

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig – Maximilians – Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friese

**UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION VON MUCIN1 IM TUMORGEWEBE
VON BRUSTKREBSPATIENTINNEN:
EINE STUDIE ZUR KORRELATION MIT DEM THOMSEN-FRIEDENREICH ANTIGEN
UND MIT HER4 SOWIE PHOSPHO-HER4**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von
MARKUS GERNOT EGGER
aus Graz

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke
Mitberichterstatter: PD Dr. Christian Schindlbeck
PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2014

Eidesstattliche Versicherung

Egger, Markus

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Untersuchungen zur Expression von Mucin1 im Tumorgewebe von
Brustkrebspatientinnen: Eine Studie zur Korrelation mit dem Thomsen-
Friedenreich Antigen und mit Her4 sowie phospho-Her4**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Salzburg am 13.11.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

I. WIDMUNG	I
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1. Das Mammakarzinom	- 1 -
1.1.1. Epidemiologie	- 1 -
1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren.....	- 2 -
1.1.3. Pathohistologie	- 3 -
1.1.4. Therapie	- 4 -
1.1.4.1. Operative Therapie	- 4 -
1.1.4.2. Chemotherapie	- 4 -
1.1.4.3. Radiotherapie	- 5 -
1.1.4.4. Hormontherapie	- 5 -
1.1.4.5. Gezielte Krebstherapie	- 5 -
1.2. Relevante Tumorantigene.....	- 6 -
1.2.1. Mucin1	- 7 -
1.2.1.1. Thomsen-Friedenreich Antigen.....	- 8 -
1.2.2. Rezeptortyrosinkinasen	- 9 -
1.2.2.1. EGFR/Her1	- 9 -
1.2.2.2. Her2/neu.....	- 9 -
1.2.2.3. Her3.....	- 10 -
1.2.2.4. Her4.....	- 10 -
2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	- 11 -
3. MATERIAL UND METHODEN	- 12 -
3.1. Patientinnenkollektiv	- 12 -
3.1.1. Altersverteilung.....	- 12 -
3.1.2. Tumoreigenschaften	- 13 -
3.1.2.1. Herdverteilung	- 13 -
3.1.2.2. Histologische Subtypen und Differenzierung.....	- 13 -
3.2. Verwendetes Material	- 14 -
3.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	- 14 -
3.2.2. Reagenzien	- 15 -
3.2.3. Primärantikörper	- 15 -
3.3. Verfahren.....	- 16 -
3.3.1. Verarbeitung der Gewebeproben	- 16 -
3.3.2. Immunhistochemie.....	- 16 -
3.3.2.1. Allgemeine Grundlagen	- 16 -
3.3.2.2. Durchführung.....	- 17 -
3.3.2.3. Färbeprotokoll von MUC1	- 18 -
3.3.2.4. Färbeprotokoll von TF1	- 18 -
3.3.2.5. Färbeprotokoll von TF2.....	- 19 -
3.3.2.6. Färbeprotokoll von HER4.....	- 20 -
3.3.2.7. Färbeprotokoll von phospho-Her4.....	- 21 -
3.3.3. Bewertung	- 22 -
3.3.4. Statistische Analyse.....	- 23 -

Inhaltsverzeichnis

4. ERGEBNISSE	- 24 -
4.1. Expression von Mucin1 (membranständig)	- 25 -
4.1.1. Berücksichtigung der Differenzierung	- 25 -
4.1.2. Berücksichtigung der Histologie	- 26 -
4.1.3. Berücksichtigung der Herdverteilung	- 27 -
4.1.4. Photodokumentation	- 28 -
4.2. Expression von Mucin1 (zytoplasmatisch)	- 29 -
4.2.1. Berücksichtigung der Differenzierung	- 29 -
4.2.2. Berücksichtigung der Histologie	- 30 -
4.2.3. Berücksichtigung der Herdverteilung	- 31 -
4.2.4. Photodokumentation	- 32 -
4.3. Expression von TF1	- 33 -
4.3.1. Berücksichtigung der Differenzierung	- 33 -
4.3.2. Berücksichtigung der Histologie	- 34 -
4.3.3. Berücksichtigung der Herdverteilung	- 35 -
4.3.4. Photodokumentation	- 36 -
4.4. Expression von TF2	- 37 -
4.4.1. Berücksichtigung der Differenzierung	- 37 -
4.4.2. Berücksichtigung der Histologie	- 38 -
4.4.3. Berücksichtigung der Herdverteilung	- 39 -
4.4.4. Photodokumentation	- 40 -
4.5. Expression von Her4	- 41 -
4.5.1. Berücksichtigung der Differenzierung	- 41 -
4.5.2. Berücksichtigung der Histologie	- 42 -
4.5.3. Berücksichtigung der Herdverteilung	- 43 -
4.5.4. Photodokumentation	- 44 -
4.6. Expression von phospho-Her4	- 45 -
4.6.1. Berücksichtigung der Differenzierung	- 45 -
4.6.2. Berücksichtigung der Histologie	- 46 -
4.6.3. Berücksichtigung der Herdverteilung	- 47 -
4.6.4. Photodokumentation	- 48 -
4.7. Korrelationen	- 49 -
4.7.1. Gesamtanalyse	- 49 -
4.7.2. Berücksichtigung der Differenzierung	- 49 -
4.7.3. Berücksichtigung Histologischer Subtypen	- 51 -
4.7.4. Berücksichtigung von Histologie und Differenzierung	- 53 -
4.7.5. Berücksichtigung der Herdverteilung	- 54 -
4.8. Überlebensdaten	- 55 -
5. DISKUSSION.....	- 58 -
6. ZUSAMMENFASSUNG	- 68 -
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	- 70 -
8. ANHANG	- 80 -
9. DANKSAGUNG	- 82 -

I. Widmung

Allen Frauen, die sich im Kampf gegen den Brustkrebs befinden

II. Abkürzungsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	<i>Grad Celsius</i>
4ICD	<i>Intrazelluläre Domäne von Her4</i>
ABC	<i>Avidin Biotin Komplex</i>
Akt/PKB	<i>AK-Thymoma, Proteinkinase B</i>
Best.Nr.	<i>Bestellnummer</i>
BET	<i>Brust erhaltende Therapie</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer Gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer Gene 2</i>
C2GNT	<i>Core-2-β1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CIS	<i>Carcinoma in Situ</i>
Cyt1	<i>Zytoplasmatische Domäne von Her4</i>
Cyt2	<i>Zytoplasmatische Domäne von Her4</i>
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidin</i>
dest.	<i>destilliert</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EGF(R)	<i>Epidermal Growth Factor (Receptor)</i>
engl.	<i>englisch</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>
ErbB1-4	<i>Erythroblastosis Virus B1-4</i>
Her1-4	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 1-4</i>
IRS	<i>Immunreactive Score</i>
JmA	<i>Extrazelluläre Domäne von Her4</i>
JmB	<i>Extrazelluläre Domäne von Her4</i>
Lj.	<i>Lebensjahre</i>
Lsg.	<i>Lösung</i>
MEK	<i>Mitogen Activated Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
min	<i>Minuten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MRM	<i>Modifizierte Radikale Mastektomie</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Muc1	<i>Mucin1</i>
neg	<i>negativ</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung</i>
phospho	<i>phosphoryliert</i>
pos	<i>positiv</i>
PP	<i>Prozentsatz Positiver Zellen</i>
PR	<i>Progesteronrezeptor</i>
pY	<i>phosphoryliertes Tyrosin</i>
RAS-MAP	<i>Rat Sarcome – Mitogen Activated Proteine</i>
SI	<i>Färbungsintensität</i>
ST3Gal I	<i>β-Galactoside-α2,3-Sialyltransferase</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAA	<i>Tumor-assoziiertes Antigen</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i>
TF-Antigen	<i>Thomsen-Friedenreich Antigen</i>
Tr.	<i>Tropfen</i>
TSA	<i>Tumor-spezifisches Antigen</i>
Verd.	<i>Verdünnung</i>
vgl.	<i>vergleiche</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine maligne Entartung der Milchgänge oder der Drüsenendstücke der Brustdrüse, die sowohl bei Frauen, als auch bei Männern auftreten kann [1].

1.1.1. Epidemiologie

Die WHO verzeichnete 2013 weltweit etwa 508.000 Brustkrebs bedingte Sterbefälle [2], bei weltweit geschätzten 1,2 Millionen jährlichen Neuerkrankungen, womit das Mammakarzinom damit weltweit zur häufigsten krebsbedingte Todesursache bei Frauen gehört [3].

Laut Zentrum für Krebsregisterdaten Deutschland 2014 gehörte das Mammakarzinom im Jahre 2010 mit rund 70.000 Neuerkrankungen jährlich (Inzidenzrate 86,4 pro 100.000 Einwohner) mit Abstand zur häufigsten bösartigen Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Im selben Jahr wurden 17.466 Brustkrebs-bedingte Todesfälle in Deutschland registriert. Die 5-Jahreprävalenz im Jahre 2010 für Deutschland betrug 307.800 Fälle. [4].

Im Gegensatz zu anderen malignen Erkrankungen tritt Brustkrebs bei Frauen in wesentlich jüngeren Jahren auf. Ein Viertel aller betroffenen Frauen ist bei der Diagnosestellung 55 Jahre oder jünger, jede zehnte Patientin ist sogar unter 45 Jahre alt [4].

Die Prognose des Mammakarzinoms kann durch die relative 5-Jahres-Überlebensrate ausgedrückt werden, die von 2007 bis 2008 in Deutschland für Frauen etwa 87% ausmachte [4].

Bei Männern beträgt die jährliche Neuerkrankungsrate bin Deutschland rund 600, womit diese Erkrankung bei Männern eine Rarität darstellt [4].

1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist noch nicht in voller Gänze geklärt. Man muss bei der Tumorentstehung von einer multifaktoriellen Genese ausgehen. Klinisch- epidemiologische sowie genetische Arbeiten lassen dabei den Fokus auf eine Reihe sozialer und biologischer Risikofaktoren für die Entstehung des Brustkrebst richten (vgl. Tabelle 1) [5, 6].

Tabelle 1 Risikofaktoren [5, 6]

Risikofaktor	Risikogruppe	Relatives Risiko
Alter bei Menarche	Alter bei Menarche <11.Lj.	3,0
Alter bei Menopause	Alter bei Menopause >55. Lj.	2,0
Alter bei Erstgeburt	erste Geburt nach dem 30. Lj.	1,9
Anzahl der Geburten	Nulliparität	1,5
Vorangegangene Brusterkrankungen	Mastopathia cystica fibrosa (Schweregrad 3)	4,0-5,0
Orale Kontrazeptiva	Während der Einnahme bis 10 Jahre später	1,24
Hormonersatztherapie	Einnahme > 10 Jahre	1,35
Postmenopausales Körpergewicht	BMI>35	2,0
Exposition mit ionisierter Strahlung	Abnormal hohe Exposition bei jungen	3,0
Familiäre Brustkrebsanamnese	1 Fall in der Verwandtschaft 1. Grades	1,8
	2 Fälle in der Verwandtschaft 1. Grades	2,9
	3 Fälle in der Verwandtschaft 1. Grades	3,9
Geographische Lage	Afrika, Südamerika oder Südostasien	5,0

Etwa 5 % der Brustkrebserkrankungen sind familiär bedingt. Nur in einem kleinen Anteil findet man dabei definierte Genmutationen, die mit der Entstehung eines Mammakarzinoms assoziiert sind. Die höchste Erkrankungswahrscheinlichkeit findet man bei Frauen mit Mutation in den Breast-Cancer-Genen BRCA1 und BRCA2. Dabei handelt es sich um DNA- Reparaturgene, bei deren Verlust die Karzinomwahrscheinlichkeit für Trägerinnen des mutierten BRCA1 mit 65 %, für Trägerinnen des mutierten BRCA2 mit 45 % beschrieben wird [7].

1.1.3. Pathohistologie

Mammakarzinome werden in nicht-invasive und invasive Karzinome eingeteilt. Bei den nicht invasiven Formen handelt es sich um sogenannte Carcinomae in situ.

Der häufigste histologische Subtyp des Mammakarzinoms ist mit etwa 70-80 % das invasive Adenokarzinom der Milchgänge. Dieses wird als invasives duktales Karzinom (IDC) bezeichnet [8]. Zu dieser eher heterogenen Gruppe werden unter anderem auch die szirrhösen Mammakarzinome, eine Sonderform des invasiv duktales Karzinoms gezählt [9]. Das duktales Karzinom innerhalb der Epidermis der Mamille wird auch als Paget Karzinom bezeichnet.

In 10% der Fälle findet man das invasiv lobuläre Karzinom (ILC), das von den Drüsenlappen ausgeht.

Seltener (<5%) vorkommende Subtypen sind die invasiv tubulären, muzinösen, medullären, papillären Karzinome und gemischte Tumortypen.

Mit 15-20% aller Mammakarzinome sind die duktales Carcinomae in situ die häufigsten nicht invasiven Karzinome und machen 95% ihrer Gruppe aus. In den restlichen 5% der Fälle findet man beim nicht invasiven Mammakarzinom das lobuläre Carcinoma in situ.

Diese histologischen Subtypen unterscheiden sich in ihrem Ausbreitungsmuster, ihrer klinischen Erscheinung, den Befunden bei der Mammographie und anderer bildgebender Diagnostik und in der Prognose. Während sich duktales und lobuläre Karzinome hinsichtlich Therapie und Prognose kaum unterscheiden, kann man bei den selteneren tubulären, muzinösen, medullären und papillären Karzinome günstigere Prognosen verzeichnen [8].

Neben dem histologischen Subtyp wird bei der pathologischen Primärdiagnostik auch noch der Hormonrezeptorstatus bestimmt. Dabei wird immunhistochemisch das Vorhandensein des Östrogenrezeptors, beziehungsweise des Progesteronrezeptors untersucht. Das Vorliegen eines Östrogenrezeptors gilt dabei als wichtiger Prognosefaktor und ist mit einem höheren Gesamtüberleben assoziiert [10]. Etwa 60% der Mammakarzinome sind Hormonrezeptor positiv und bieten die Möglichkeit einer antihormonellen Therapie [11].

1.1.4. Therapie

Zielsetzung der Therapie des Mammakarzinoms soll im Frühstadium eine kurative und beim metastasierten Karzinom eine palliative Behandlung mit Lebenszeitverlängerung und Linderung der Beschwerden sein. Dabei wird die Therapie anhand individueller Faktoren dem Patienten angepasst [12].

Im Folgenden sollen für den Überblick die wichtigsten Strategiepunkte der Mammakarzinom-Therapie zusammengefasst werden:

1.1.4.1. Operative Therapie

Basis der operativen Therapie ist die Resektion in sano (R0-Resektion) [13].

Zur Auswahl stehen dabei zwei etablierte Operationsmethoden. Die brusterhaltende Therapie (BET) und die modifizierte radikale Mastektomie (MRM), wobei die BET mit nachfolgender Radiatio der gesamten Brust bezüglich des Überlebens der MRM gleichwertig ist [14]. Gleichzeitig sollte die histologische Beurteilung des Sentinel-Lymphknotens erfolgen und, falls dieser positiv ist, oder die Untersuchung nicht durchgeführt wurde, eine axilläre Lymphadenektomie folgen [15].

Nach jeder radikalen Mastektomie stehen Möglichkeiten zu einer sofortigen, oder späteren plastischen Rekonstruktion der Brust zur Verfügung [16].

1.1.4.2. Chemotherapie

Empfohlen wird eine Zytostatikatherapie für alle Hormonrezeptor-negativen Tumore, Nodal-positiven Tumoren, schlechten Differenzierungen (G3) und jungen Patientinnen unter dem 35. Lebensjahr [17].

Ist eine Chemotherapie indiziert, kann diese vor der Operation (neoadjuvant) oder danach (adjuvant) durchgeführt werden, wobei beide Verfahren hinsichtlich des Gesamtüberlebens gleichwertig sind [18].

Neoadjuvante Chemotherapie sollten Anthrazykline und Taxane enthalten [18]. Eine adjuvante Chemotherapie sollte ebenfalls mit einem Taxan durchgeführt werden [19].

1.1.4.3. Radiotherapie

Beim invasiven Karzinom sollte nach einer brusterhaltender Operation eine Bestrahlung der betroffenen Brust durchgeführt werden. Auch nach Mastektomie wird eine postoperative Radiotherapie der Brustwand empfohlen, da diese das Risiko eines Lokalrezidivs senkt [20].

