs. Kolonpolypen [Chhatwal et al 1994], sowie einer geringeren NOS-Aktivität in apokriner Metaplasie [Tschugguel et al 1996] vs. in situ Karzinomen des Brustgewebes [Loibl et al 2002] berichten. Daraus läßt sich schließen, dass die NOS-Expression schon sehr früh in der Karzinogenese eine Rolle spielt und demzufolge das Stadium und die Aggressivität der Tumore für einen zuverlässigen Vergleich unterschiedlicher Studien bekannt sein sollten.

Zudem sind für die teilweise erheblichen Diskrepanzen der Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen Differenzen in der Selektion von cut-off-Werten zur Beurteilung der Expressionsstärke einzelner Parameter sowie kleine, heterogene und damit nicht repräsentative Patientinnenkollektive und zu kurze follow-up-Zeiträume verantwortlich. Die z. T. sehr unterschiedlichen Literaturangaben bezüglich der prognostischen Aussagekraft und Korrelation mit anderen Prognosefaktoren sind v. a. auf methodisch verschiedene Nachweisverfahren sowie Unterschiede in der Art der verwendeten Antikörper, Art und Dauer der Fixation und Dicke des Gewebeblocks zurückzuführen. Hierbei sollten Standardisierungen für Nachweisverfahren bestimmter Parameter angestrebt werden, um durch vergleichbare Ergebnisse die Anwendung der Prognosefaktoren im klinischen Alltag praktikabler zu gestalten.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Studie auf eine tumorfördernde Rolle von eNOS-vermitteltem NO beim humanen Mammakarzinom hin, in deren Kontext der Hormonsensitivität der Tumore eine bedeutende Funktion zukommt. Unsere Daten weisen auf, dass eine Interaktion zwischen Hormonrezeptorstatus und eNOS erfolgt, aber einzelne Abläufe und Wechselwirkungen mit anderen Regulationsmechanismen gilt es noch zu entschlüsseln. Obwohl die Bedeutung von eNOS-induziertem NO für die Tumorbiologie noch nicht vollständig geklärt ist, bleibt es gerade aufgrund dessen Beteiligung in der Angiogenese ein hochinteressantes Molekül. Ein fundierteres Verständnis des NO-Pfades könnte unser Wissen über verantwortliche Mechanismen von Tumorangiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung verbessern. Unter Anwendung dieses

Verständnisses könnten selektive Inhibitoren der NO-Synthasen eine therapeutische Intervention bestimmter Tumore bedeuten.

Ebenso bietet die Interaktion zwischen eNOS und Östrogen einen vielversprechenden Forschungsbereich. Ziel zukünftiger Studien sollte sein, durch Differenzierung mittels östrogen-regulierter Enzyme, hormonrezeptorpositive Therapieversager einer endokrinen Behandlung identifizieren zu können.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche, sogenannte „neue Prognosefaktoren“ des Mammakarzinoms zur Diskussion gestellt. Die Entwicklungen richten sich auf die Etablierung dieser Parameter als Ergänzung zu den klassischen Prognosefaktoren. Genauso wie in der vorliegenden Arbeit steht das Bemühen um Validierung dieser im Mittelpunkt der Forschungen und es gibt einige erfolgversprechende Faktoren (uPA, PAI-1, HER-2 neu, Cyclin E). Dennoch wird gegenwärtig deren prognostische und klinische Relevanz insgesamt kontrovers diskutiert, was zu weiteren Forschungen auf diesem Gebiet ermutigen soll.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Festlegung von Prognose und Therapie hormonabhängiger Tumore wie dem Mammakarzinom, erfolgt heutzutage vor allem über die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus. Dieser biologische Zusammenhang hat zu einem wachsenden Interesse an Östrogen-regulierten Proteinen geführt, welche eine über die des Hormonrezeptorstatus hinausgehende prognostische Aussagekraft liefern könnten. Da bekannt ist, dass die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch Östrogen beeinflusst wird, hatte die vorliegende Arbeit den Einfluss von eNOS auf die Prognose von Mammakarzinomen zur Zielsetzung. Die drei Fragestellungen hierfür waren die Lokalisierung der eNOS-Expression, die Korrelation von eNOS mit den klinisch wichtigen Prognosefaktoren (besonderes Interesse galt den hormonellen Parametern), sowie der Einfluss von eNOS auf das Überleben der Patientinnen. Es wurden Gewebeproben von 163 Patientinnen untersucht, der eNOS-Status der in Paraffin eingebetteten Mammakarzinome wurde immunhistochemisch mittels APAAP-Methode bestimmt. Zu allen Fällen lagen die etablierten Prognosefaktoren (Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, Alter) sowie die Verlaufsbeobachtungen vor. Soweit aus den verfügbaren Daten hervorgeht, ist dies der größte Stichprobenumfang an Patientinnen, bei dem die eNOS-Expression in primären Mammakarzinomen nachgewiesen wurde.

Die Expression von eNOS konnte in den Tumorzellen der Mammakarzinome lokalisiert werden. Es bestanden signifikante Zusammenhänge zwischen der eNOS-Expression und dem Hormonrezeptor-/ Menopausenstatus, sowie der Zyklushälfte zum Operationszeitpunkt. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der eNOS-Expression und dem Grading, TNM-Status oder Alter der Patientinnen nachgewiesen werden. Gleichmaßen konnten wir keinen signifikanten Unterschied im Überleben feststellen, dennoch zeigte sich ein kürzeres Gesamtüberleben bei Patientinnen mit eNOS-positiven Tumoren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass invasive Mammakarzinomzellen eNOS exprimieren und dass ein erhöhter Östrogenspiegel im Blut mit einer erhöhten eNOS-Expression einhergeht. Obwohl eNOS als

unabhängiger Prognosefaktor ungeeignet ist, so gibt das Vorhandensein des Enzyms Hinweis auf eine ungünstigere Prognose.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eNOS hormonell geregelt wird, dass dieser Zusammenhang im Allgemeinen eine Rolle bei der Entwicklung von Brustkrebs spielt und im Speziellen dass eNOS ein tumorfördernder Parameter sein könnte. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die tatsächliche Rolle von eNOS in der Tumorbilogie zu klären.

6 SUMMARY

The prognosis and therapy of hormone dependent tumors, i.e. breast cancer is distinguished by evaluating the hormone receptor status. This connection has led to an increasing interest in estrogen-regulated proteins, which enable a more detailed picture of the outcome. As it is known that the activity of the endothelial NO-synthesis (eNOS) is influenced by estrogen, this study aimed to investigate the impact of eNOS on the prognosis of breast cancer. The three questions were the localization of eNOS-expression, the correlation of eNOS with the clinically established prognostic factors (most important factors here were the hormone parameters) as well as the effect of eNOS on the survival of the patients. We performed immunohistochemical staining of paraffin-embedded primary breast cancer tissue of 163 patients for eNOS, using the APAAP-method. The established prognostic factors (tumor size, lymph node status, grading, hormone receptor status, age) as well as the follow-up data were known in all of the cases. To the best of our knowledge this is the largest sample of breast cancer patients that has been investigated for eNOS expression in tumor cells of primary breast cancer.