1.1.4.4. Hormontherapie

Bei Patientinnen mit immunhistochemisch-positivem Östrogen- und oder Progesteronrezeptor ist eine endokrine Behandlung indiziert [21].

Dabei kann die Hormontherapie simultan oder sequentiell zur Radiotherapie [22], sollte aber nach der Chemotherapie durchgeführt werden [21].

Bei prämenopausalen Patientinnen wird dazu der Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen für 5 Jahre eingesetzt [21].

Bei Patientinnen nach der Menopause sind Aromatasehemmer der 3. Generation gegenüber Tamoxifen überlegen, sodass diese hier auch in Kombination mit Tamoxifen zum Einsatz kommen [23].

1.1.4.5. Gezielte Krebstherapie (engl. *targeted therapy*)

Bei der gezielten Krebstherapie handelt es sich um ein Therapiekonzept, bei dem auf die biologischen und zytologischen Eigenarten des Tumorgewebes eingegangen wird. Dazu gehören Behandlungen mit Antikörpern, die gegen Tumroantigene, beziehungsweise Antagonisten, die gegen karzinomspezifische Rezeptoren gerichtet sind. Dadurch kann es zur Wachstumsheftung, Apoptose-Induktion, Störung von Stoffwechselwegen oder Angiogenese-Hemmung kommen. Etabliert ist die gezielte Krebstherapie neben dem Mammakarzinom, auch beim Lymphomen, dem Multiplen Myelom, dem Prostatakarzinom, Melanomen und anderen Karzinomen [24].

Beim Mammakarzinom gehört die immunhistochemische Suche nach Her2 Überexpression zur Standarddiagnostik. Bei positivem Nachweis sollte eine einjährige Therapie mit Trastuzumab begonnen werden. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen die Rezeptortyrosinkinase Her2 gerichtet ist, und damit dessen Wachstums-stimulierendes Potential inhibiert [25].

1.2. Relevante Tumorantigene

Tumorantigene sind Merkmale, die von Tumorzellen exprimiert werden und dazu im Stande sind eine Immunreaktion auszulösen [26]. Sie entstehen durch verändertes Genom in der Tumorzelle, oder durch eine Veränderung der Genexpression. Dabei können neue oder embryonale Genprodukte exprimiert oder bestehende Genprodukte amplifiziert werden. Dadurch entstehen Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und Tumorzellen. Die Antigene können dabei membranständig, intrazellulär oder gesheddet im extrazellulären Raum vorkommen [27].

Man unterscheidet Tumor-spezifische Antigene (TSA) und Tumor-assoziierte Antigene (TAA). Die Tumor-spezifische Antigene, auch Neoantigene genannt stellen dabei neuartige fremde Genprodukte dar, die nur von jenen Tumorzellen exprimiert werden, während die Tumor-assoziierten Antigene auch in gesunden Zellen vorkommen, bei Tumorzellen aber überexprimiert sind [28].

Bisher sind über 2000 verschiedene Tumorantigene indentifiziert, die von verschiedensten Tumoren ausgeprägt werden [29]. Diese Tumorantigene stellen ein potentiell Ziel in der sogenannten „targeted therapy“, der gezielten Krebstherapie dar [24].

Viele Tumorantigene werden allerdings nur an bestimmten Tumoren und dort dann meist auch nur in einem gewissen Anteil der Fälle exprimiert. Die Überexpression von Her2/neu beim Mammakarzinom tritt beispielsweise nur bei 20 bis 25 % aller Karzinome auf. Weshalb nur in diesen Fällen eine Therapie mit dem HER2/neu-spezifischen Antagonisten Trastuzumab Sinn macht [30]. Daher steht die Suche nach neuen Tumorantigenen im Zentrum der Forschung.

Im Folgenden werden die Tumorantigene Mucin1 mit dessen Epitop, dem Thomsen-Friedenreich Antigen, sowie die Rezeptortyrosinkinase Her4 vorgestellt, die als potentielle Ziele in der Therapie des Mammakarzinoms gehandhabt werden:

1.2.1. Mucin1

Mucin1 ist ein 300-400 kDa schweres Transmembranprotein, das in allen Organen des Menschen vorkommt [31]. Die C-terminale Untereinheit bildet dabei die transmembranene Domäne des Proteins, während sich die N-terminale Untereinheit im Extrazellulärraum befindet [32].

Unter der Bezeichnung Ca 15-3 ist Mucin1 auch als Tumormarker beim Mammakarzinom [33] und beim Ovarialkarzinom [34] im Einsatz.

Im gesunden Organismus befindet sich Mucin1 apikal an den sekretorischen Epithelzellen [35]. Aufgrund der Länge von 200-500nm und der negativen Ladung wird Mucin1 auch eine anti-adhäsive Funktion postuliert, wodurch die Anheftung anderer Zellen und Mikroorganismen an den Epithelzellen vermindert wird [36, 37].

Mucin1 wird eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zugesprochen. So findet man eine Mucin1 Überexpression auf einer Vielzahl epithelialer Tumore, wie zum Beispiel dem Adenokarzinomen, Lymphomen, dem Multiplen Myelom und auch beim Mammakarzinom. Während der Tumorgenese verlieren die Tumorzellen dabei ihre Polarität und Mucin1 wird daraufhin nicht mehr nur an der apikalen Membran exprimiert. Dadurch werden Zelladhäsionen vermindert und Metastasierungsprozesse begünstigt [31].

Wie bereits erwähnt eignen sich Tumorantigene hervorragend als Ziele in der sogenannten „targeted therapy“. Dabei seien drei Dinge erwähnt, die Mucin1 zu einem brauchbaren Ziel für eine Immuntherapie machen [38-44]:

- a. Mucin1 ist in Karzinomen überexprimiert, wodurch Tumorzellen mehr Angriffsfläche für applizierte Antikörper bilden.
- b. Mucin1 wird in Tumoren nicht nur apikal, sondern über die gesamte Zelloberfläche verteilt, sodass auch dadurch systemisch verabreichte Antikörper besser angreifen können.
- c. Mucin1 in Tumorzellen zeigt eine abnormale O-Glykosylierung. Dabei werden neue Epitope von Mucin1 freigelegt, die gesundes Gewebe nicht exprimiert. Damit können in der spezifischen Therapie die Tumorzellen vom gesunden Gewebe differenziert werden. Eines dieser Epitope ist das Thomsen Friedenreich Antigen.

1.2.1.1. Thomsen-Friedenreich Antigen

Das Thomsen–Friedenreich Epitop (TF-Antigen) beinhaltet das Kohlenhydratmolekül Galactose- β 1–3N-acetylgalactosamine (Gal β 1–3GalNAc).

Es wird postuliert, dass es sich beim Thomsen-Friedenreich Epitop um ein blutgruppenbezogenes, spezifisches, onkofetales Antigen handelt, das in normalem Gewebe nur begrenzt vorhanden ist [45]. So wird das TF-Antigen einerseits in Tumorzellen als Oberflächenepitop auf dem Trägerprotein Mucin1 exprimiert, sodass man es in mehr als 85% der humanen Karzinome finden kann [46]. Andererseits wurde herausgefunden, dass das TF-Antigen physiologisch von Throphoblasten [47], Syncytiotrophoblasten [48], als auch von fetalen Epithelien und Mesothelien [49] exprimiert wird.

In Tumoren entsteht die Expression des TF-Antigens durch eine inkompletten Synthese von O-Glykanen an dem Trägerprotein. Dadurch wird vermehrte Kommunikation und Interaktion zwischen Tumorzellen und Endothezellen gestattet, was unter anderem die Tumorprogression und Metastasierung dieser Tumorzellen begünstigt [50].

Das Thomsen-Friedenreich Antigen wird dadurch als mögliches Ziel für eine immunvermittelte Therapie angesehen [51, 52]. In Versuchen mit einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit JAA-F11, einem monoklonalen Immunglobulin gegen das TF-Antigen, den Metastasierungsprozess inhibieren kann und damit die Prognose verbessert [52].

Auch diagnostische Wertigkeit wird dem TF-Antigen zugesprochen. Es wird angenommen, dass durch das Expressionsmuster oberflächlicher Antigene metastasierte Tumorzellen von Zellen des Primärtumors unterschieden werden können [53, 54].

1.2.2. Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen sind Transmembranproteine, deren C-terminale intrazelluläre Domäne eine Enzymaktivität besitzt, die Tyrosinreste von Proteinen phosphorylieren kann. Dadurch wird nach Ligandenbindung eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, wodurch unter anderem Gene aktiviert werden, die für das Zellwachstum verantwortlich sind [55].

1.2.2.1. EGFR/Her1

Der Her1-Rezeptor, auch epidermal growth factor receptor, kurz EGFR genannt bindet vornehmlich Wachstumsfaktoren, wie EGF, oder transforming growth factor α . Die darauffolgende Signalkaskade wird durch Dimerisierung und Phosphorylierung der Tyrosinreste vermittelt, wodurch Signalmoleküle wie Akt/PKB, MEK oder STAT-Proteine aktiviert werden, die allesamt letztendlich das Zellwachstum stimulieren und eine antiapoptotische Wirkung aufweisen. Der EGF-Rezeptor wird in vielen Tumoren hochreguliert oder mutiert vorgefunden, wodurch das Zellwachstum unkontrolliert abläuft [56].

Dieser Umstand macht Her1 zu einem Ziel im sogenannten „targeted therapy“ Konzept, wobei Antagonisten wie Gefitinib, Erlotinib oder die monoklonalen Antikörper Panitumumab und Cetuximab bei einigen Tumoren bereits zum Einsatz kommen [57].

1.2.2.2. Her2/neu

Her2/neu, auch ErbB2 genannt gehört ebenfalls zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptortyrosinkinasen hat Her2 keinen physiologischen Liganden. Seine Rolle in der Signaltransduktion spielt es daher vor allem in der Heterodimerisation mit anderen Mitgliedern der Rezeptortyrosinkinase-Familie nach deren Ligandenbindung [58]. Dabei werden über den RAS-MAP-Kinase-Weg das Zellwachstum stimuliert und über den mTOR-Signalweg die Apoptose gehemmt [59].

Durch Genamplifikation, wie bei etwa 20% aller Mammakarzinome kann das Her2-Protein, komplett ligandenunabhängig aktiviert, als Homodimer das Tumorstadium stimulieren.

Dies macht Her2/neu zu einem geeigneten Ziel für die gezielte Krebstherapie, wobei der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab bereits zur klinischen Routine gehört [58]

1.2.2.3. Her3

Bei Her3, auch ErbB3 genannt handelt es sich um ein eher weniger erforschtes Mitglied der Rezeptortyrosinkinasen-Familie. Auch hier sind Mutationen mit einigen Krebserkrankungen assoziiert. Her3 wird eher eine geringere intrinsische Tyrosinkinaseaktivität bescheinigt, wodurch der Einfluss auf das Zellwachstum nicht sehr ausgeprägt sein dürfte. Eine entscheidendere Rolle soll Her3 dagegen in der Resistenzbildung der Her2/neu-gerichteten Therapie spielen, weshalb auch diese Tyrosinkinase eine Rolle in der sogenannten „targeted therapy“ spielen könnte [60].

1.2.2.4. Her4

Her4, auch ErbB4 genannt ist ein weiteres Mitglied der Familie der Rezeptortyrosinkinasen [61]. Auch dieses Mitglied dieser Enzymgruppe gehört zu den bisher weniger erforschten [62].

Physiologischerweise spielt Her4 gemeinsam mit Her2/neu eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems und des ZNS in der Embryonalentwicklung [63, 64]. Mutationen von Her4 dagegen sind mit malignen Tumoren [65], aber auch mit Schizophrenie [66] assoziiert.

Bisher können über 10 verschiedene Liganden aus 2 Ligandenfamilien für Her4 identifiziert werden. Dazu gehören die Untergruppen der EGF-, und der Neuregulin/Heregulin-Familie.

Wie bei den anderen Rezeptortyrosinkinasen kommt es auch bei Her4 nach Ligandenbindung zur Phosphorylierung der Tyrosinreste und Dimerisierung der intrazellulären Rezeptoruntereinheiten, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird [65]. Dadurch werden zumeist Signalwege und Gene aktiviert, die im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Rezeptorenfamilie, vor allem die Zelldifferenzierung stimulieren und das Wachstum der Zelle stoppen. Dies hat Her4 die Rolle eines Tumorsuppressor eingebracht [67].

Aufgrund der großen Anzahl an Liganden und der durch alternatives Spleißen bedingten großen Varietät an Rezeptoruntereinheiten, entsteht jedoch eine Komplexität dieses Rezeptors, die eine genaue Aussage über die Rolle von Her4 beim Zellwachstum nicht zulässt [58].

2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Tumorantigene als Ziel bei der sogenannten „targeted therapy“ stellen ein wichtiges Konzept in der Mammakarzinom-Therapie dar.

Da viele Tumorantigene jedoch nicht von allen Mammakarzinomen exprimiert werden, ist eine ständige Suche nach weiteren potentiellen targets für eine gezielte Therapie sinnvoll. Eine erweiterte Antigen-Diagnostik könnte somit jeder Patientin eine individuelle, auf ihren Karzinom-Charakter abgestimmte Therapie ermöglichen und somit ihre Prognose verbessern.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher das Expressionsverhalten einiger relevanter Antigene mittels immunhistochemischer Färbung an Paraffinschnitten analysiert werden. Der Fokus lag dabei zum einen bei dem transmembranen Glykoprotein Mucin1, das in vielen Mammakarziomen überexprimiert ist. Des Weiteren wurde die Ausprägung des Thomsen-Friedenreich Antigen, einem Mucin1-Kohlenhydratepitop überprüft, wobei hier zwei unterschiedliche Stellen des Epitops beleuchtet wurden und im Folgenden als TF1 und TF2 bezeichnet werden. Auch die Expression der Tyrosinkinase Her4 beziehungsweise seiner phosphorylierten und damit aktivierten Form, phospho-Her4 wurde untersucht.

So wurde in der vorliegenden Arbeit einerseits die Abhängigkeit der einzelnen Antigenexpressionen vom histologischen Subtyp, der Zelldifferenzierung und der Tumor-Herdverteilung analysiert. Andererseits wurde das Expressionsverhalten der einzelnen Antigene untereinander durch eine Korrelationsanalyse untersucht.

Um zusätzliche Erkenntnisse über die prognostische Relevanz der Überexpression von Mucin1 zu gewinnen, wurden außerdem die Überlebensdaten der Patientinnen analysiert.

3. Material und Methoden

3.1. Patientinnenkollektiv

Das für die Versuchsreihen verwendete pathologische Gewebe stammte von 235 Patientinnen, die aufgrund eines primären Mammakarzinoms in den Jahren zwischen 1998 und 2000 an der Universitätsklinik für Frauenheilkunde der Universität München operiert wurden. Die Gewebeproben wurden intraoperativ entnommen und histologisch aufgearbeitet.

3.1.1. Altersverteilung

Es wurde jeweils das Alter gewertet, das zum Operationszeitpunkt bestand, da an diesem Tag auch das für diese Studie verwendete Gewebe gewonnen wurde. Zur besseren Übersicht wurde das Alter der Patientinnen in 5 Jahres- Klassen eingeteilt und anhand ihrer absoluten Häufigkeit aufgeschlüsselt (vgl. Abbildung 1 und Tabelle 2).

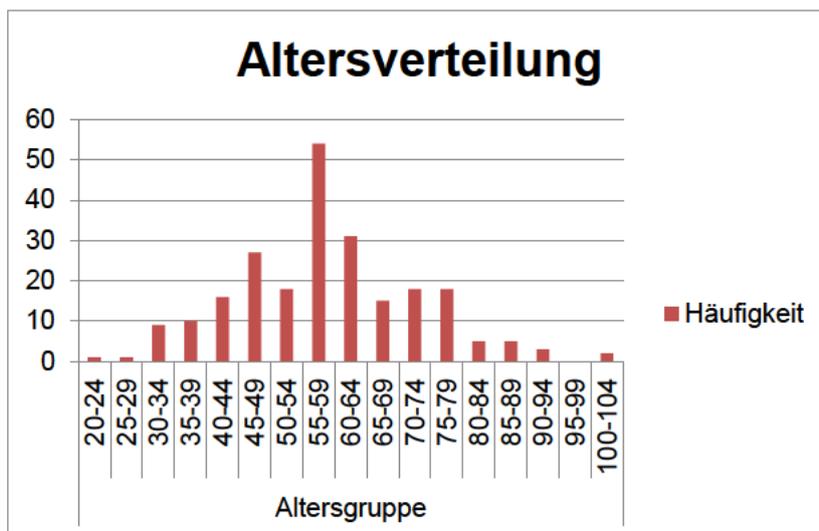


Abbildung 1 Altersverteilung der Patientinnen

Tabelle 2 Altersverteilung

Altersgruppe (Jahre)	absolute Häufigkeit
20-24	1
25-29	1
30-34	9
35-39	10
40-44	16
45-49	27
50-54	18
55-59	54
60-64	31
65-69	15
70-74	18
75-79	18
80-84	5
85-89	5
90-94	3
95-99	0
100-104	2

3.1.2. Tumoreigenschaften

3.1.2.1. Herdverteilung

Unter den 235 operierten Mammakarzinomen fanden sich sowohl unifokale, wie auch multifokale (n= 70) und multizentrische (n=17) Tumorbefallsmuster.

3.1.2.2. Histologische Subtypen und Differenzierung

Das gewonnene pathologische Material wurde in histologische Subtypen klassifiziert. Die histologische Differenzierung (*engl. grading*) der Präparate erfolgte nach internationalen Kriterien der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) in die Grade G1, G2 und G3. Die Verteilung der histologischen Subtypen und der Differenzierung in absoluten Zahlen zeigt folgende Tabelle. (vgl. Tabelle 3)

Tabelle 3 Verteilung der Differenzierung und Subtypen

		Differenzierung				Gesamt:
		unbekannt	G1	G2	G3	
Histologische Subtypen	duktal	5	6	36	22	69
	lobulär	39	4	4	4	51
	szirrhös	2	1	28	18	49
	medullär	8	1	4	11	24
	ductulo-lobulär	6	0	0	3	9
	papillär	2	2	4	1	9
	muzinös	1	1	3	0	5
	unbekannt	11	3	5	0	19
Gesamt:		74	18	84	59	N=235

3.2. Verwendetes Material

3.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Deckgläser 24 x 60 mm spezial	<i>R. Langenbrinck, Teningen</i>
Erlenmeyerkolben 1000 ml	<i>Schott, Mainz</i>
Falconröhrchen Blue Max 15+50ml	<i>Becton Dickinson Labware,</i>
Färbekammer (dunkel mit Deckel)	<i>Schubert+Weiß, München</i>
Glasküvetten x	<i>Werkstatt, Univ. FK Innenstadt</i>
Kamera 3ccd, c-mount	<i>Werkstatt, Univ. FK Innenstadt</i>
Kochfeld Typ THL 2597	<i>JVC Victor Company, Japan</i>
Laborwecker Mod TR118	<i>Rommelsbacher; Dinkelsbühl,</i>
Meßzylinder Plastibrand	<i>Deutschland</i>
Mikroskop Orthoplan 946828 Leitz, Wetzlar	<i>Oregon Scientific, Inc., Oregon,</i>
Minishaker MS1 (Vortex)	<i>USA</i>
Münchener Mappen	<i>Milan SA, Genf, Schweiz</i>
Objektiv 10-fach	<i>Dynatech Guernsey, GB</i>
Objektiv 2,5-fach	<i>IKA-Works, Inc., North</i>
Objektiv 25-fach	<i>Carolina, USA</i>
Objektiv 40-fach	<i>Paul Marienfeld GmbH & Co.</i>
Objektträger SuperFrost Plus 25x75x1,0	<i>KG, Lauda-Königshofen</i>
Objektträgerfärbegestell	<i>Leitz, Wetzlar</i>
Pipettenspitzen, steril, 1000ml	<i>Leitz, Wetzlar</i>
Pipettenspitzen, steril, 100ml	<i>Leitz, Wetzlar</i>
Pipettenspitzen, steril, 10ml	<i>Leitz, Wetzlar</i>
Pipettenspitzen, steril, 300ml	<i>Leitz, Wetzlar</i>
Pipettenspitzen, steril, 5000ml	<i>Leitz, Wetzlar</i>
Pipettierhelfer accu-jet pro	<i>Menzel GmbH & Co KG,</i>
Trockenschrank	<i>Braunschweig</i>
Untersuchungshandschuhe sempercare	<i>Hellma GmbH & Co KG,</i>
Variable Pipette Reference 100-1000ml	<i>Müllheim</i>
Variable Pipette Reference 10-100ml	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Variable Pipette Reference 1-10ml	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Variable Pipette Reference 500-5000ml	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Vari-shaker #G935	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Schnellkochtopf vitafit®	<i>Brand GmbH & Co KG,</i>
	<i>Wertheim</i>
	<i>Heraeus GmbH, Hanau</i>
	<i>Semperit, Wien, Österreich</i>
	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
	<i>Dynatech Guernsey, GB</i>
	<i>Fissler GmbH, Deutschland</i>

3.2.2. Reagenzien

Tabelle 5

Reagenz	Bezugsquelle
30%iges H ₂ O ₂	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
Aqua dest.	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
DAB	Dako North America, Carinteria, USA
Einschlussmittel „Consul-Mount“	Shandon, Pittsburgh, USA
Ethanol	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
Hämalaun nach Mayer	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Vectastain Elite mouse-IgG-Kit	Vectorlabs, Burlingame, California, USA
Vectastain Elite rabbit-IgG-Kit	Vectorlabs, Burlingame, California, USA
Xylol	J. T. Baker, Deventer, Holland
ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit)	Zytomed, Berlin

3.2.3. Primärantikörper

Tabelle 6

Antigene	Antikörper	Bezugsquelle
Muc 1	PankoMab™ (mouse monoclonal)	Firma: Glycotope Bestellnummer: MAB-P101 Lot.Nr.: 184A
Her4	Anti Her 4; rabbit IgG polyklonal	Firma: Epitomics Bestellnummer: S2236; Lot.Nr.: 40065
phospho-Her4	Anti Her 4; rabbit IgG polyklonal	Firma: Epitomics Bestellnummer: 2295-1; Lot.Nr.: YE100204
CD176 (Thomsen- Friedenreich-Antigen; TF1)	Anti CD176; Klon Nemod- TF1 (mouse IgM, kappa)	Firma: Glycotope Bestellnummer: MAB-S302 Lot Nr.: 8-2010
CD176 (Thomsen- Friedenreich-Antigen; TF2)	Anti CD176; Klon A78-G/A7 (mouse IgM)	Firma: Nemod Bestellnummer: MAB-S307; Lot Nr.: 49-2003

3.3. Verfahren

3.3.1. Verarbeitung der Gewebeproben

Um eine Autolyse zu verhindern und eine gute Qualität zu erhalten wurde das intraoperativ gewonnene Gewebe nach Entnahme einem Fixationsprozess unterzogen. Die 24 stündige Fixation wurde mit 4%igem neutral gepuffertem Formalin durchgeführt. Dabei bildete sich ein Gitternetz, indem Formalinmoleküle die Proteine untereinander vernetzten, wodurch eine Denaturierung der Proteine weitgehend ausblieb. Nach der Fixierung wurde das Formalin mit Leitungswasser ausgewaschen. Die darauffolgende Entwässerung wurde mit einem hydrophilen, organischen Lösungsmittel durchgeführt. Dazu durchlief das Gewebe eine Reihe aus einem 70%igem und mehreren absoluten Ethanolbädern. Als Intermedium fungierte Xylol, welches als Brücke zwischen Ethanol und hydrophilen Paraffin, die letzten Reste des Alkohols aus dem Gewebe entfernte. Anschließend wurde das fixierte Gewebe in Paraffin fixiert. Dabei durchdrang das auf 60°C erhitzte und verflüssigte Paraffin das Gewebe und lagerte sich dort ein. Das Gewebe wurde anschließend mit weiterem Paraffin in Form eines Blocks gegossen, welcher nach dem Erkalten mittels Schlittenmikrotom in jeweils 2-3 µm dicke Gewebeschnitte aufgearbeitet wurde. Danach wurden die Schnitte nach Glättung in 45°C warmem Aqua dest. auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Bis zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte nummeriert und in Objektträgermappen aufbewahrt.

3.3.2. Immunhistochemie

3.3.2.1. Allgemeine Grundlagen

Ziel der Immunhistochemie ist der Nachweis spezifischer Antigene, die vom zu untersuchenden Gewebe exprimiert werden können. Die immunhistochemische Färbung basiert auf der Bindung eines spezifischen Primärantikörpers an jenem gesuchten Antigen. Diese Bindung kann durch unterschiedliche Detektionsverfahren sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode verwendet. Dabei wurde ein spezifischer Sekundärantikörper (Brückenantikörper) aufgetragen, welcher über eine Biotin/Glykoproteinverbindung an eine Peroxidase gekoppelt ist und am Primärantikörper bindet (vgl. Abbildung 2). Diese Peroxidase katalysiert nach Zufügen eines Chromogen-Substrats an diesem eine enzymatische Reaktion, in deren Verlauf sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Farbniederschlag bildet. Diese Farbreaktion konnte im Lichtmikroskop analysiert werden.

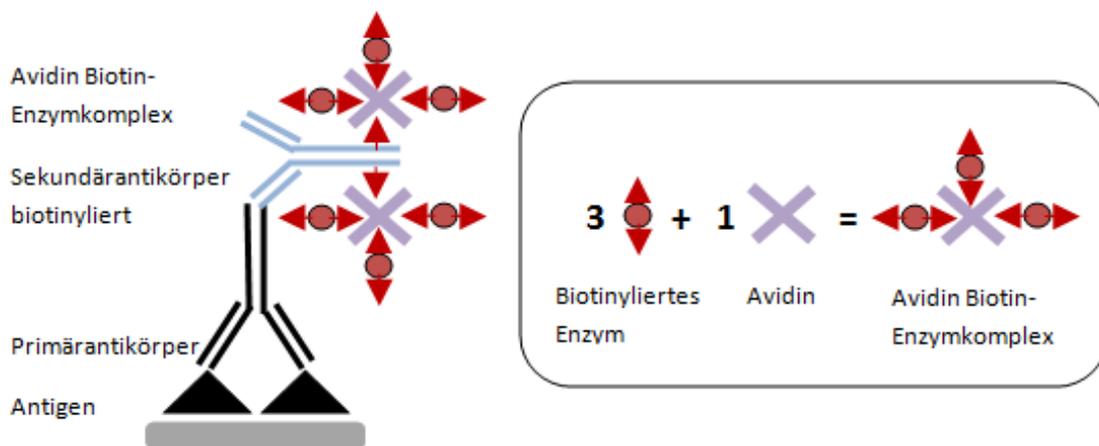


Abbildung 2 ABC-Methode, in Anlehnung an Noll S, Schaub-Kuhnen S: Praxis der Immunhistochemie. München, Jena, Urban & Fischer, 2000, pp 147.

3.3.2.2. Durchführung

Bevor eine immunhistochemische Färbung begonnen wurde, musste zunächst das Paraffin aus dem Gewebe entfernt werden. Anschließend wurden die durch Aldehydvernetzung maskierten Epitope durch Hitzebehandlung mittels Schnellkochtopf demaskiert und eine unspezifische Anlagerung der Antikörper durch ein Blockierserum verhindert. Nach der Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper wurde die eigentliche Färbereaktion zwischen dem AB-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex) und einem Substrat (Chromogen) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte noch gegengefärbt, dehydriert und eingedeckt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte grundsätzlich in einer feuchten Kammer, damit während der einzelnen Inkubationsschritte die Schnitte nicht austrocknen konnten. Gleichzeitig zu den untersuchten Präparaten wurde mit jeder Färbereihe eine Positivkontrolle zur Verifizierung der Färbung und einmalig eine Negativkontrolle zum Ausschluss einer unspezifischen Färbereaktion mitgefärbt. Weitere Details zu den einzelnen Arbeitsschritten während der immunhistochemischen Färbung sind den Färbeprotokollen (Kapitel 3.3.2.3 bis 3.3.2.7) zu entnehmen.

3.3.2.3. Färbeprotokoll von MUC1

Entparaffinieren: für 15 Min. im Xylol → 2 x in 100% Alkohol-Reihe → *Blockierung der endogenen Peroxidase:* 20 Min. in 3%igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte (= 3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol) → 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol- Reihe → in Aqua dest. Spülen → 2x2 Min. in PBS waschen → 20 Min. Blockierungsserum (Vectastain Elite mouse-IgG-Kit) = 3Tr. Normalserum (horse) auf 10ml steriles PBS) inkubieren → Abschütten des Blockierungsserums → *Inkubation mit dem Primärantikörper:* 60 Min. bei RT Primärantikörper = Anti-Muc1-PankoMab (Glycotop; Lot:184A / Verd.:1:1000 in Dako-Verdünnungsmedium) → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem Sekundärantikörper:* 30 Min. Sekundärantikörper (Vectastain Elite mouse-IgG-Kit) = biotinylierter Link-Ak, der den ABC-Komplex bindet = 3Tr. Normalserum + 1Tr. Anti-mouse-IgG + 10ml PBS → währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes (Vectastain Elite mouse-IgG-Kit) = 4Tr. Reagenz A + 4Tr. Reagenz B + 10ml steriles PBS (die Lösung muß 30 Min. vor Gebrauch ruhen) → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem ABC-Komplex:* 30 Min. ABC-Komplex → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem Chromogen:* 2 Min. Substratfärbung mit DAB (3,3 Diaminobenzidin von Dako; Best.Nr.K3468 = 1Tr. DAB-Chromogen + 1ml Substratpuffer) → 2x2 Min. in Aqua dest. Waschen → *Gegenfärbung:* 2 Min. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer → 5 Min. in Leitungswasser bläuen → *Dehydratation:* aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol → *Eindecken* mit „Eukitt“

Positivkontrolle: Endometrium, Niere

3.3.2.4. Färbeprotokoll von TF1

Entparaffinieren: für 15 Min. im Xylol → 2 x in 100% Alkohol-Reihe → *Blockierung der endogenen Peroxidase:* 20 Min. in 3%igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte (= 3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol) → 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol- Reihe → in Aqua dest. Spülen → 2x2 Min. in PBS waschen → 20 Min. Blockierungsserum (Vectastain Elite mouse-IgG-Kit) = 3Tr. Normalserum (horse) auf 10ml steriles PBS) inkubieren → Abschütten des Blockierungsserums → *Inkubation mit dem Primärantikörper:* bei 4°C über Nacht = Anti-TF1; Verd.: 1:100 in Dako-Verdünnungsmedium → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem Sekundärantikörper:* 30 Min. Goat Anti-Mouse IgM biotinyliert; Verd.:1:200 in sterilem

PBS → währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes (Vectastain Elite mouse-IgG-Kit) = 4Tr. Reagenz A + 4Tr. Reagenz B + 10ml steriles PBS (die Lösung muß 30 Min. vor Gebrauch ruhen) → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem ABC-Komplex*: 30 Min. ABC-Komplex → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem Chromogen*: 2 Min. Substratfärbung mit DAB (3,3 Doaminobenzidin von Dako; Best.Nr.K3468 = 1Tr. DAB-Chromogen + 1ml Substratpuffer) → 2x2 Min. in Aqua dest. Waschen → *Gegenfärbung*: 2 Min. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer → 5 Min. in Leitungswasser bläuen → *Dehydratation*: aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol → *Eindecken* mit „Eukitt“

Positivkontrolle: OvarialCa

3.3.2.5. Färbeprotokoll von TF2

Entparaffinieren: für 15 Min. im Xylol → 2 x in 100% Alkohol-Reihe → *Blockierung der endogenen Peroxidase*: 20 Min. in 3%igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte (= 3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol) → 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol- Reihe → in Aqua dest. Spülen → 2x2 Min. in PBS waschen → 20 Min. Blockierungsserum (gelbe Flasche Vectastain Elite mouse-IgG-Kit) = 3Tr. Normalserum (horse) auf 10ml steriles PBS) inkubieren → Abschütten des Blockierungsserums → *Inkubation mit dem Primärantikörper*: bei 4°C über Nacht = Anti-TF2; Verd.: 1:100 in Dako-Verdünnungsmedium → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem Sekundärantikörper*: 30 Min. Goat Anti-Mouse IgM biotinyliert; Verd.:1:200 in sterilem PBS → währenddessen Ansetzen des ABC-Komplexes (graue Flasche Vectastain Elite mouse-IgG-Kit) = 4Tr. Reagenz A + 4Tr. Reagenz B + 10ml steriles PBS (die Lösung muß 30 Min. vor Gebrauch ruhen) → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem ABC-Komplex*: 30 Min. ABC-Komplex → 2x2 Min. in PBS waschen → *Inkubation mit dem Chromogen*: 2 Min. Substratfärbung mit DAB (3,3 Doaminobenzidin von Dako; Best.Nr.K3468 = 1Tr. DAB-Chromogen + 1ml Substratpuffer) → 2x2 Min. in Aqua dest. Waschen → *Gegenfärbung*: 2 Min. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer → 5 Min. in Leitungswasser bläuen → *Dehydratation*: aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol → *Eindecken* mit „Eukitt“