We were able to localize eNOS in breast cancer cells and we found significant correlations between eNOS-expression and both hormone receptor and menopausal status as well as menstrual phase of the premenopausal patients at time of surgery. We did not find significant correlations between eNOS-expression and grading, TNM-status or age. As well as this there was no significant difference noticed in the survival chances, whereas patients with eNOS-positive tumors showed a noticeable shorter overall survival chance.

The results of this study show that eNOS is expressed by invasive breast cancer cells and that a high level of estrogen in the serum is combined with an increased eNOS expression. Although eNOS did not prove to be an independent prognostic factor its presence does make a poorer prognosis more likely.

Therefore we conclude that eNOS is regulated hormonally and that this connection generally plays a role in the development of breast cancer and that eNOS in particular could promote tumor growth. Further investigations will be necessary in order to establish the precise role of eNOS in tumor biology.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADITHI M, NALINI V, KRISHNAKUMAR S (2005): *The role of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in retinoblastoma. Cancer* 103: 1701-11.
- AMBS S, MERRIAM WG, BENNETT WP, FELLE-Y-BOSCO E, OGUNFUSIKA MO, OSER SM, KLEIN S, SHIELDS PG, BILLIAR TR, HARRIS CC (1998): *Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. Cancer Res* 58: 334-41.
- ANDRADE SP, HART IR, PIPER PJ (1992): *Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. Br J Pharmacol* 107: 1092-5.
- BABAEI S, TEICHERT-KULISZEWSKA K, MONGE JC, MOHAMED F, BENDECK MP, STEWART DJ (1998): *Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. Circ Res* 82: 1007-15.
- BECK KF, EBERHARDT W, FRANK S, HUWILER A, MESSMER UK, MUHL H, PFEILSCHIFTER J (1999): *Inducible NO synthase: role in cellular signalling. J Exp Biol* 202: 645-53.
- BILLIAR TR, CURRAN RD, STUEHR DJ, FERRARI FK, SIMMONS RL (1989): *Evidence that activation of Kupffer cells results in production of L-arginine metabolites that release cell-associated iron and inhibit hepatocyte protein synthesis. Surgery* 106: 364-71.
- BLOOM HJ, RICHARDSON WW (1957): *Histological grading and prognosis in breast cancer, a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer* 11: 359-77.
- BOENISCH (Hrsg.): *Handbuch immunchemischer Färbemethoden II. Kontrollen. Carpinteria Kalifornien* 1989.
- BOURNE (Hrsg.): *Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden. Kontrollen. Carpinteria Kalifornien* 1983.
- BREDT DS, SNYDER SH (1990): *Isolation of nitric oxide synthetase a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci* 87: 682-5.
- BROOKS PC, MONTGOMERY AM, ROSENFELD M, REISFELD RA, HU T, KLIER G, CHERESH DA (1994): *Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell* 79: 1157-64.
- BROOKS PC, CLARK RA, CHERISH DA (1994a): *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. Science* 264: 569-71.
- BROWN LF, BERSE B, JACKMAN RW, TOGNAZZI K, MANSEAU EJ, DVORAK HF, SENGER DR (1993): *Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. Am J Pathol* 143: 1255-62.
- BUSMANIS I, FELEPPA F, JONES A, MCGRATH KM, REED R, COLLINS J, RUSSELL I, BEGLEY CG (1994): *Analysis of cerbB2 expression using a panel of 6 commercially available antibodies. Pathology* 26: 261-7.

- CARTER CL, ALLEN C, HENSON DE (1989): *Relation of tumor size lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. Cancer* 63: 181-7.
- CAULIN-GLASER T, GARCIA-CARDENA G, SARREL P, SESSA WC, BENDER JR (1997): *17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. Circ Res* 81: 885-92.
- CHAMBLISS KL, SHAUL PW (2002): *Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. Endocr Rev* 23: 665-86.
- CHANG S, ALDERFER JR, ASMAR L, BUZDAR AU (2000): *Inflammatory breast cancer survival: the role of obesity and menopausal status at diagnosis. Breast Cancer Res Treat* 64: 157-63.
- CHEN Z, YUHANNA IS, GALCHEVA-GARGOVA Z, KARAS RH, MENDELSON ME, SHAUL PW (1999): *Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. J Clin Invest* 103: 401-6.
- CHHATWAL VJ, NGOI SS, CHAN ST, CHIA YW, MOOCHHALA SM (1994): *Aberrant expression of nitric oxide synthase in human polyps neoplastic colonic mucosa and surrounding peritumoral normal mucosa. Carcinogenesis* 15: 2081-5.
- CHO MM, ZIATS NP, PAL D, UTIAN WH, GORODESKI GI (1999): *Estrogen modulates paracellular permeability of human endothelial cells by eNOS- and iNOS-related mechanisms. Am J Physiol* 276: C337-49.
- CICINELLI E, IGNARRO LJ, LOGRANO M, GALANTINO P, BALZANO G, SCHONAUER LM (1996): *Circulating levels of nitric oxide in fertile women in relation to the menstrual cycle. Fertil Steril* 66: 1036-8.
- CLARK GM (1994): *Do we really need prognostic factors for breast cancer? Breast Cancer Res Treat* 30: 117-26.
- CLARK GM (1995): *Prognostic and Predictive Factors for Breast Cancer. Breast Cancer* 2: 79-89.
- COBBS CS, BRENNAN JE, ALDAPE KD, BRETT DS, ISRAEL MA (1995): *Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. Cancer Res* 55: 727-30.
- COLDITZ GA (1993): *Epidemiology of breast cancer. Findings from the nurses' health study. Cancer* 71: 1480-9.
- COLDITZ GA, HANKINSON SE, HUNTER DJ, WILLETT WC, MANSON JE, STAMPFER MJ, HENNEKENS C, ROSNER B, SPEIZER FE (1995): *The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. N Engl J Med* 332: 1589-93.
- COLDITZ GA, ROSNER BA, CHEN WY, HOLMES MD, HANKINSON SE (2004): *Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. J Natl Cancer Inst* 96: 218-28.
- COLLETT K, HARTVEIT F, SKJAERVEN R, MAEHLE BO (1996): *Prognostic role of oestrogen and progesterone receptors in patients with breast cancer: relation to age and lymph node status. J Clin Pathol* 49: 920-5.