Positivkontrolle: OvarialCa

3.3.2.6. Färbeprotokoll von Her4

Entparaffinieren: für 15 Min. im Xylol → 2 x in 100% Alkohol-Reihe → *Blockierung der endogenen Peroxidase:* 20 Min. in 3%igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte (= 3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol) → 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol- Reihe → in Aqua dest. Spülen → *Demaskierung:* durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Citratpuffer pH 6,0: Lsg. A: 21,01g 0,1M Citronensäure (Merck#244) + 1l Aqua dest. Lsg. B: 29,41g 0,1M Na-Citrat (Merck#6448) + 1l Aqua dest. Gebrauchslösung: 18ml Lsg.A + 82ml Lsg.B + 900ml Aqua dest. → dannach in Aqua dest. Spülen → 2x2 Min. in PBS waschen → *Blockierung der elektrostatischen Ladungen:* 5 Min Blocking Solution (ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) – Reagent 1); sättigt elektrostatische Ladungen ab und verhindert unspezifische hydrophobe Bindung an Membranen oder Fettgewebe → Blocking Solution abkippen → *Inkubation mit dem Primärantikörper:* 4°C über Nacht (16h) = Anti-Her 4; Verd.: 1:200 in PBS → 2x2 Min. in PBS waschen → 20 Min RT Post Block (ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) – Reagent 2) → 2x2 Min. in PBS waschen → 30 Min RT HRP-Polymer (ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) – Reagent 3) → 2x2 Min. in PBS waschen → Inkubation mit dem Chromogen: 2 Min. Substratfärbung mit DAB (3,3 Doaminobenzidin von Dako; Best.Nr.K3468 = 1Tr. DAB-Chromogen + 1ml Substratpuffer) → 2x2 Min. in Aqua dest. Waschen → *Gegenfärbung:* 2 Min. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer → 5 Min. in Leitungswasser bläuen → *Dehydratation:* aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol → *Eindecken* mit „Eukitt“

Positivkontrolle: Vagina, Haut, Plazenta 3. Trimenon

3.3.2.7. Färbeprotokoll von phospho-Her4

Entparaffinieren: für 15 Min. im Xylol → 2 x in 100% Alkohol-Reihe → *Blockierung der endogenen Peroxidase:* 20 Min. in 3%igem H₂O₂ in Methanol für Paraffinschnitte (= 3ml 30%iges H₂O₂ + 97ml Methanol) → 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol- Reihe → in Aqua dest. Spülen → *Demaskierung:* durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Citratpuffer pH 6,0: Lsg. A: 21,01g 0,1M Citronensäure (Merck#244) + 1l Aqua dest. Lsg. B: 29,41g 0,1M Na-Citrat (Merck#6448) + 1l Aqua dest. Gebrauchslösung: 18ml Lsg.A + 82ml Lsg.B + 900ml Aqua dest. → dannach in Aqua dest. Spülen → 2x2 Min. in PBS waschen → *Blockierung der elektrostatischen Ladungen:* 5 Min Blocking Solution (ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) – Reagent 1); sättigt elektrostatische Ladungen ab und verhindert unspezifische hydrophobe Bindung an Membranen oder Fettgewebe → Blocking Solution abkippen → *Inkubation mit dem Primärantikörper:* 4°C über Nacht (16h) = Anti-phospho-Her 4; Verd.: 1:50 in PBS → 2x2 Min. in PBS waschen → 20 Min RT Post Block (ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) – Reagent 2) → 2x2 Min. in PBS waschen → 30 Min RT HRP-Polymer (ZytoChem Plus HRP Polymer System (Mouse/Rabbit) – Reagent 3) → 2x2 Min. in PBS waschen → Inkubation mit dem Chromogen: 2 Min. Substratfärbung mit DAB (3,3 Doaminobenzidin von Dako; Best.Nr.K3468 = 1Tr. DAB-Chromogen + 1ml Substratpuffer) → 2x2 Min. in Aqua dest. Waschen → *Gegenfärbung:* 2 Min. Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer → 5 Min. in Leitungswasser bläuen → *Dehydratation:* aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol → *Eindecken* mit „Eukitt“

Positivkontrolle: Vagina, Haut, Plazenta 3. Trimenon

3.3.3. Bewertung

Die Schnitte wurden mittels Lichtmikroskop optisch anhand ihres Expressionsmusters beurteilt und mittels angebrachter Kamera photodokumentiert.

Desweiteren erfolgte eine Bewertung der immunhistochemischen Expression nach dem immunoreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner (*Remmele and Stegner 1987, Pathologie 8, p.138-140*). Dieser semiquantitative immunoreaktive Score berücksichtigt die Parameter Färbeintensität (Staining Intensity = SI) und den Prozentsatz der immunzytochemisch positiver Zellen (PP) und wird aus dem Produkt dieser beiden Parameter errechnet.

Die Färbeintensität (SI) wird wie folgt unterteilt:

- 0 = keine Färbereaktion*
- 1 = schwache Färbereaktion*
- 2 = mäßige Färbereaktion*
- 3 = starke Färbereaktion*

Der Prozentsatz positiver Zellen (PP) wird eingeteilt in:

- 0 = keine positiven Zellen*
- 1 = < 10% positive Zellen*
- 2 = 10-50% positive Zellen*
- 3 = 51-80% positive Zellen*
- 4 = > 80% positive Zellen*

Durch Multiplikation beider Parameter kann der IRS – Score einen Wert zwischen 0 und einem Maximalwert von 12 annehmen.

3.3.4. Statistische Analyse

Die Datensammlung und statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes SPSS („Statistical Package for the Social Sciences“ oder auch „Superior Performance Software System“) für PC, Version 14.0 (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, Chicago, Illinois 60606, USA) durchgeführt.

Beim statistischen Vergleich von 3 oder mehr Variablen (Auswertung nach Differenzierung oder für Vergleiche von Untergruppen mit kombinierten Variablen) wurde der Kruskal-Wallis H-Test genutzt. Für den Vergleich von 2 unabhängigen Variablen (Herdverteilung) wurde die Signifikanz mittels Mann-Whitney Test analysiert.

Die Auswertung nach der Herdverteilung (unifokal vs. multifokal/multizentrisch) erfolgte durch eine sogenannte „matched pair“-Analyse. Kriterien für das „matching“ waren die Differenzierung und der histologische Subtyp. Es konnten insgesamt 84 Fälle „gematcht“ werden. Daraus folgte eine Paarbildung mit jeweils 42 Fällen, wobei eine Gruppe nur aus Patientinnen mit unifokalen Karzinomen bestand, während die andere Gruppe multifokale und multizentrische Mammakarzinome einschloss. Durch die Anwendung dieser Analyse konnte Strukturgleichheit geschaffen werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit gesenkt wurde, dass die ermittelten Unterschiede aus der Disparität des Patientenkollektivs und nicht aus den Unterschieden der Herdverteilung resultieren.

Die Korrelationen wurden nach Pearson- Rho analysiert, die Signifikanz zweiseitig berechnet.

Das Signifikanzniveau der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ (*) festgelegt, bei $p < 0,01$ (**) als hoch signifikant und $p < 0,001$ (***) als höchst signifikant definiert. Als nicht signifikant gelten Werte von $p > 0,05$.

Die Überlebensdaten wurden mittels Kaplan-Meier Verfahren analysiert und mittels Cox-Regression verglichen.

4. Ergebnisse

Die ermittelten IRS-Werte der einzelnen Tumorantigene wurden im Folgenden zunächst getrennt voneinander betrachtet, wobei beim Antigen Mucin1 ein membranständiges von einem zytoplasmatischen Expressionsmuster differenziert wurde. Bei der Analyse der jeweiligen IRS-Werte wurden sowohl histologische Subtypen, Tumordifferenzierungen als auch die Herdverteilung der Karzinome berücksichtigt (vgl. Kapitel 4.2 bis 4.6). Die histologischen Subtypen mit geringer Fallzahl (N<10) wurden dabei zu einer Gruppe zusammengefasst.

Danach wurden die Korrelationen der einzelnen Tumormerkmale untereinander, zuerst im Gesamten und im Folgenden auch unter Bezugnahme auf die Differenzierung, den histologischem Subtyp und die Herdverteilung beurteilt (vgl. Kapitel 4.7).

Desweiteren wurden die beiden unterschiedlichen Expressionsmuster von Mucin1 hinsichtlich ihres Einflusses auf das Gesamtüberleben hin untersucht (vgl. Kapitel 4.8).

4.1. Expression von Mucin1 (membranständig)

Die Ausprägung von Mucin1 zeigte bei der Auswertung zwei unterschiedliche Expressionsmuster. Daher wurden die rein membranständigen (vgl. Abbildung 6) und die zusätzliche zytoplasmatischen Anfärbungen (vgl. Abbildung 10) unabhängig voneinander analysiert.

4.1.1. Berücksichtigung der Differenzierung

Unter der Berücksichtigung der Tumordifferenzierung zeigen sich hochsignifikante Unterschiede in der membranständigen Expression von Mucin1 ($p= 0,0076^{**}$ im Kruskal-Wallis Test).

Gut differenziertes Tumorgewebe (G1) zeigt eine weniger starke Ausprägung als mäßig differenziertes Gewebe (G2). Die niedrigsten IRS-Werte finden sich im schlecht differenzierten Gewebe (G3) (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 3).

Tabelle 7 IRS abhängig von der Differenzierung

Grading	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
G1	16	0	9	3,94	2,26
G2	83	0	9	4,39	2,30
G3	57	0	8	3,13	2,02

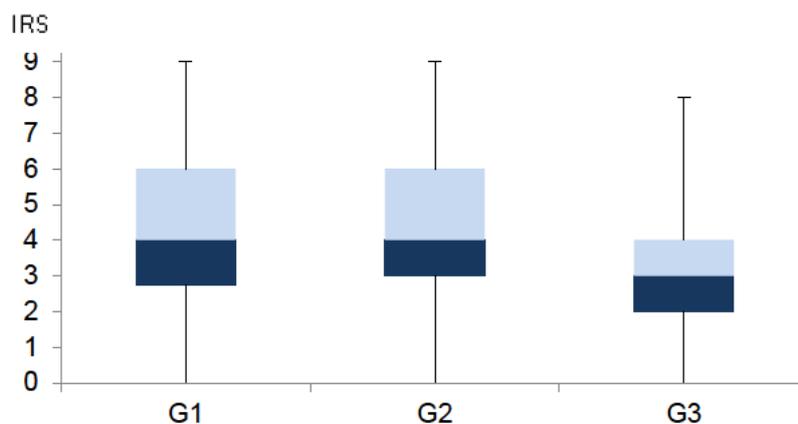


Abbildung 3 IRS abhängig von der Differenzierung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.1.2. Berücksichtigung der Histologie

Unter der Berücksichtigung der histologischen Subtypen zeigen sich höchstsignifikante Unterschiede in der membranständigen Expression von Mucin1 ($p = <0,0001^{***}$ im Kruskal-Wallis Test).

Szirrhöse Mammakarzinome weisen die stärkste Expression auf, medulläre Karzinome die geringste. Die IRS-Werte der weiteren Subtypen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (vgl. Abbildung 4 und Tabelle 8)

Tabelle 8 IRS abhängig von der Histologie

Histologie	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
duktal	64	0	9	3,98	2,07
lobulär	48	0	8	3,40	1,97
medullär	23	0	4	1,76	1,48
szirrhös	49	0	9	4,44	2,31
andere	30	0	9	4,23	2,53

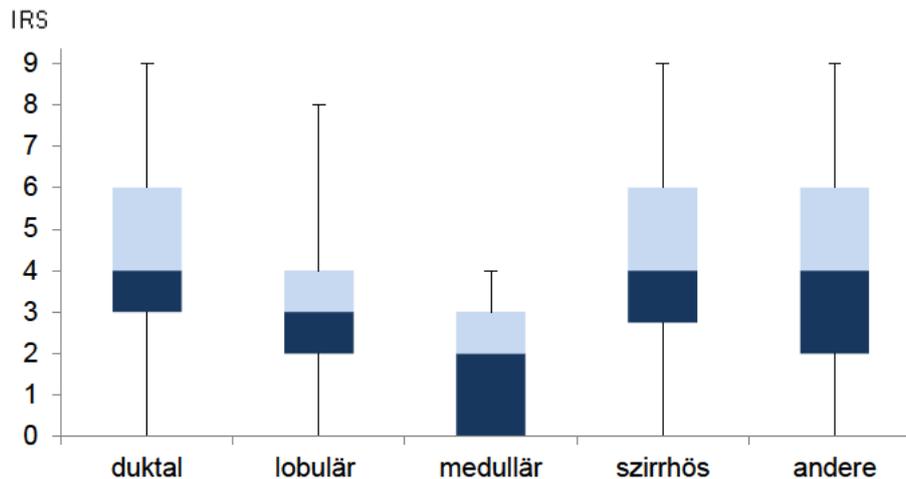


Abbildung 4 IRS abhängig von der Histologie, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.1.3. Berücksichtigung der Herdverteilung

Unter der Berücksichtigung der Herdverteilung zeigt sich eine geringere Ausprägung der membranständigen Mucin1 Expression bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen. Dieses Ergebnis zeigt keine Signifikanz ($p= 0,95216$ im Mann-Whitney Test) (vgl. Abbildung 5 und Tabelle 9)

Tabelle 9 IRS abhängig von der Herdverteilung

Herdverteilung	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
unifokal	42	0	9	3,79	2,59
multifokal/multizentrisch	42	0	8	3,67	2,00

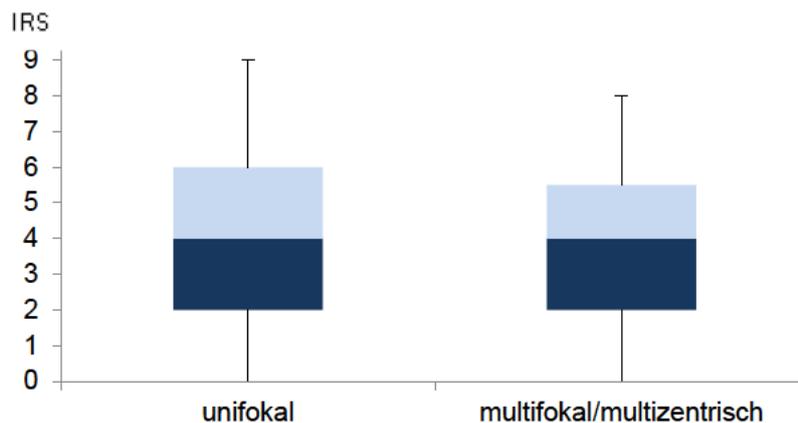


Abbildung 5 IRS abhängig von der Herdverteilung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- ((Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.1.4. Photodokumentation

Abbildung 6 zeigt ein szirrhös-duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach Mucin1 Färbung (IRS=4). Die Expression von Mucin1 zeigt sich an der gesamten Zellmembran.

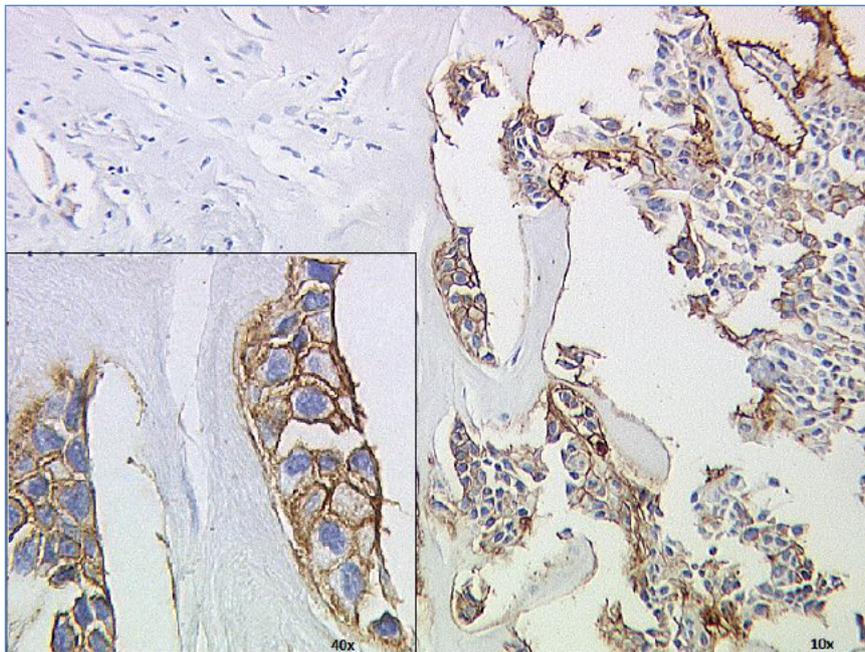


Abbildung 6 membranständige Expression von Muc1

4.2. Expression von Mucin1 (zytoplasmatisch)

4.2.1. Berücksichtigung der Differenzierung

Unter der Berücksichtigung der Tumordifferenzierung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der zytoplasmatischen Expression von Mucin1 ($p= 0,4339$ im Kruskal-Wallis Test) (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 10).

Tabelle 10 IRS abhängig von der Differenzierung

Grading	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
G1	16	0	2	0,44	0,81
G2	83	0	4	0,90	1,20
G3	55	0	4	0,80	1,31

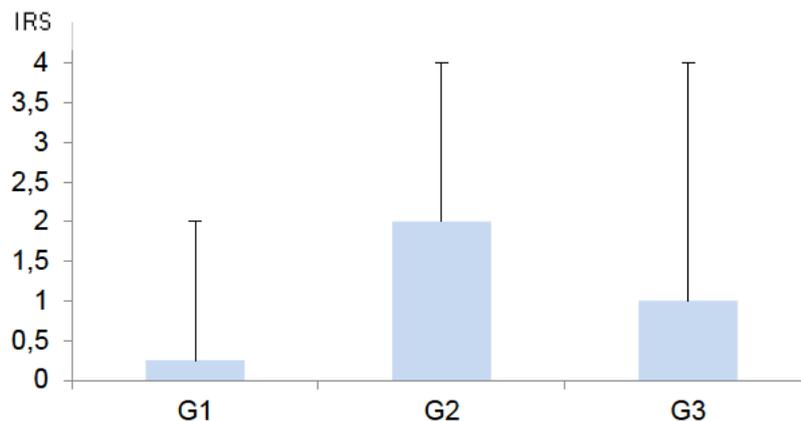


Abbildung 7 IRS abhängig von der Differenzierung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum ; hier aufgrund niedriger Ausgangswerte keine 25% Quartile, da Median bei = 0

4.2.2. Berücksichtigung der Histologie

Unter der Berücksichtigung der histologischen Subtypen zeigen sich signifikante Unterschiede in der zytoplasmatischen Expression von Mucin1 ($p = <0,0449^*$ im Kruskal-Wallis Test).

Szirröse Mammakarzinome zeigen die stärkste Expression, medulläre Karzinome die geringste. Die IRS-Werte der weiteren Subtypen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (vgl. Abbildung 8 und Tabelle 11).

Tabelle 11 IRS abhängig von der Histologie

Hitologie	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
duktal	64	0	4	0,88	1,15
lobulär	47	0	8	1,02	1,95
medullär	23	0	4	0,35	0,93
szirrhös	48	0	6	1,19	1,63
andere	30	0	4	0,30	0,88

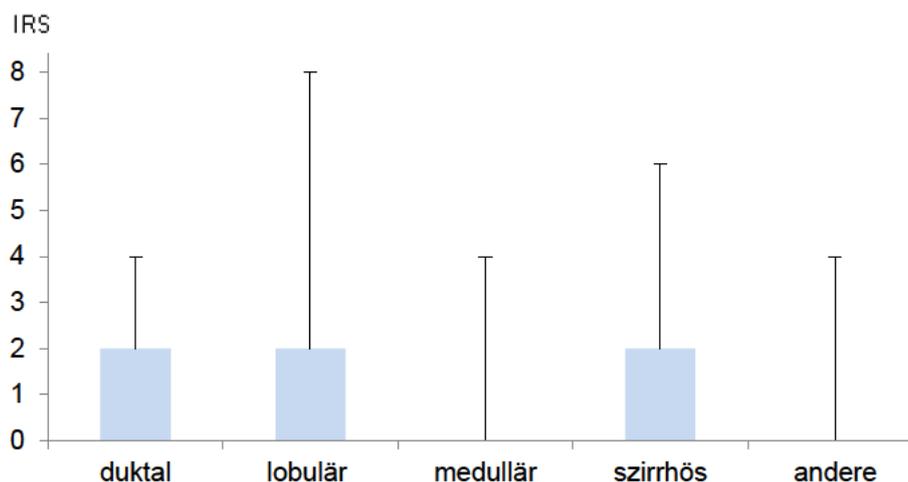


Abbildung 8 IRS abhängig von der Histologie, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum; hier aufgrund niedriger Ausgangswerte keine 25% Quartile, da Median bei = 0

4.2.3. Berücksichtigung der Herdverteilung

Unter der Berücksichtigung der Herdverteilung zeigt sich eine stärkere Ausprägung der zytoplasmatischen Mucin1 Expression bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen. Dieses Ergebnis zeigt keine Signifikanz ($p= 0,25428$ im Mann-Whitney Test) (vgl. Abbildung 9 und Tabelle 12).

Tabelle 12 IRS abhängig von der Herdverteilung

Herdverteilung	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
unifokal	42	0	4	0,60	1,13
multifokal/multizentrisch	42	0	6	1,10	1,57

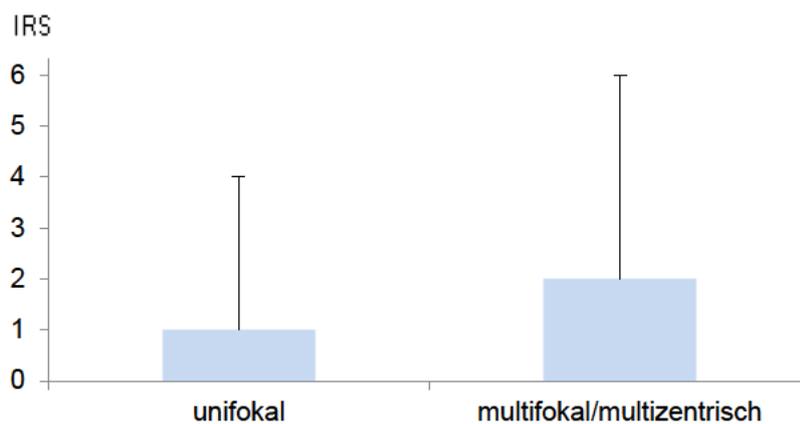


Abbildung 9 IRS abhängig von der Herdverteilung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum; hier aufgrund niedriger Ausgangswerte keine 25% Quartile, da Median bei = 0

4.2.4. Photodokumentation

Abbildung 10 zeigt ein szirrhös-duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach Mucin1 Färbung (IRS=4). Die Expression von Mucin1 zeigt sich vor allem zytoplasmatisch.

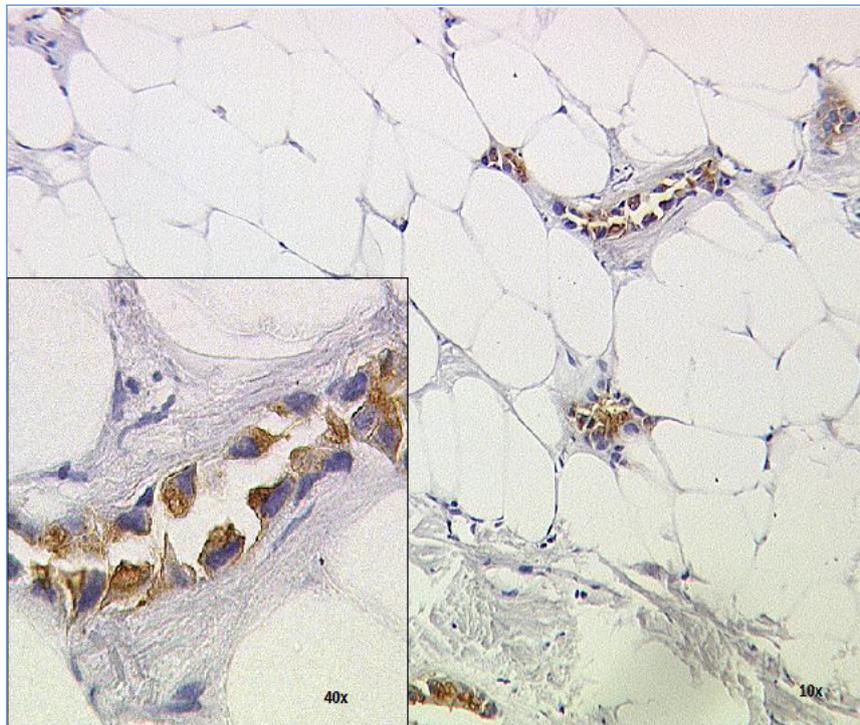


Abbildung 10 zytoplasmatische Expression von Muc1

4.3. Expression von TF1

4.3.1. Berücksichtigung der Differenzierung

Unter der Berücksichtigung der Tumordifferenzierung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TF 1 ($p= 0,7827$ im Kruskal-Wallis Test) (vgl. Tabelle 13 und Abbildung 11).

Tabelle 13 IRS abhängig von der Differenzierung

Grading	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
G1	16	0	6	1,13	1,82
G2	83	0	9	1,31	1,87
G3	56	0	6	1,00	1,43

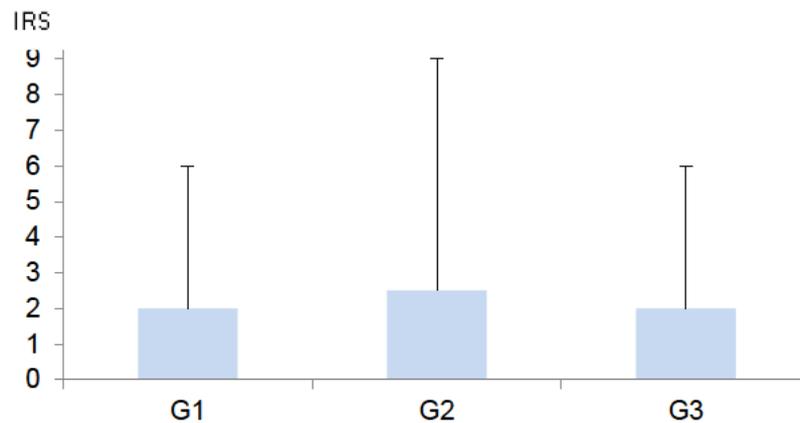


Abbildung 11 IRS abhängig von der Differenzierung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum; hier aufgrund niedriger Ausgangswerte keine 25% Quartile, da Median bei = 0

4.3.2. Berücksichtigung der Histologie

Unter der Berücksichtigung der Histologie zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TF 1 ($p= 0,5781$ im Kruskal-Wallis Test) (vgl. Tabelle 14 und Abbildung 12)

Tabelle 14 IRS abhängig von der Histologie

Histologie	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
duktal	64	0	6	1,02	1,46
lobulär	48	0	9	1,25	2,08
medullär	21	0	3	0,52	0,98
szirrhös	49	0	6	1,39	1,75
andere	29	0	9	1,48	2,38

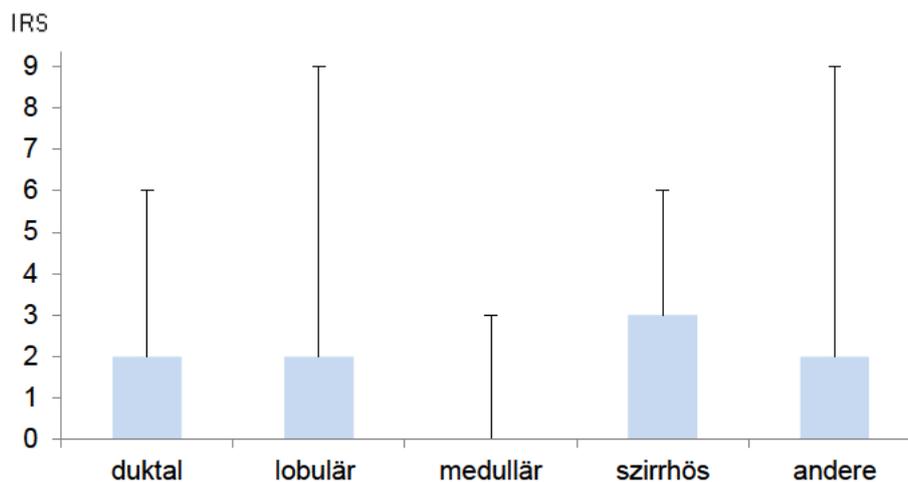


Abbildung 12 IRS abhängig von der Histologie, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum; hier aufgrund niedriger Ausgangswerte keine 25% Quartile, da Median bei = 0

4.3.3. Berücksichtigung der Herdverteilung

Unter der Berücksichtigung der Herdverteilung zeigt sich eine stärkere Ausprägung der TF1 Expression bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen. Dieses Ergebnis zeigt keine Signifikanz ($p= 0,8181$ im Mann-Whitney Test) (vgl. Tabelle 15 und Abbildung 13).

Tabelle 15 IRS abhängig von der Herdverteilung

Herdverteilung	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
unifokal	42	0	9	1,43	2,04
multifokal/multizentrisch	42	0	6	1,26	1,78

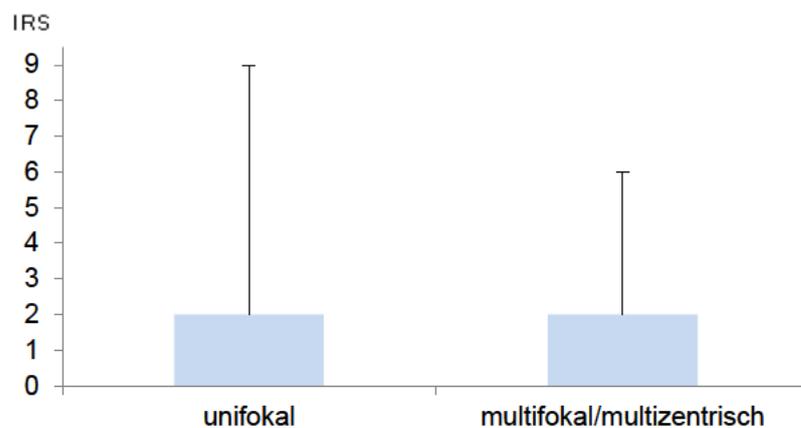


Abbildung 13 IRS abhängig von der Herdverteilung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum; hier aufgrund niedriger Ausgangswerte keine 25% Quartile, da Median bei = 0

4.3.4. Photodokumentation

Abbildung 14 zeigt ein duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach TF1 Färbung (IRS=6). Die Expression von TF1 zeigt sich an der gesamten Zellmembran.

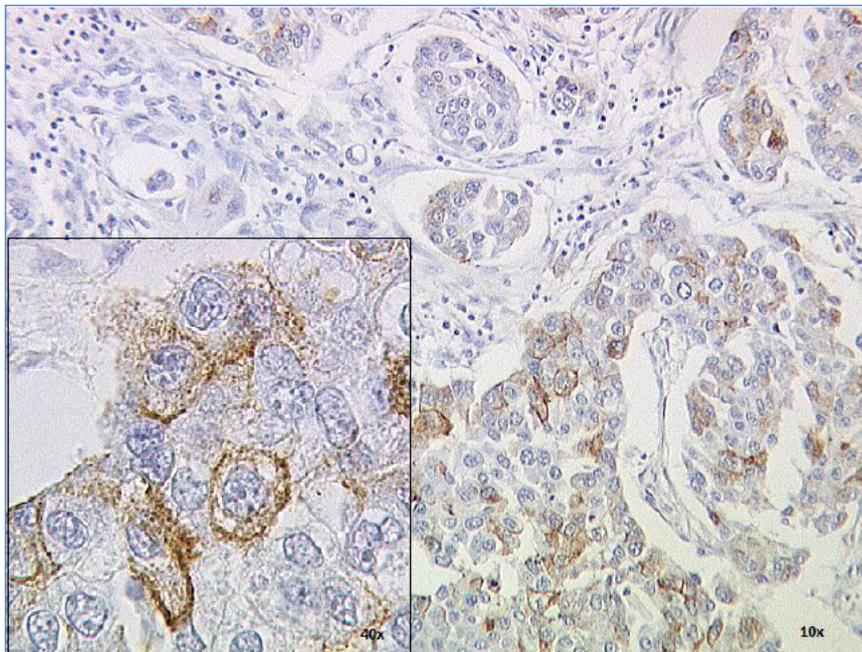


Abbildung 14 Expression von TF1

4.4. Expression von TF2

4.4.1. Berücksichtigung der Differenzierung

Unter der Berücksichtigung der Tumordifferenzierung zeigen sich hochsignifikante Unterschiede in der Expression von TF 2 ($p=0,0012^{**}$ im Kruskal-Wallis Test).