- CORDELL JL, FALINI B, ERBER WN, GHOSH AK, ABDULAZIZ Z, MACDONALD S, PULFORD KA, STEIN H, MASON DY (1984): *Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)*. *J Histochem Cytochem* 32: 219-29.
- COSTA SD, LANGE S, KLINGA K, MERKLE E, KAUFMANN M (2002): *Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer-results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up*. *Eur J Cancer* 38: 1329-34.
- COX DR (1972): *Regression models and life tables*. *J R Stat Soc* 34: 187-200.
- CROWE JP JR, GORDON NH, SHENK RR, ZOLLINGER RM JR, BRUMBERG DJ, SHUCK JM (1992): *Primary tumor size. Relevance to breast cancer survival*. *Arch Surg* 127: 910-5.
- CURRAN RD, BILLIAR TR, STUEHR DJ, HOFMANN K, SIMMONS RL (1989): *Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells*. *J Exp Med* 170: 1769-74.
- DAUGAARD S (2004): *Current soft-tissue sarcoma classifications*. *Eur J Cancer* 40: 543-8.
- DIMMELER S, HAENDELER J, NEHLS M, ZEIHNER AM (1997): *Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases*. *Exp Med* 185: 601-7.
- DOI K, AKAIKE T, HORIE H, NOGUCHI Y, FUJII S, BEPPU T, OGAWA M, MAEDA H (1996): *Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth*. *Cancer* 77: 1598-604.
- DONG Z, STAROSELSKY AH, QI X, XIE K, FIDLER IJ (1994): *Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells*. *Cancer Res* 54: 789-93.
- DUBSKY PC, GNANT MF, TAUCHER S, ROKA S, KANDIOLER D, PICHLER-GEBHARD B, AGSTNER I, SEIFERT M, SEVELDA P, JAKESZ R (2002): *Young age as an independent adverse prognostic factor in premenopausal patients with breast cancer*. *Clin Breast Cancer* 3: 65-72.
- DUENAS-GONZALEZ A, ISALES CM, DEL MAR ABAD-HERNANDEZ M, GONZALEZ-SARMIENTO R, SANGUEZA O, RODRIGUEZ-COMMES J (1997): *Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease*. *Mod Pathol* 10: 645-9.
- DUPONT WD, PAGE DL (1985): *Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease*. *Engl J Med* 312: 146-51.
- ELSTON CW, ELLIS IO (1991): *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. *Histopathology* 19: 403-10.
- FALINI B, ABDULAZIZ Z, GERDES J, CANINO S, CIANI C, CORDELL JL, KNIGHT PM, STEIN H, GRIGNANI F, MARTELLI MF (1986): *Description of a sequential staining procedure for double immunoenzymatic staining of pairs of antigens using monoclonal antibodies*. *J Immunol Methods* 93: 265-73.

- FEHSEL K, KRONCKE KD, MEYER KL, HUBER H, WAHN V, KOLB-BACHOFEN V (1995): *Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. J Immunol* 155: 2858-65.
- FENTIMAN IS (2002): *12. Timing of surgery for breast cancer. Int J Clin Pract* 56: 188-90.
- FILEP JG, LAPIERRE C, LACHANCE S, CHAN JS (1997): *Nitric oxide co-operates with hydrogen peroxide in inducing DNA fragmentation and cell lysis in murine lymphoma cells. Biochem J* 321: 897-901.
- FISHER B, BAUER M, WICKERHAM DL, REDMOND CK, FISHER ER, CRUZ AB, FOSTER R, GARDNER B, LERNER H, MARGOLESE R, ET AL. (1983): *Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. Cancer* 52: 1551-7.
- FISHER ER (1986): *Prognostic and therapeutic significance of pathological features of breast cancer. NCI Monogr* 1: 29-34.
- FOLKMAN J, SHING Y (1992): *Angiogenesis. J Biol Chem* 267: 10931-34.
- FOLKMAN J (1995): *Angiogenesis in cancer vascular rheumatoid and other disease. Nat Med* 1: 27-31.
- FOLSOM AR, MINK PJ, SELLERS TA, HONG CP, ZHENG W, POTTER JD (1995): *Hormonal replacement therapy and morbidity and mortality in a prospective study of postmenopausal women. Am J Public Health* 85: 1128-32.
- FORRESTER K, AMBS S, LUPOLD SE, KAPUST RB, SPILLARE EA, WEINBERG WC, FELLEY-BOSCO E, WANG XW, GELLER DA, TZENG E, BILLIAR TR, HARRIS CC (1996): *Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. Proc Natl Acad Sci* 93: 2442-7.
- FRANK S, STALLMEYER B, KAMPFER H, SCHAFFNER C, PFEILSCHIFTER J (1999): *Differential regulation of vascular endothelial growth factor and its receptor fms-like tyrosine kinase is mediated by nitric oxide in rat mesangial cells. Biochem J* 338: 367-74.
- FURCHGOTT RF, ZAWADSKI JV (1980): *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature* 288: 373-6.
- GALLO O, MASINI E, MORBIDELLI L, FRANCHI A, FINI-STORCHI I, VERGARI WA, ZICHE M (1998): *Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. J Natl Cancer Inst* 90: 587-96.
- GARG UC, HASSID A (1989): *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest* 83: 1774-7.
- GEBAUER G, FEHM T, LANG N, JAGER W (2002): *Tumor size axillary lymph node status nad steroid receptor expression in breast cancer: prognostic relevance 5 years after surgery. Breast Cancer Res Treat* 75: 167-73.
- GELBER RD, COLE BF, GOLDBIRSCHE A, ROSE C, FISHER B, OSBORNE CK, BOCCARDO F, GRAY R, GORDON NH, BENGTSSON NO, SEVELDA P (1996): *Adjuvant chemotherapy plus tamoxifen compared with tamoxifen alone for postmenopausal breast cancer: meta-analysis of quality-adjusted survival. Lancet* 347: 1066-71.

- GERBER B (2003): *Persönlicher Lebensstil und Brustkrebsrisiko. J Menopause* 3: 13-19.
- GLOBOCAN 2002: <http://www.dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>
- GOLDHIRSCH A, WOOD WC, GELBER RD, COATES AS, THURLIMANN B, SENN HJ (2003): *Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. J Clin Oncol* 21: 3357-65.
- GOTO T, HARUMA K, KITADAI Y, ITO M, YOSHIHARA M, SUMII K, HAYAKAWA N, KAJIYAMA G (1999): *Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. Clin Cancer Res* 5: 1411-5.
- GRAEFF H, WILMANN S, JANICKE F, SAUER H, CLASSEN S (1997): *Prognostische und therapierelavante Faktoren beim Mammakarzinom. Ergebnisse einer Konsensuskonferenz. Onkologie* 3: 409-412.
- GRANN VR, TROXEL AB, ZOJWALLA NJ, JACOBSON JS, HERSHMAN D, NEUGUT AI (2005): *Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. Cancer* 103: 2241-51.
- GROSCLAUDE P, COLONNA M, HEDELIN G, TRETARRE B, ARVEUX P, LESEC'H JM, RAVERDY N, SAUVAGE-MACHELARD M (2001): *Survival of women with breast cancer in france: variation with age stage and treatment. Breast Cancer Res Treat* 70: 137-43.
- HAJRI A, METZGER E, VALLAT F, COFFY S, FLATTER E, EVRARD S, MARESCAUX J, APRAHAMIAN M (1998): *Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies. Br J Cancer* 78: 841-9.
- HARRIS JR, LIPPMAN ME, VERONESI U, WILLETT W (1992): *Breast cancer (1). N Engl J Med* 327: 319-28.
- HARRIS JR, LIPPMAN ME, VERONESI U, WILLETT W (1992a): *Breast cancer (2). N Engl J Med* 327: 390-8.
- HAYASHI T, YAMADA K, ESAKI T, KUZUYA M, SATAKE S, ISHIKAWA T, HIDAKA H, IGUCHI A (1995): *Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. Biochem Biophys Res Commun* 214: 847-55.
- HESS KR, PUSZTAI L, BUZDAR AU, HORTOBAGYI GN (2003): *Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. Breast Cancer Res Treat* 78: 105-18.
- HIBBS JB, TAINOR RR, VAVRIN Z (1987): *Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science* 235: 473-6.
- HISHIKAWA K, NAKAKI T, MARUMO T, SUZUKI H, KATO R, SARUTA T (1995): *Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. FEBS Lett* 360: 291-3.
- HOOD JD, MEININGER CJ, ZICHE M, GRANGER HJ (1998): *VEGF upregulates ecNOS message protein and NO production in human endothelial cells. Am J Physiol* 274: H1054-8.
- HOPTON DS, THOROGOOD J, CLAYDEN AD, MACKINNON D (1989): *Histological grading of breast cancer, significance of grade on recurrence and mortality. Eur J Surg Oncol* 15: 25-31.

- IAFRATI MD, KARAS RH, ARONOVITZ M, KIM S, SULLIVAN TR JR, LUBAHN DB, O'DONNELL TF JR, KORACH KS, MENDELSON ME (1997): *Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. Nat Med* 3: 545-8.
- IGNARRO LJ (1990): *Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. Hypertension* 16: 477-83.
- JADESKI LC, LALA PK (1999): *Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. Am J Pathol* 155: 1381-90.
- JADESKI LC, HUM KO, CHAKRABORTY C, LALA PK (2000): *Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration invasiveness and angiogenesis. Int J Cancer* 86: 30-9.
- JADESKI LC, CHAKRABORTY C, LALA PK (2002): *Role of nitric oxide in tumour progression with special reference to a murine breast cancer model. Can J Physiol Pharmacol* 80: 125-35.
- JAIYESIMI IA, BUZDAR AU, DECKER DA, HORTOBAGYI GN (1995): *Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. J Clin Oncol* 13: 513-29.
- JENKINS DC, CHARLES IG, BAYLIS SA, LELCHUK R, RADOMSKI MW, MONCADA S (1994): *Human colon cancer cell lines show a diverse pattern of nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide generation. Br J Cancer* 70: 847-9.
- JENKINS DC, CHARLES IG, THOMSEN LL, MOSS DW, HOLMES LS, BAYLIS SA, RHODES P, WESTMORE K, EMSON PC, MONCADA S (1995): *Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Acad Sci* 92: 4392-96.
- JONAT W, EIDTMANN H, FRIEDRICHS K (1994): *Prognosefaktoren beim Mammakarzinom. Gynäkologe* 27: 37-44.
- DE JONG AE, VAN PUIJENBROEK M, HENDRIKS Y, TOPS C, WIJNEN J, AUSEMS MG, MEIJERS-HEIJBOER H, WAGNER A, VAN OS TA, BROCKER-VRIENDS AH, VASEN HF, MORREAU H (2004): *Microsatellite instability immunohistochemistry and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin Cancer Res* 10: 972-80.
- JORDAN VC, MORROW M (1999): *Tamoxifen, raloxifene and the prevention of breast cancer. Endocr Rev* 20: 253-78.
- KAPLAN EL, MEIER P (1958): *Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc* 53: 457-81.
- KARAS RH, HODGIN JB, KWOUN M, KREGE JH, ARONOVITZ M, MACKAY W, GUSTAFSSON JA, KORACH KS, SMITHIES O, MENDELSON ME (1999): *Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. Proc Natl Acad Sci* 96: 15133-6.
- KAUFMANN M, KUBLI F (Hrsg.) (1983): *Biochemische prognostische Faktoren beim Mammakarzinom. Neue Wege in der Brustkrebsbehandlung. Gemeinsames Symposium d. Arbeitsgemeinschaft für gynäkolog. Onkologie d. Dt. Ges. für Gynäkologie u. Geburtshilfe (AGO) München (Zuckschwerdt). (= Aktuelle Onkologie, 8)*

- KAUFMANN M, JONAT W, EIERMANN W, Maass H, Bastert G (1990): *Breast saving operation and adjuvant therapy of breast cancer. Report of the National Institute of Health (NIH) Consensus Development Conference Washington D.C. 18-21 June 1990. Geburtshilfe Frauenheilkd* 50: 827-8.
- KAUFMANN M, MINCKWITZ G von, EIERMANN W (2004): *Therapie primärer Mammakarzinome. Ergebnisse der Konferenz in St. Gallen 2003. DÄ* 101: A190 ff.
- KECK PJ, HAUSER SD, KRIVI G, SANZO K, WARREN T, FEDER J, CONNOLLY DT (1989): *Vascular permeability factor an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science* 246: 1309-12.
- KELLER R, GEIGES M, KEIST R (1990): *L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages. Cancer Res* 50: 1421-5.
- KIM YM, DE VERA ME, WATKINS SC, BILLIAR TR (1997): *Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. J Biol Chem* 272: 1402-11.
- KLOTZ T, BLOCH W, VOLBERG C, ENGELMANN U, ADDICKS K (1998): *Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. Cancer* 82: 1897-903.
- KLOTZ T, BLOCH W, JACOBS G, NIGGEMANN S, ENGELMANN U, ADDICKS K (1999): *Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer. Urology* 54: 416-9.
- KNIGHT WA, LIVINGSTON RB, GREGORY EJ, MCGUIRE WL (1977): *Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. Cancer Res* 37: 4669-71.
- KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RM, MONCADA S (1989): *Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci* 86: 5159-62.
- KNOWLES RG, MONCADA S (1994): *Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J* 298: 249-58.
- KU DD, ZALESKI JK, LIU S, BROCK TA (1993): *Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. Am J Physiol* 265: H586-92.
- KUBES P, SUZUKI M, GRANGER DN (1991): *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci* 88: 4651-5.
- LALA PK, ORUCEVIC A (1998): *Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. Cancer Metastasis Rev* 17: 91-106.
- LALA PK, CHAKRABORTY C (2001): *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. Lancet Oncol* 2: 149-56.
- LEIBOVICH SJ, POLVERINI PJ, FONG TW, HARLOW LA, KOCH AE (1994): *Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. Proc Natl Acad Sci* 91: 4190-4.