Mäßig differenziertes Tumorgewebe (G2) weist eine weniger starke Ausprägung als gut differenziertes Gewebe (G1) auf. Die höchsten IRS-Werte finden sich im schlecht differenzierten Gewebe (G3) (vgl. Abbildung 15 und Tabelle 16).

Tabelle 16 IRS abhängig von der Differenzierung

Grading	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
G1	16	0	6	1,38	1,71
G2	82	0	9	1,35	1,80
G3	56	0	12	3,04	2,93

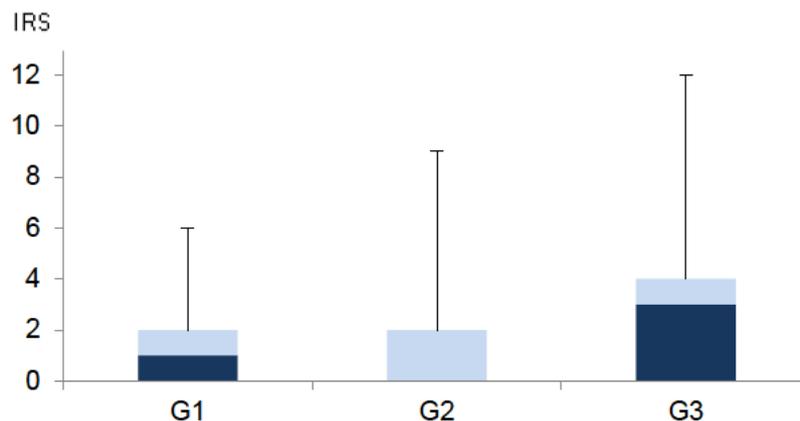


Abbildung 15 IRS abhängig von der Differenzierung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.4.2. Berücksichtigung der Histologie

Unter der Berücksichtigung der Histologie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TF 2 ($p= 0,1468$ im Kruskal-Wallis Test). (vgl. Abbildung 16 und Tabelle 17).

Tabelle 17 IRS abhängig von der Histologie

Histologie	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
duktal	64	0	6	1,11	1,50
lobulär	48	0	6	1,04	1,54
medullär	21	0	3	0,67	1,11
szirrhös	48	0	4	0,88	1,31
andere	30	0	9	2,00	2,26

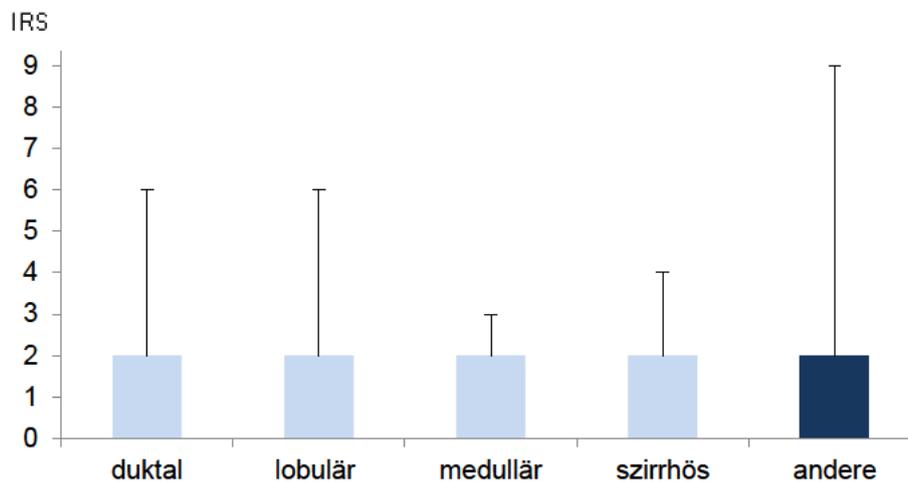


Abbildung 16 IRS abhängig von der Histologie, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.4.3. Berücksichtigung der Herdverteilung

Unter der Berücksichtigung der Herdverteilung zeigt sich eine stärkere Ausprägung der TF2 Expression bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen. Dieses Ergebnis zeigt keine Signifikanz ($p= 0,88076$ im Mann-Whitney Test) (vgl. Tabelle 18 und Abbildung 17).

Tabelle 18 IRS abhängig von der Herdverteilung

Herdverteilung	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
unifokal	42	0	9	1,19	1,90
multifokal/multizentrisch	42	0	6	1,10	1,68

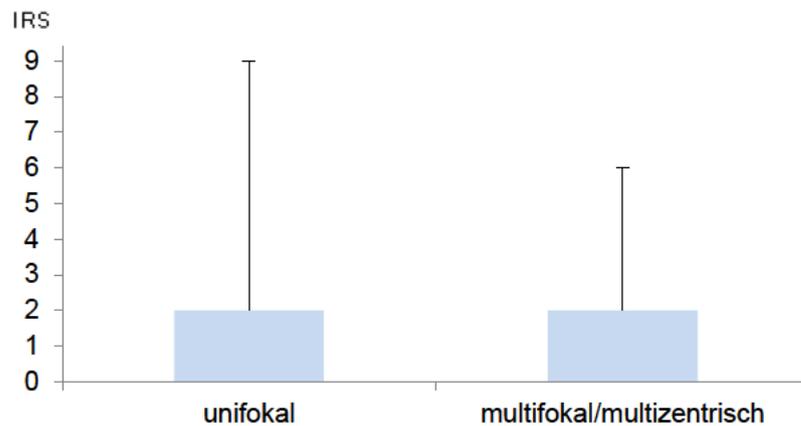


Abbildung 17 IRS abhängig von der Herdverteilung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum hier aufgrund niedriger Ausgangswerte keine 25% Quartile, da Median bei = 0

4.4.4. Photodokumentation

Abbildung 18 zeigt ein szirrhös-duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach TF2 Färbung (IRS=4). Die Expression von TF2 zeigt sich vor allem an der Zellmembran.

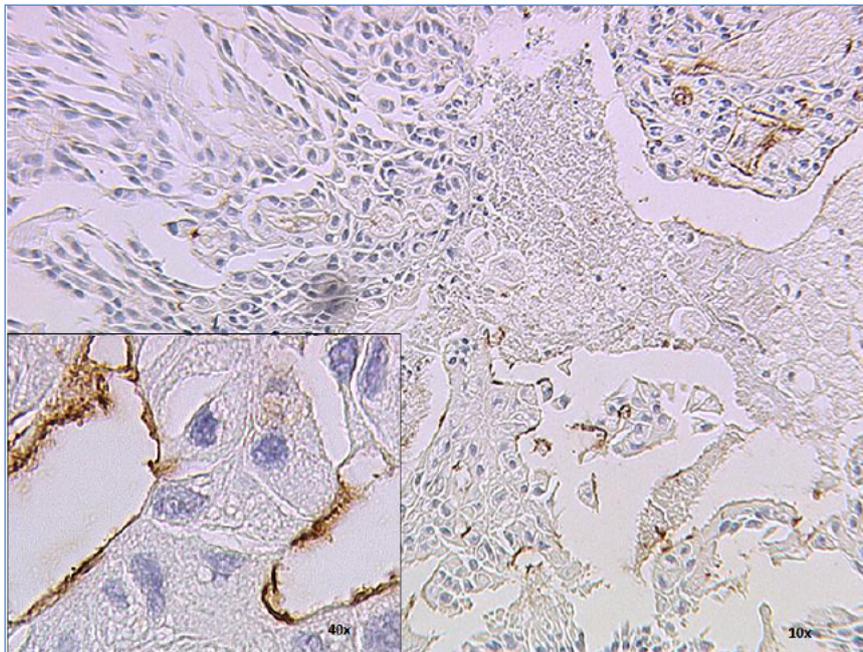


Abbildung 18 Expression von TF2

4.5. Expression von Her4

4.5.1. Berücksichtigung der Differenzierung

Unter der Berücksichtigung der Differenzierung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Her 4 ($p= 0,2357$ im Kruskal-Wallis Test). (vgl. Abbildung 19 und Tabelle 19)

Tabelle 19 IRS abhängig von der Differenzierung

Grading	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
G1	15	0	6	2,13	1,88
G2	82	0	12	3,23	2,69
G3	56	0	12	3,04	2,93

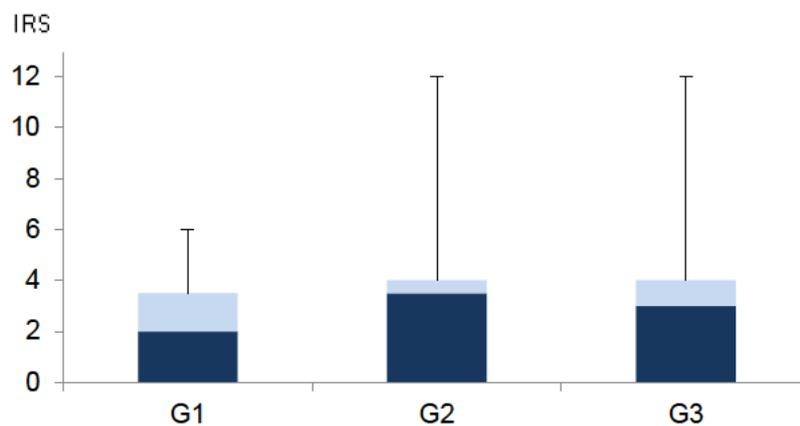


Abbildung 19 IRS abhängig von der Differenzierung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.5.2. Berücksichtigung der Histologie

Unter der Berücksichtigung der Tumordifferenzierung zeigen sich signifikante Unterschiede in der Expression von Her 4 ($p=0,0278^*$ im Kruskal-Wallis Test).

Duktale Mammakarzinome zeigen die stärkste Expression, medulläre Karzinome die geringste. Die IRS-Werte der weiteren Subtypen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen (vgl. Tabelle 20 und Abbildung 20).

Tabelle 20 IRS abhängig von der Histologie

Histologie	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
duktal	63	0	12	3,67	2,53
lobulär	46	0	9	2,39	2,45
medullär	21	0	9	2,33	2,29
szirrhös	48	0	12	2,85	2,97
andere	32	0	9	2,38	3,00

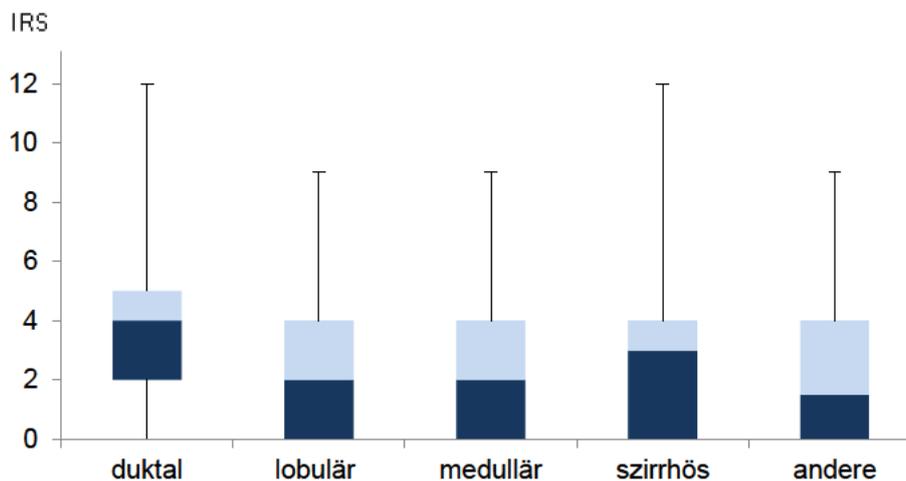


Abbildung 20 IRS abhängig von der Histologie, ,
 Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche),
 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem
 Minimum und Maximum

4.5.3. Berücksichtigung der Herdverteilung

Unter der Berücksichtigung der Herdverteilung zeigt sich eine geringere Ausprägung der Her4 Expression bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen. Dieses Ergebnis zeigt keine Signifikanz ($p= 0,25014$ im Mann-Whitney Test) (vgl. Tabelle 21 und Abbildung 21).

Tabelle 21 IRS abhängig von der Herdverteilung

Herdverteilung	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
unifokal	42	0	9	2,48	2,47
multifokal/multizentrisch	42	0	12	3,17	2,79

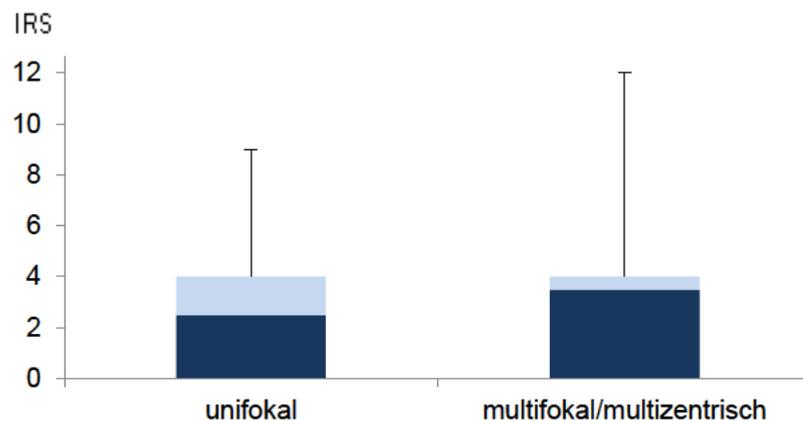


Abbildung 21 IRS abhängig von der Herdverteilung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.5.4. Photodokumentation

Abbildung 22 zeigt ein duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach Her4 Färbung (IRS=6). Die Expression von Her4 zeigt sich vor allem intrazellulär im Zytosol und im Zellkern. Vereinzelt (N<10) wurden auch membranständige Expressionsmuster gefunden (vgl. Abbildung 23).

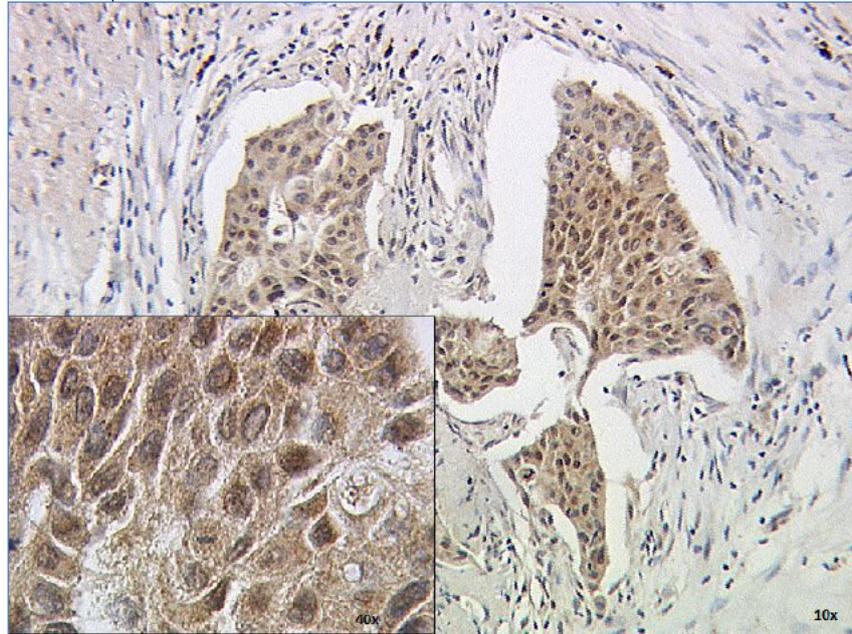


Abbildung 22 intrazelluläre Expression von Her4

Abbildung 23 zeigt ein duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach Her4 Färbung mit hauptsächlich membranständiger Expression (IRS=4).