- LEONE AM, PALMER RM, KNOWLES RG, FRANCIS PL, ASHTON DS, MONCADA S (1991): *Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. The Journal of Biological Chemistry* 266: 23790-5.
- LI CY, LAZCANO-VILLAREAL O, PIERRE RV, YAM LT (1987): *Immunocytochemical identification of cells in serous effusions. Technical considerations. Am J Clin Pathol* 88: 696-706.
- LI W, XU RJ, JIANG LH, SHI J, LONG X, FAN B (2005): *Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. Med Oncol* 22: 63-70.
- LIU W, XU RJ, JIANG LH, SHI J, LONG X, FAN B (1998): *Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. Br J Cancer* 78: 534-41.
- LOIBL S, VON MINCKWITZ G, WEBER S, SINN HP, SCHINI-KERTH VB, LOBYSHEVA I, NEPVEU F, WOLF G, STREBHARDT K, KAUFMANN M (2002): *Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy. Cancer* 95: 1191-8.
- LOIBL S, BUCK A, STRANK C, VON MINCKWITZ G, ROLLER M, SINN HP, SCHINI-KERTH V, SOLBACH C, STREBHARDT K, KAUFMANN M (2005): *The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer. Eur J Cancer* 41: 265-71.
- LOWETH AC, WILLIAMS GT, SCARPELLO JH, MORGAN NG (1997): *Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line HIT-T15. FEBS Lett* 400: 285-8.
- MACRITCHIE AN, JUN SS, CHEN Z, GERMAN Z, YUHANNA IS, SHERMAN TS, SHAUL PW (1997): *Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. Circ Res* 81: 355-362.
- MADIGAN MP, ZIEGLER RG, BENICHOU J, BYRNE C, HOOVER RN (1995): *Proportion of breast cancer in the United States explained by well-established risk factors. J Natl Cancer Inst* 87: 1681-5.
- MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD, WISHNOK JS (1988): *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry* 27: 8706-11.
- MARTIN JH, EDWARDS SW (1993): *Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. J Immunol* 150: 3478-86.
- MARTIN JH, ALALAMI O, van den BERG HW (1999): *Reduced expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in a human breast cancer cell line which has acquired estrogen independence. Cancer Letters* 144: 65-74.
- MARTIN JH, BEGUM S, ALALAMI O, HARRISON A, SCOTT KW (2000): *Endothelial nitric oxide synthase: correlation with histologic grade lymph node status and estrogen receptor expression in human breast cancer. Tumour Biol* 21: 90-7.

- MCCALL TB, FEELISCH M, PALMER RM, MONCADA S (1991): *Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. Br J Pharmacol* 102: 234-8.
- MCGUIRE WL (1991): *Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. J Natl Cancer Inst* 83: 154-5.
- MCGUIRE WL, CLARK GM (1992): *Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. N Engl J Med* 326: 1756-61.
- MESSMER UK, ANKARCRONA M, NICOTERA P, BRUNE B (1994): *p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. FEBS Lett* 355: 23-6.
- MESSMER UK, BRUNE B (1996): *Nitric oxide-induced apoptosis: p53- dependent and p53-independent signalling pathways. Biochem J* 319: 299-305.
- MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNETT LM, DING W, ET AL (1994): *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science* 266: 66-71.
- MILLER VM, VANHOUTTE PM (1991): *Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. Am J Physiol* 261: R1022-7.
- MILLIS RR (1980): *Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. Cancer* 46: 2869-71.
- MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA (1991): *Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev* 43: 109-42.
- MORBIDELLI L, CHANG CH, DOUGLAS JG, GRANGER HJ, LEDDA F, ZICHE M (1996): *Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. Am J Physiol* 270: H411-5.
- MORTENSEN K, HOLCK S, CHRISTENSEN IJ, SKOUV J, HOUGAARD DM, BLUM J, LARSSON LI (1999): *Endothelial cell nitric oxide synthase in peritumoral microvessels is a favorable prognostic indicator in premenopausal breast cancer patients. Clin Cancer Res* 5: 1093-7.
- MORTENSEN K, SKOUV J, HOUGAARD DM, LARSSON LI (1999a): *Endogenous Endothelial Cell Nitric-oxide Synthase Modulates Apoptosis in Cultured Breast Cancer Cells and Is Transcriptionally Regulated by p53. The Journal of Biological Chemistry* 274: 37679-84.
- MUHL H, PFEILSCHIFTER J (2003): *Endothelial nitric oxide synthase: a determinant of TNFalpha production by human monocytes/macrophages. Biochem Biophys Res Commun* 310: 677-80.
- MULSCH A, BASSENGE E, BUSSE R (1989): *Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340: 767-70.
- MUROHARA T, ASAHARA T, SILVER M, BAUTERS C, MASUDA H, KALKA C, KEARNEY M, CHEN D, SYMES JF, FISHMAN MC, HUANG PL, ISNER JM (1998): *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. J Clin Invest* 101: 2567-78.

- MUROHARA T, WITZENBICHLER B, SPYRIDOPOULOS I, ASAHARA T, DING B, SULLIVAN A, LOSORDO DW, ISNER JM (1999): *Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1156-61.
- NAKOPOULOU L, LAZARIS AC, BALTAS D, GIANNOPOULOU I, KAVANTZAS N, TZONOU A (1995): *Prognostic evaluation of oestrogen-regulated protein immunoreactivity in ductal invasive (NOS) breast cancer. Virchows Arch* 427: 33-40.
- NATHAN C (1992): *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J* 6: 315-64.
- NATHAN C, XIE QW (1994): *Nitric oxide synthases: roles tolls controls. Cell* 78: 915-8.
- NGUYEN T, BRUNSON D, CRESPI CL, PENMAN BW, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR (1992): *DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. Proc Natl Acad Sci* 89: 3030-4.
- NISHIDA K, HARRISON DG, NAVAS JP, FISHER AA, DOCKERY SP, UEMATSU M, NEREM RM, ALEXANDER RW, MURPHY TJ (1992): *Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. J Clin Invest* 90: 2092-6.
- ORUCEVIC A, LALA PK (1996): *NG-nitro-L-arginine methyl ester an inhibitor of nitric oxide synthesis ameliorates interleukin 2-induced capillary leakage and reduces tumour growth in adenocarcinoma-bearing mice. Br J Cancer* 73: 189-96.
- ORUCEVIC A, BECHBERGER J, GREEN AM, SHAPIRO RA, BILLIAR TR, LALA PK (1999): *Nitric-oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness. Int J Cancer* 81: 889-96.
- PALACIOS M, KNOWLES RG, PALMER RM, MONCADA S (1989): *Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. Biochem Biophys Res Commun* 165: 802-9.
- PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S (1987): *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature* 327: 524-6.
- PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S (1988): *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature* 333: 664-6.
- PAPAPETROPOULOS A, GARCIA-CARDENA G, MADRI JA, SESSA WC (1997): *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Clin Invest* 100: 3131-39.
- PENAULT-LLORCA F, ADELAIDE J, HOUVENAEGHEL G, HASSOUN J, BIRNBAUM D, JACQUEMIER J (1994): *Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation. J Pathol* 173: 65-75.
- PLATE KH, BREIER G, WEICH HA, RISAU W (1992): *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. Nature* 359: 845-8.

- POLTE T, OBERLE S, SCHRODER H (1997): *Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. FEBS Lett* 409: 46-8.
- PONDER BA, WILKINSON MM (1981): *Inhibition of endogenous tissue alkaline phosphatase with the use of alkaline phosphatase conjugates in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem* 29: 981-4.
- PRESS MF, HUNG G, GODOLPHIN W, SLAMON DJ (1994): *Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. Cancer Res* 54: 2771-7.
- RACK B, JANNI W, GERBER B, STROBL B, SCHINDLBECK C, KLANNER E, RAMMEL G, SOMMER H, DIMPFL T, FRIESE K (2003): *Patients with recurrent breast cancer: does the primary axillary lymph node status predict more aggressive tumor progression? Breast Cancer Res Treat* 82: 83-92.
- RADOMSKI MW, PALMER RM, MONCADA S (1990): *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. Proc Natl Acad Sci* 87: 5193-7.
- RADOMSKI MW, JENKINS DC, HOLMES L, MONCADA S (1991): *Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. Cancer Res* 51: 6073-8.
- RAKUSAN K (1995): *Coronary angiogenesis. From morphometry to molecular biology and back. Ann NY Acad Sci* 752: 257-266.
- RASPOLINI MR, AMUNNI G, VILLANUCCI A, BODDI V, BARONI G, TADDEI A, TADDEI GL (2004): *Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. Gynecol Oncol* 92: 806-12.
- REMMELE W, STEGNER HE (1987): *Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer. Pathologe* 8: 138-40.
- REVENEAU S, ARNOULD L, JOLIMOY G, HILPERT S, LEJEUNE P, SAINT-GIORGIO V, BELICHARD C, JEANNIN JF (1999): *Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade proliferation rate and expression of progesterone receptors. Lab Invest* 79: 1215-25.
- ROCKHILL B, WEINBERG CR, NEWMAN B (1998): *Population attributable fraction estimation for established breast cancer risk factors: considering the issues of high prevalence and unmodifiability. Am J Epidemiol* 147: 826-33.
- ROSSELLI M, IMTHURM B, MACAS E, KELLER PJ, DUBEY RK (1994): *Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. Biochem Biophys Res Commun* 202: 1543-52.
- SAEZ RA, MCGUIRE WL, CLARK GM (1989): *Prognostic factors in breast cancer. Semin Surg Oncol* 5: 102-10.
- SCHARL A, VIERBUCHEN M, WURZ H (1989): *Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Mammakarzinom mit Hilfe monoklonaler Antikörper: Vergleich mit der biochemischen Rezeptoranalyse. Pathologe* 10: 31-38.

- SCHAUMBURG-LEVER G (1987): *The alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase technique in dermatopathology. J Cutan Pathol* 14: 6-9.
- SCHRAG D, KUNTZ KM, GARBER JE, WEEKS JC (1997): *Decision analysis-effects of prophylactic mastectomy and oophorectomy on life expectancy among women with BRCA1 or BRCA2 mutations. N Engl J Med* 336: 1465-71.
- SHAUL PW (1999): *Rapid activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. Steroids* 64: 28-34.
- SHETTY MR, REIMAN HM Jr (1997): *Tumor size and axillary metastasis a correlative occurrence in 1244 cases of breast cancer between 1980 and 1995. Eur J Surg Oncol* 23: 139-41.
- SHI SR, KEY ME, KALRA KL (1991): *Antigen retrieval in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem* 39: 741-8.
- SIMONCINI T, HAFEZI-MOGHADAM A, BRAZIL DP, LEY K, CHIN WW, LIAO JK (2000): *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. Nature* 407: 538-41.
- SINGLETARY SE, ALLRED C, ASHLEY P, BASSETT LW, BERRY D, BLAND KI, BORGES PI, CLARK G, EDGE SB, HAYES DF, HUGHES LL, HUTTER RV, MORROW M, PAGE DL, RECHT A, THERIAULT RL, THOR A, WEAVER DL, WIEAND HS, GREENE FL (2002): *Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. J Clin Oncol* 20: 3628-36.
- SLATTERY ML, KERBER RA (1993): *A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. The Utah Population Database. JAMA* 270: 1563-8.
- SON K, KIM YM (1995): *In vivo cisplatin-exposed macrophages increase immunostimulant-induced nitric oxide synthesis for tumor cell killing. Cancer Res* 55: 5524-7.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (1992): *Statistisches Jahrbuch 1992. Metzler poeschel* 464-473
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2004):
<http://www.presseportal.de/print.htx?nr=521380>
- STUEHR DJ, MARLETTA MA (1987): *Synthesis of nitric and nitrate in murine macrophage cell lines. Cancer Res* 47: 5590-4.
- STUEHR DJ, CHO HJ, KWON NS, WEISE MF, NATHAN CF (1991): *Purification and characterisation of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc Natl Acad Sci* 88: 7773-3.
- SUTHERLAND RM, RASEY JS, HILL RP (1988): *Tumor biology. Am J Clin Oncol* 11: 253-74.
- TARONE RE, CHU KC (2002): *The greater impact of menopause on ER- than ER+ breast cancer incidence: a possible explanation (United States). Cancer Causes Control* 13: 7-14.
- TENG B, MURTHY KS, KUEMMERLE JF, GRIDER JR, SASE K, MICHEL T, MAKHLOUF GM (1998): *Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. Am J Physiol* 275: G342-51.