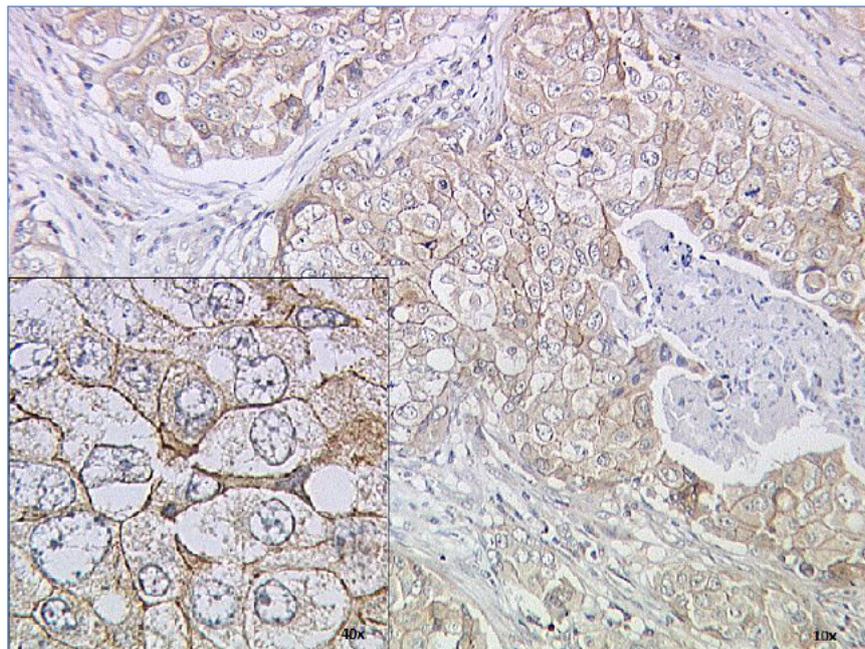


Abbildung 23 membranständige Expression von Her4

4.6. Expression von phospho-Her4

4.6.1. Berücksichtigung der Differenzierung

Unter der Berücksichtigung der Differenzierung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von phosphoryliertem Her 4 ($p=0,3926$ im Kruskal-Wallis Test) (vgl. Abbildung 24 und Tabelle 22).

Tabelle 22 IRS abhängig von der Differenzierung

Grading	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
G1	15	0	9	4,07	2,09
G2	82	0	12	3,95	2,66
G3	55	0	12	3,42	2,96

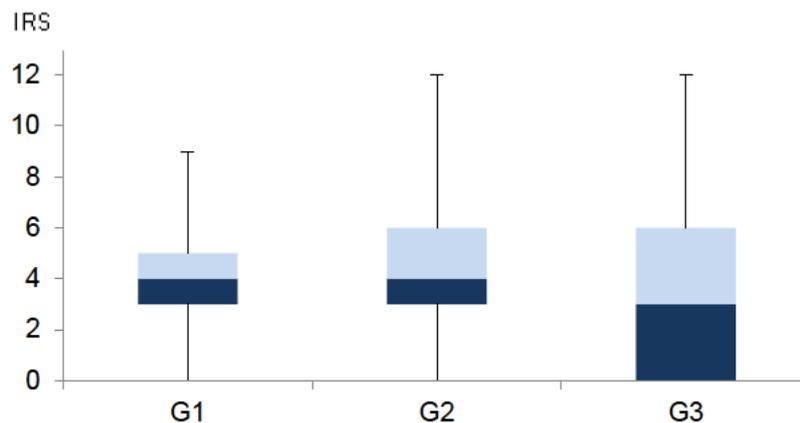


Abbildung 24 IRS abhängig von der Differenzierung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.6.2. Berücksichtigung der Histologie

Unter der Berücksichtigung der Histologie zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von phosphoryliertem Her 4 ($p=0,0616$ im Kruskal-Wallis Test) (vgl. Abbildung 25 und Tabelle 23).

Tabelle 23 IRS abhängig von der Histologie

Histologie	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standartabweichung
duktal	63	0	9	3,79	2,45
lobulär	48	0	9	2,88	2,66
medullär	21	0	8	3,76	2,49
szirrhös	47	0	9	2,94	2,59
andere	30	0	9	4,23	2,43

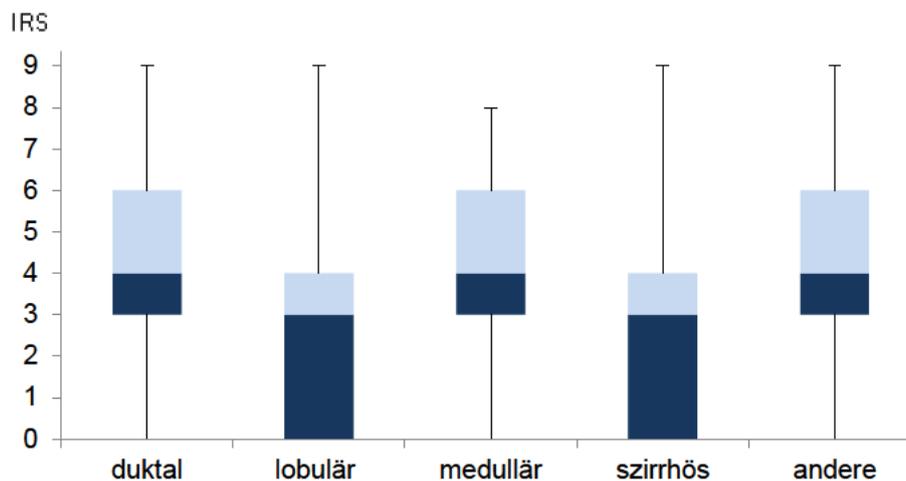


Abbildung 25 IRS abhängig von der Histologie, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.6.3. Berücksichtigung der Herdverteilung

Unter der Berücksichtigung der Herdverteilung zeigt sich eine geringere Ausprägung der phospho-Her4 Expression bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen. Dieses Ergebnis zeigt keine Signifikanz ($p= 0,89656$ im Mann-Whitney Test) (vgl. Tabelle 24 und Abbildung 26).

Tabelle 24 IRS abhängig von der Herdverteilung

Herdverteilung	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
unifokal	42	0	9	3,68	2,61
multifokal/multizentrisch	42	0	12	3,69	3,31

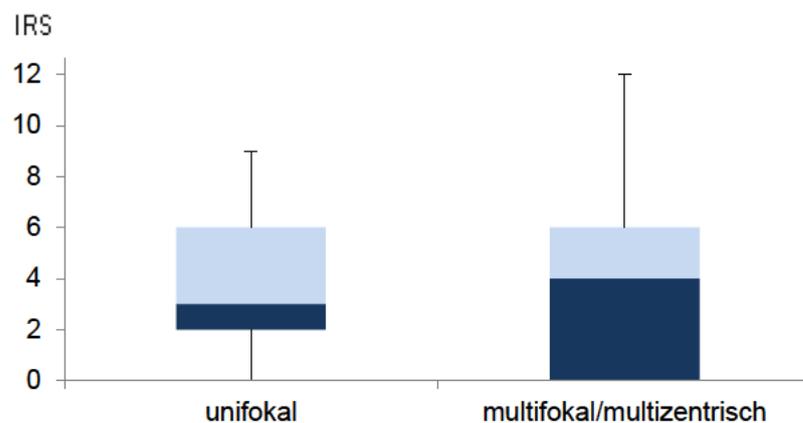


Abbildung 26 IRS abhängig von der Herdverteilung, Boxplot mit Median (horizontale Grenzlinie zwischen hell- und dunkel-gefärbter Fläche), 25%- (Unterkante dunkle Fläche) und 75%- Quartilen (Oberkante helle Fläche), sowie dem Minimum und Maximum

4.6.4. Photodokumentation

Abbildung 27 zeigt ein duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach phospho-Her4 Färbung (IRS=6). Die Expression von phosphoryliertem Her4 zeigt sich vor allem intrazellulär im Zytosol und im Zellkern. Vereinzelt (N<10) wurden auch membranständige Expressionsmuster gefunden (vgl. Abbildung 28).

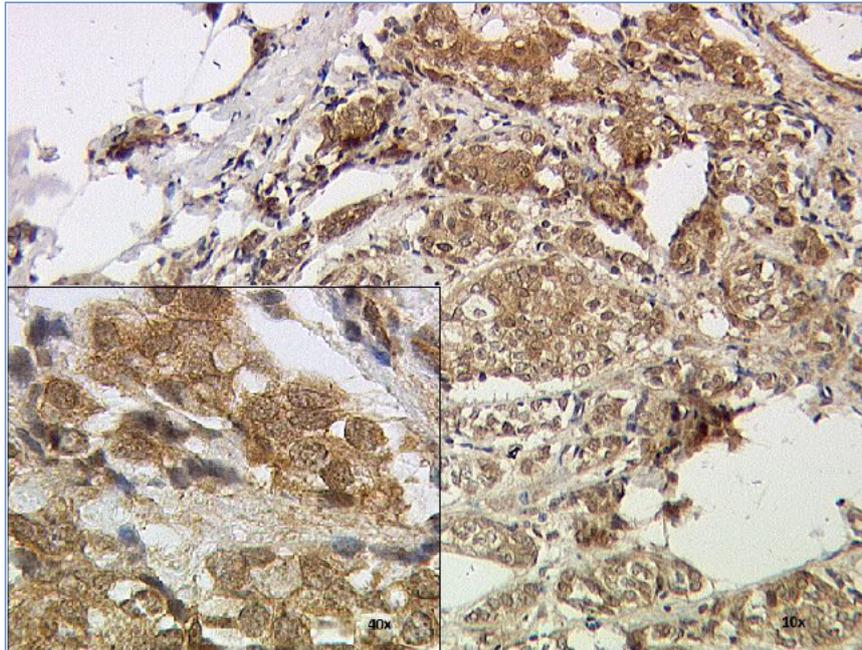


Abbildung 27 intrazelluläre Expression von phospho-Her4

Abbildung 28 zeigt ein duktales Mammakarzinom in 10- und 40facher Vergrößerung nach phospho-Her4 Färbung mit rein membranständiger Expression (IRS=4).

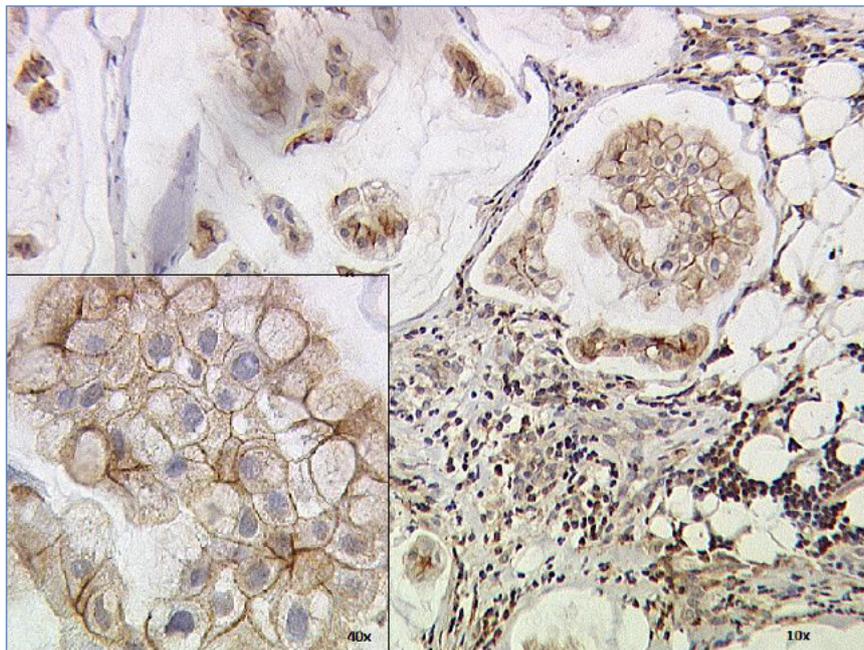


Abbildung 28 membranständige Expression von phospho-Her4

4.7. Korrelationen

4.7.1. Gesamtanalyse

Bei Betrachtung des Gesamtkollektivs zeigen sich in der Korrelationsanalyse nach Spearman hochsignifikante Korrelationen zwischen den membranständigen und den zytoplasmatischen Expressionen von Mucin1, eine signifikante Korrelation zwischen membranösem Mucin1 und TF1, sowie zwischen TF1 und TF2 und Her4 und phosphoryliertem Her4 (vgl. Tabelle 25).

Tabelle 25 Korrelation Gesamt

<u>Gesamt</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,37	<0,01**	232
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,14	0,04*	230
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,04	0,53	230
Muc1 (membranständig) vs. Her4	0,05	0,44	227
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	-0,05	0,48	228
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,04	0,54	230
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,04	0,51	230
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,08	0,23	227
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	-0,02	0,79	228
TF1 vs. TF2	0,57	<0,01**	231
TF1 vs. Her4	-0,09	0,19	228
TF1 vs. phospho-Her4	-0,07	0,33	228
TF2 vs. Her4	0,03	0,65	228
TF2 vs. phospho-Her4	0,01	0,89	229
Her4 vs. phospho-Her4	0,23	<0,01**	227

4.7.2. Berücksichtigung der Differenzierung

Bei guter Zelldifferenzierung (G1) kann eine hochsignifikante Korrelation zwischen TF1 und TF2, sowie zwischen Her 4 und phosphoHer 4 verzeichnet werden. (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26 Korrelation G1

<u>G1</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,16	0,55	16
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,12	0,67	16
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,18	0,51	16
Muc1 (membranständig) vs. Her4	-0,3	0,91	15
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	0,7	0,79	15
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,28	0,3	16
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,11	0,67	16
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	-0,13	0,64	15
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	0,31	0,26	15
TF1 vs. TF2	0,88	<0,01**	16
TF1 vs. Her4	0,09	0,74	15
TF1 vs. phospho-Her4	0,14	0,61	15
TF2 vs. Her4	0,18	0,53	15
TF2 vs. phospho-Her4	0,07	0,8	15
Her4 vs. phospho-Her4	1	<0,01**	15

4. Ergebnisse

Bei mäßiger Zelldifferenzierung (G2) zeigen sich hochsignifikante Korrelationen zwischen den membranständigen und den zytoplasmatischen Expressionen von Mucin 1, TF1 und TF2, sowie eine signifikante Korrelation zwischen TF2 und Her4 (vgl. Tabelle 27),

Tabelle 27 Korrelation G2

<u>G2</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,43	<0,01**	84
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0	0,97	84
Muc1 (membranständig) vs. TF2	-13	0,26	83
Muc1 (membranständig) vs. Her4	0,09	0,42	83
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	-0,2	0,7	83
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,01	0,91	84
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	-0,13	0,25	83
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,16	0,14	83
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	-0,2	0,86	83
TF1 vs. TF2	0,68	<0,01**	83
TF1 vs. Her4	0,3	0,8	83
TF1 vs. phospho-Her4	-0,1	0,35	83
TF2 vs. Her4	0,23	0,04*	82
TF2 vs. phospho-Her4	-0,01	0,95	83
Her4 vs. phospho-Her4	0,12	0,27	82

Bei schlechter Zelldifferenzierung (G3) zeigen sich signifikante Korrelationen zwischen membranständigem Mucin1 und zytoplasmatischem Mucin1, sowie hochsignifikante Korrelationen zwischen TF1 und TF2. Außerdem sind hochsignifikante Zusammenhänge zwischen zytoplasmatischen Mucin1 und TF1, TF2 und sowie eine signifikante Korrelation zu phosphoHer 4 zu verzeichnen. Weiterhin korrelieren TF1 mit TF2 und Her4 mit phospho-Her4 (vgl. Tabelle 28).