- THOMSEN LL, LAWTON FG, KNOWLES RG, BEESLEY JE, RIVEROS-MORENO V, MONCADA S (1994): *Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. Cancer Res* 54: 1352-4.
- THOMSEN LL, MILES DW, HAPPERFIELD L, BOBROW LG, KNOWLES RG, MONCADA S (1995): *Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. Br J Cancer* 72: 41-44.
- TOI M, KONDO S, SUZUKI H, YAMAMOTO Y, INADA K, IMAZAWA T, TANIGUCHI T, TOMINAGA T (1996): *Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. Cancer* 77: 1101-6.
- TSCHUGGUEL W, KNOGLER W, CZERWENKA K, MILDNER M, WENINGER W, ZEILLINGER R, HUBER JC (1996): *Presence of endothelial calcium-dependent nitric oxide synthase in breast apocrine metaplasia. Br J Cancer* 74: 1423-6.
- TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, UNFRIED G, CZERWENKA K, WENINGER W, MILDNER M, GRUBER DM, SATOR MO, WALDHOR T, HUBER JC (1999): *Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer depends on tumor grade. Breast Cancer Res Treat* 56: 145-51.
- TSCHUGGUEL W, PUSTELNIK T, LASS H, MILDNER M, WENINGER W, SCHNEEBERGER C, JANSEN B, TSCHACHLER E, WALDHOR T, HUBER JC, PEHAMBERGER H (1999a): *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression may predict distant metastasis in human melanoma. Br J Cancer* 79: 1609-12.
- VAITINEN P, HEMMINKI K (2000): *Risk factors and age-incidence relationships for contralateral breast cancer. Int J Cancer* 88: 998-1002.
- VAKKALA M, PAAKKO P, SOINI Y (2000): *eNOS expression is associated with the estrogen and progesterone receptor status in invasive breast carcinoma. Int J Oncol* 17: 667-71.
- VAN DER ZEE R, MUROHARA T, LUO Z, ZOLLMANN F, PASSERI J, LEKUTAT C, ISNER JM (1997): *Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. Circulation* 95: 1030-7.
- VAN RAVENSWAAY-CLAASEN HH, KLUIN PM, FLEUREN GJ (1992): *Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. Lab Invest* 67: 166-74.
- VISSCHER DW, TABACZKA P, LONG D, CRISSMAN JD (1995): *Clinicopathologic analysis of macrophage infiltration in breast carcinoma. Pathol Res Pract* 191: 1133-9.
- VON KNETHEN A, BRUNE B (1997): *Cyclooxygenase-2: an essential regulator of NO-mediated apoptosis. FASEB J* 11: 887-95.
- VON MINCKWITZ G, GRISCHKE EM, KAUFMANN M (1994): *Effect of menstrual phase on surgical treatment of breast cancer. Lancet* 344: 403.
- VON MINCKWITZ G, KUHN W, KAUFMANN M, FEICHTER GE, HEEP J, SCHMID H, BASTERT G (1994a): *Prognostic importance of DNA-ploidy and S-phase fraction in endometrial cancer. Int J Gynecol Cancer* 4: 250-256.

- VON MINCKWITZ G, COSTA SD, EIERMANN W, BLOHMER JU, TULUSAN AH, JACKISCH C, KAUFMANN M (1999): *Maximized reduction of primary breast tumor size using preoperative chemotherapy with doxorubicin and docetaxel. J Clin Oncol* 17:1999-2005.
- WEIDNER N, FOLKMAN J, POZZA F, BEVILACQUA P, ALLRED EN, MOORE DH, MELI S, GASPARINI G (1992): *Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst* 84: 1875-87.
- WEINER CP, LIZASOAIN I, BAYLIS SA, KNOWLES RG, CHARLES IG, MONCADA S (1994): *Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. Proc Natl Acad Sci* 91: 5212-16.
- WENINGER W, RENDL M, PAMMER J, MILDNER M, TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, STURZL M, TSCHACHLER E (1998): *Nitric oxide synthases in Kaposi's sarcoma are expressed predominantly by vessels and tissue macrophages. Lab Invest* 78: 949-55.
- WILSON KT, FU S, RAMANUJAM KS, MELTZER SJ (1998): *Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's oesophagus and associated adenocarcinomas. Cancer Res* 58: 2929-34.
- WINK DA, KASPRZAK KS, MARAGOS CM, ELESURU RK, MISRA M, DUNAMS TM, CEBULA TA, KOCH WH, ANDREWS AW, ALLEN JS, ET AL (1991): *DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. Science* 254: 1001-3.
- WOOSTER R, BIGNELL G, LANCASTER J, SWIFT S, SEAL S, MANGION J, COLLINS N, GREGORY S, GUMBS C, MICKLEM G (1995): *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature* 378: 789-92.
- XIE K, HUANG S, DONG Z, JUANG SH, GUTMAN M, XIE QW, NATHAN C, FIDLER IJ (1995): *Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. J Exp Med* 181: 1333-43.
- XU W, LIU L (1998): *Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. Cell Res* 8: 251-8.
- XU W, LIU LZ, LOIZIDOU M, AHMED M, CHARLES IG (2002): *The role of nitric oxide in cancer. Cell Res* 12: 311-20.
- ZANETTI M, KATUSIC ZS, O'BRIEN T (2000): *Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. J Vasc Res* 37: 449-56.
- ZEILLINGER R, TANTSCHER E, SCHNEEBERGER C, TSCHUGGUEL W, EDER S, SLIUTZ G, HUBER JC (1996): *Simultaneous expression of nitric oxide synthase and estrogen receptor in human breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat* 40: 205-7.
- ZHANG HT, CRAFT P, SCOTT PA, ZICHE M, WEICH HA, HARRIS AL, BICKNELL R (1995): *Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. J Natl Cancer Inst* 87: 213-9.
- ZHANG J, DAWSON VL, DAWSON TM, SNYDER SH (1994): *Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. Science* 263: 687-9.

- ZICHE M, MORBIDELLI L, CHOUDHURI R, ZHANG HT, DONNINI S, GRANGER HJ, BICKNELL R (1997): *Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. Proc Natl Acad Sci 99: 2625-34.*
- ZICHE M, MORBIDELLI L, MASINI E, AMERINI S, GRANGER HJ, MAGGI CA, GEPPETTI P, LEDDA F (1994): *Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. J Clin Invest 94: 2036-44.*
- ZICHE M, PARENTI A, LEDDA F, DELL'ERA P, GRANGER HJ, MAGGI CA, PRESTA M (1997a): *Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. Circ Res 80: 845-52.*

ANHANG

Rezeptorstatus in Abhängigkeit des Menopausenstatus

			Menopause zum Zeitpunkt der OP		Gesamt
			Post-menopausal	Prä-menopausal	
Rezeptorstatus positiv	Anzahl		85	51	136
	Erwartete Anzahl		83,0	53,0	136,0
	Residuen		2,0	-2,0	
Rezeptorstatus negativ	Anzahl		12	11	23
	Erwartete Anzahl		14,0	9,0	23,0
	Residuen		-2,0	2,0	
Gesamt	Anzahl		97	62	159
	Erwartete Anzahl		97,0	62,0	159,0

Chi-Quadrat-Tests der Variablen Rezeptor- und Menopausenstatus

	Wert	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,882	,348	,364
Kontinuitätskorrektur	,501	,479	
Likelihood-Quotient	,866	,352	
Exakter Test nach Fisher			
Zusammenhang linear-mit-linear	,876	,349	
Anzahl der gültigen Fälle	159		

Lymphknotenbefall in Abhängigkeit der Tumorgroße

		Lymphknotenbefall vorhanden		Gesamt
		kein Befall	Befall	
T-Stadium	1	54	23	77
	2	36	25	61
	3	1	9	10
	4	1	9	10
Gesamt		92	66	158

Korrelationen der Variablen Tumorgroße und Lymphknotenbefall

			T-Stadium	Lymphknotenbefall vorhanden
Spearman-Rho	T-Stadium	Korrelationskoeffizient	1,000	,317(**)
		Sig. (2-seitig)	.	,000
		N	163	158
Spearman-Rho	Lymphknotenbefall vorhanden	Korrelationskoeffizient	,317(**)	1,000
		Sig. (2-seitig)	,000	.
		N	158	158

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

eNOS-Expression in Abhängigkeit der Zyklushälfte

		eNOS-Expression		Gesamt
		negativ (0)	positiv (> 1)	
Zyklushälfte zum Zeitpunkt der OP	1. Zyklushälfte	5	18	23
	2. Zyklushälfte	8	10	18
Gesamt		13	28	41

Korrelationen der Variablen eNOS-Expression und Zyklushälfte

			eNOS-Expression	Zyklushälfte zum Zeitpunkt der OP
Spearman-Rho	eNOS-Expression	Korrelationskoeffizient	1,000	-,242
		Sig. (2-seitig)	.	,127
		N	163	41
Spearman-Rho	Zyklushälfte zum Zeitpunkt der OP	Korrelationskoeffizient	-,242	1,000
		Sig. (2-seitig)	,127	.
		N	41	41

Fragebogen für das klinische Follow-up der Patientinnen

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

OP-Datum:

Adresse & Telefonnr. des Frauenarztes:

Datum der letzten Menstruation:

Menopause:

Datum der letzten Untersuchung:

Ist es bei Ihnen zu einem Rezidiv (Wiederauftreten) gekommen?

Wenn ja, wo und wann?

Sind bei Ihnen Metastasen aufgetreten?

Wenn ja, wo und wann?

Waren bei Ihnen Lymphknoten befallen?

Wenn ja, wie viele?

Ist bei Ihnen eine zweite Krebserkrankung bekannt?

Wenn ja welche?

Gibt/Gab es in Ihrer Familie weitere Fälle von Brustkrebs oder andere bösartige, gynäkologische Erkrankungen?

Wenn ja, welche?

Wie ist Ihr momentanes Wohlbefinden?

Gibt/Gab es sonstige besondere Vorkommnisse im Verlauf Ihrer Erkrankung?

Vielen Dank, dass Sie sich die Zeit genommen haben, die Fragen zu beantworten.

Datum:

Unterschrift:

SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Immunhistochemische Bestimmung der eNOS-Expression als möglicher Prognosefaktor bei primären Mammakarzinomen“

in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Kaufmann

unter Betreuung und Anleitung von

Frau PD Dr. med. Sibylle Loibl

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Loibl S, Strank C, von Minckwitz G et al.: Immunohistochemical evaluation of endothelial nitric oxide synthase expression in primary breast cancer. Breast. 2005 Jun;14(3):230-5.

Frankfurt, den 14.05.2007

Cornelia Strank

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Cornelia Strank
Geburtsdatum: 01.08.1976
Geburtsort: Frankfurt/Main
Familienstand: ledig
Eltern: Reinhold Strank, Dipl.Ing.
Maureen Strank, geb. Mc Hugh, Lehrerin

Ausbildung

08/83–06/96 Freie Waldorfschule Frankfurt/Main

06/96 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

10/96 Aufnahme des Medizinstudiums an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt

08/98 Ärztliche Vorprüfung

08/99 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/02 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/02-04/03 Praktisches Jahr:
1. Terial (Innere Medizin) Royal Cornwall Hospital
Truro, England
2. Terial (Neurologie) Krankenhaus Nordwest,
Frankfurt
3. Terial (Chirurgie) Regionalspital Santa Maria,
Visp, Schweiz

05/03 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

07-09/03 Fakultatives Neurologie-Praktikum, King's College
Hospital, London, England

10/03-07-04 Promotionsstudium

08/04-08/05 Pre-Registration House Officer (ÄiP), Royal Hampshire
County Hospital, Winchester, England

seit 01/06 Assistenzärztin in Weiterbildung, Neurologische Klinik,
Krankenhaus Nordwest, Frankfurt

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit so tatkräftig unterstützt haben:

Besonderer Dank gebührt meiner Doktormutter, Frau PD Dr. med. Sibylle Loibl für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas und die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit. Weiterhin gilt mein besonderer Dank für ihre sehr engagierte, sachkundige und umfassende Dissertationsbetreuung nicht zuletzt für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und Anregungen bei der Korrektur.

Prof. Dr. Klaus Strebhardt gilt zudem mein Dank dafür, dass er mir die Arbeit im Labor für molekulare Gynäkologie ermöglichte, für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die verständnisvolle, beratende und motivierende Unterstützung während der experimentellen Ausarbeitung der Dissertation.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. med. M.-L. Hansmann für die Überlassung histopathologischer Befunde und des Paraffinmaterials für die immunhistochemischen Untersuchungen.

Ein weiterer Dank gebührt den Pathologen Prof. Dr. med. H.P. Sinn, PD Dr. med. Fabian sowie Dr. med. Georg Wolf für die Hilfe bei der mikroskopischen Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse.

Den technischen Assistentinnen des Labors für molekulare Gynäkologie verdanke ich Einführungen in die methodischen Schritte der Immunhistochemie und experimentelle Unterstützung. Hervorheben möchte ich Frau Anne Greiner und Herrn Manfred Stegmüller deren geduldige Hilfe im Laboralltag unerlässlich war.

Herzlich danken möchte ich meiner Kollegin Angela Buck die mir bei der Zusammenstellung der klinischen Daten half und die immunhistochemischen Auswertungen der Tumorproben wesentlich unterstützte, sowie Frau Dr. med. Sonja Weber für die zahlreichen Hilfestellungen bei der immunhistochemischen Methodik.

Bei Datenaufarbeitung und statistischer Auswertung waren Beratung und Hilfe von Dr. rer. nat. Dipl.-Phys. K.-H. Tews essentiell.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meinen Geschwistern für die Unterstützung bei dieser Arbeit und während meines ganzen Studiums.

Abschließend danke ich Mark, der eine lange Zeit wiederholte Abwesenheiten und Stimmungsschwankungen tapfer ertragen hat, mich immer wieder dazu motiviert hat weiter zu machen, zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Ratschlägen zur Seite gestanden hat und insbesondere technische Probleme immer zu lösen wusste.