Tabelle 28 Korrelation G3

<u>G3</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,36	0,01*	55
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,58	<0,01**	54
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,27	0,05*	54
Muc1 (membranständig) vs. Her4	0,1	0,93	54
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	0,24	0,09	54
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,4	<0,01**	54
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,4	<0,01**	54
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	-0,07	0,6	54
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	0,31	0,02*	54
TF1 vs. TF2	0,6	<0,01**	55
TF1 vs. Her4	-0,13	0,36	55
TF1 vs. phospho-Her4	0,12	0,37	54
TF2 vs. Her4	-0,9	0,51	55
TF2 vs. phospho-Her4	0,27	0,05*	54
Her4 vs. phospho-Her4	0,33	0,01*	55

4.7.3. Berücksichtigung Histologischer Subtypen

Beim duktalem Mamakarzinom zeigen sich signifikante Korrelationen zwischen dem membranständigen Mucin1, den zytoplasmatischen Expressionen von Mucin1 und TF1, sowie eine hochsignifikante Korrelation zwischen TF1 und zytoplasmatischem Mucin1. Des Weiteren kann eine signifikante Korrelation zwischen der zytoplasmatischen Expression von Mucin1 und TF2, sowie eine hochsignifikante Korrelation zwischen TF1 und TF2 verzeichnet werden (vgl. Tabelle 29).

Tabelle 29 Korrelation duktal

<u>dukta</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Mucin1 (membranständig) vs. Mucin1 (zytoplasmatisch)	0,33	<u>0,01*</u>	66
Mucin1 (membranständig) vs. TF1	0,33	<u>0,01*</u>	66
Mucin1 (membranständig) vs. TF2	0,2	0,1	66
Mucin1 (membranständig) vs. Her4	0,2	0,1	65
Mucin1 (membranständig) vs. phospho-Her4	-0,6	0,63	65
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,39	<u><0,01**</u>	66
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,31	<u>0,01*</u>	66
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,12	0,34	65
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	0,07	0,6	65
TF1 vs. TF2	0,66	<u><0,01**</u>	66
TF1 vs. Her4	0,01	0,93	65
TF1 vs. phospho-Her4	0,09	0,45	65
TF2 vs. Her4	0,17	0,18	65
TF2 vs. phospho-Her4	0,15	0,24	65
Her4 vs. phospho-Her4	0,08	0,54	65

Beim lobulären Karzinom kann eine hochsignifikante Korrelation zwischen der membranständigen und den zytoplasmatischen Expressionen von Mucin1 und zwischen TF 1 und TF2, sowie eine signifikante Korrelation zwischen Her4 und phosphoryliertem Her4 verzeichnet werden (vgl. Tabelle 30).

Tabelle 30 Korrelation lobulär

<u>lobulär</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Mucin1 (membranständig) vs. Mucin1 (zytoplasmatisch)	0,54	<u><0,01**</u>	46
Mucin1 (membranständig) vs. TF1	0,05	0,73	46
Mucin1 (membranständig) vs. TF2	0,12	0,44	46
Mucin1 (membranständig) vs. Her4	0,02	0,9	44
Mucin1 (membranständig) vs. phospho-Her4	-0,02	0,9	46
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	-0,11	0,46	46
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	-0,17	0,25	46
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,09	0,55	44
Mucin1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	-0,08	0,6	46
TF1 vs. TF2	0,54	<u><0,01**</u>	47
TF1 vs. Her4	-0,26	0,09	45
TF1 vs. phospho-Her4	-0,22	0,13	47
TF2 vs. Her4	-0,23	0,12	45
TF2 vs. phospho-Her4	-0,24	0,11	47
Her4 vs. phospho-Her4	0,36	<u>0,01*</u>	47

4. Ergebnisse

Beim medullären Subtyp zeigen sich signifikante Korrelationen zwischen der membranständigen Expressionen von Mucin1 und TF1, sowie zwischen Her 4 und phosphoryliertem Her 4 (vgl.Tabelle 31).

Tabelle 31 Korrelation medullär

<u>medullär</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,33	0,15	21
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,43	0,05*	21
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,1	0,66	21
Muc1 (membranständig) vs. Her4	0,28	0,13	21
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	0,17	0,45	21
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,29	0,2	21
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,03	0,9	21
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,03	0,9	21
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	-0,12	0,61	21
TF1 vs. TF2	0,26	0,25	21
TF1 vs. Her4	0,23	0,23	21
TF1 vs. phospho-Her4	0,34	0,23	21
TF2 vs. Her4	0,1	0,98	21
TF2 vs. phospho-Her4	0,24	0,29	21
Her4 vs. phospho-Her4	0,5	0,02*	21

Beim szirrhösen Mammakarzinom kann eine signifikante Korrelation zwischen der membranständigen und der zytoplasmatischen Expression von Mucin1 sowie zwischen zytoplasmatischem TF1 und Her4 verzeichnet werden. Des Weiteren korrelieren TF1 und TF2 signifikant (vgl.Tabelle 32).

Tabelle 32 Korellation szirrhös

<u>szirrhös</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,34	0,02*	48
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,21	0,16	47
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,16	0,3	46
Muc1 (membranständig) vs. Her4	-0,03	0,84	46
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	-0,16	0,3	46
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	-0,12	0,44	47
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	-0,03	0,84	46
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,14	0,34	46
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	-0,06	0,7	46
TF1 vs. TF2	0,78	<0,01**	47
TF1 vs. Her4	-0,28	0,05*	47
TF1 vs. phospho-Her4	-0,04	0,77	46
TF2 vs. Her4	-0,25	0,1	46
TF2 vs. phospho-Her4	-0,06	0,71	46
Her4 vs. phospho-Her4	0,05	0,72	46

4. Ergebnisse

4.7.4. Berücksichtigung von Histologie und Differenzierung

Bei gut differenzierten (G1) duktalem Mammakarzinomen zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen der TF1 und TF2 (vgl. Tabelle 33).

Tabelle 33 Korrelation duktal G1

<u>duktalem G1</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,17	0,79	5
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,81	0,09	5
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,75	0,15	5
Muc1 (membranständig) vs. Her4	-0,51	0,49	4
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	0,69	0,31	4
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,38	0,52	5
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,15	0,81	5
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	-0,3	0,7	4
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	-0,49	0,51	4
TF1 vs. TF2	0,94	0,02*	5
TF1 vs. Her4	-0,14	0,86	4
TF1 vs. phospho-Her4	0,57	0,43	4
TF2 vs. Her4	-0,17	0,83	4
TF2 vs. phospho-Her4	0,83	0,17	4
Her4 vs. phospho-Her4	-0,41	0,59	4

Bei duktalem Mammakarzinomen mit mäßiger Zelldifferenzierung (G2) bestehen signifikante Korrelationen zwischen der membranständigen Expression von Mucin1 mit der zytoplasmatischen Expression und phosphoryliertem Her4. Des Weiteren können eine signifikante Korrelationen zwischen TF2 und Her4 und eine hochsignifikante Korrelation zwischen TF1 und TF2 verzeichnet werden (vgl. Tabelle 34).

Tabelle 34 Korrelation duktal G2

<u>duktalem G2</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,38	0,02*	36
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,26	0,12	36
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,09	0,58	36
Muc1 (membranständig) vs. Her4	0,31	0,06	36
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	-0,33	0,05*	36
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,27	0,11	36
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	-0,04	0,84	36
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,03	0,87	36
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	-0,17	0,31	36
TF1 vs. TF2	0,49	<0,01**	36
TF1 vs. Her4	0,12	0,49	36
TF1 vs. phospho-Her4	-0,2	0,23	36
TF2 vs. Her4	0,34	0,04*	36
TF2 vs. phospho-Her4	-0,1	0,58	36
Her4 vs. phospho-Her4	0,6	0,72	36

4. Ergebnisse

Bei schlechter Zelldifferenzierung (G3) duktaler Mammakarzinome zeigen sich hochsignifikante Korrelationen zwischen der zytoplasmatischen Expressionen von Mucin1 und TF1, TF2 und phosphoryliertem Her4. Weiters korreliert TF2 hochsignifikant mit TF1 und signifikant mit phosphoryliertem Her4 (vgl. Tabelle 35).

Tabelle 35 Korrelation duktal G3

<u>duktral G3</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,42	0,08	19
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,43	0,08	19
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,3	0,21	19
Muc1 (membranständig) vs. Her4	0	0,99	19
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	0,35	0,14	19
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,68	<u><0,01**</u>	19
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,75	<u><0,01**</u>	19
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	0,11	0,64	19
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	0,64	<u><0,01**</u>	19
TF1 vs. TF2	0,87	<u><0,01**</u>	19
TF1 vs. Her4	-0,09	0,71	19
TF1 vs. phospho-Her4	0,32	0,18	19
TF2 vs. Her4	0,07	0,77	19
TF2 vs. phospho-Her4	0,45	<u>0,05*</u>	19
Her4 vs. phospho-Her4	0,34	0,15	19

4.7.5. Berücksichtigung der Herdverteilung

Bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen zeigen sich hochsignifikante Korrelationen zwischen den beiden Expressionsformen von Mucin1, TF1 und TF2 sowie zwischen Her4 und phospho-Her4. Desweiteren findet man eine signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischem Mucin1 und TF2 (vgl. Tabelle 36).

Tabelle 36 Korrelation multifokal/multizentrisch

<u>multifokal/multizentrisch</u>	<u>Korrelation (r)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>	<u>N</u>
Muc1 (membranständig) vs. Muc1 (zytoplasmatisch)	0,46	<u><0,01**</u>	78
Muc1 (membranständig) vs. TF1	0,13	0,24	78
Muc1 (membranständig) vs. TF2	0,11	0,36	78
Muc1 (membranständig) vs. Her4	-0,1	0,39	77
Muc1 (membranständig) vs. phospho-Her4	-0,01	0,9	77
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF1	0,04	0,72	78
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. TF2	0,22	<u>0,05*</u>	78
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. Her4	-0,12	0,29	77
Muc1 (zytoplasmatisch) vs. phospho-Her4	0,08	0,5	77
TF1 vs. TF2	0,61	<u><0,01**</u>	78
TF1 vs. Her4	-0,17	0,15	77
TF1 vs. phospho-Her4	-0,3	0,78	77
TF2 vs. Her4	-0,06	0,61	77
TF2 vs. phospho-Her4	0,01	0,9	77
Her4 vs. phospho-Her4	0,46	<u><0,01**</u>	76

4.8. Überlebensdaten

Die Überlebensanalyse zeigt ein signifikant höheres 10-Jahres- wie auch Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Karzinomen, die Mucin1 an der Membran exprimieren (vgl. Tabelle 37). Des Weiteren zeigt die Kaplan Meier Analyse ein signifikant höheres 10-Jahres-Überleben bei Patienten mit membranständigen Mucin1 im Vergleich zu Patienten mit zytoplasmatischem Mucin1, als auch zu Patienten die weder die eine noch die andere Expressionsform (=doppelt negativ) aufweisen (vgl. Tabelle 37 Abbildung 29). Auch ein signifikant höheres 10-Jahres Überleben bei Patientinnen mit membranständigen Mucin1-exprimierenden Karzinomen im Vergleich zu den übrigen Fällen (vgl. Abbildung 30), sowie ein nicht-signifikant vermindertes Überleben im Vergleich der zytoplasmatisch exprimierenden Mucin1 Karzinome zu den übrigen Fällen ist zu erkennen (vgl. Abbildung 31).

Tabelle 37 Ergebnisse des Cox Modells für die Überlebenszeit

Covariate	10 Jahres Überleben					Gesamtüberleben				
	Coefficient (b_i)	[HR Exp(b_i)]	95% CI		P- value	Coefficient (b_i)	[HR Exp(b_i)]	95% CI		P- value
			lower	upper				lower	upper	
Histologie (duktal vs. andere)	-0.49	0.61	0.16	2.38	ns	-0.31	0.73	0.23	2.34	ns
Grading (G1 vs. G2,3)	-0.51	0.60	0.18	1.97	ns	-0.59	0.55	0.19	1.63	ns
pT (pT1 vs. pT2-4)	-0.17	0.84	0.30	2.36	ns	-0.06	0.94	0.39	2.26	ns
pN (pN0 vs. pN1)	0.61	1.84	0.63	5.40	ns	1.06	2.89	1.11	7.53	.030
CIS (no vs. yes)	0.08	1.08	0.40	2.97	ns	0.28	1.32	0.57	3.06	ns
ER (neg vs. pos)	-1.53	0.22	0.05	0.94	.041	-1.66	0.19	0.05	0.80	.023
PR (neg vs. pos)	0.10	1.10	0.28	4.28	ns	0.37	1.45	0.43	4.91	ns
Her2 (neg vs. pos)	0.92	2.52	0.56	11.35	ns	0.67	1.95	0.46	8.20	ns
Alter (≤ 55 J. vs. > 55 J.)	0.75	2.11	0.71	6.30	ns	0.28	1.32	0.55	3.18	ns
Mucin1 membranös (neg vs. pos)	-2.42	0.09	0.01	0.70	.022	-1.21	0.30	0.09	0.96	.042

4. Ergebnisse

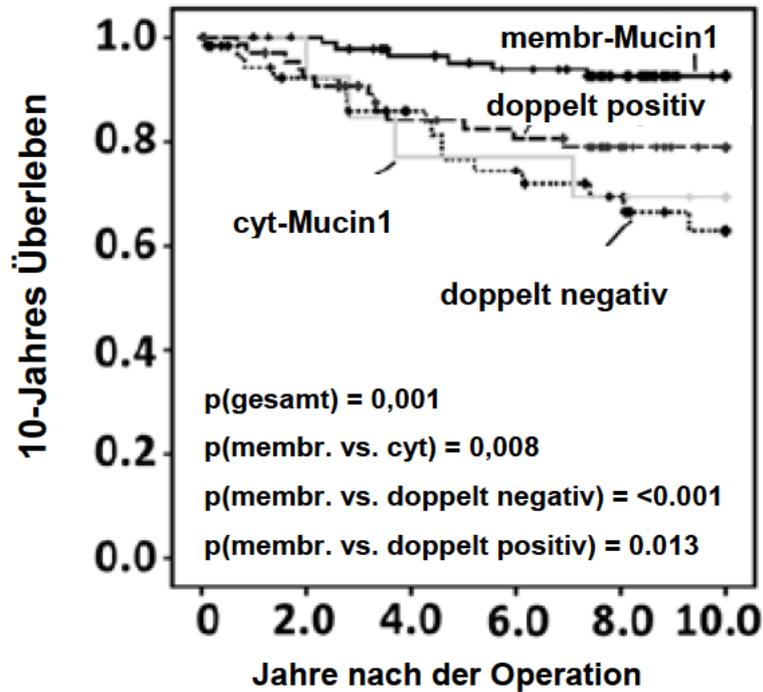


Abbildung 29 Kaplan Meier Analyse; Vergleich des 10- Jahres-Überlebens von Karzinomen mit membranständigem Mucin1 (=membr-Mucin1) mit cytoplasmatischem Mucin1 (=cyt-Mucin1), sowie doppelt positiver, als auch doppelt negativer Mucin1 Färbung

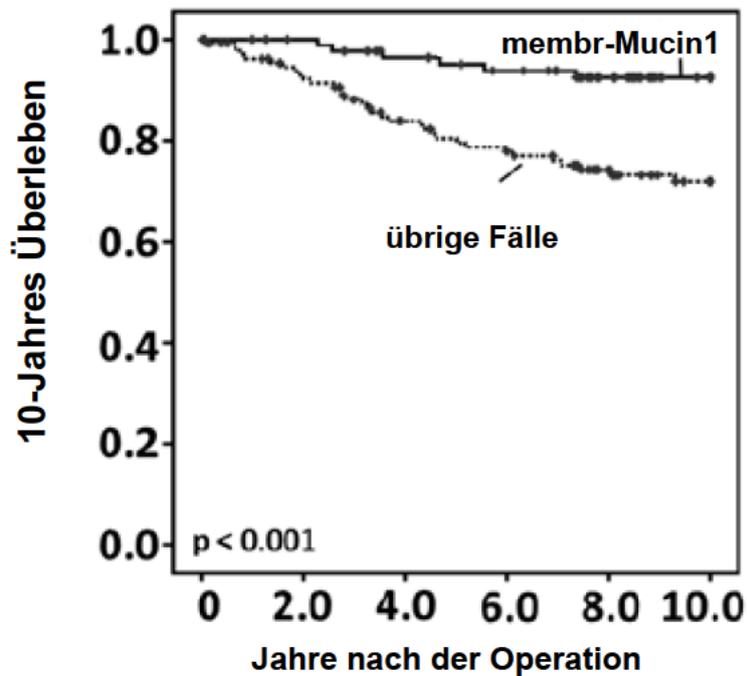


Abbildung 30 Kaplan Meier Analyse; Vergleich des 10- Jahres-Überlebens von Karzinomen mit membranständigem Mucin1 (=membr-Mucin1) den übrigen Fällen

4. Ergebnisse

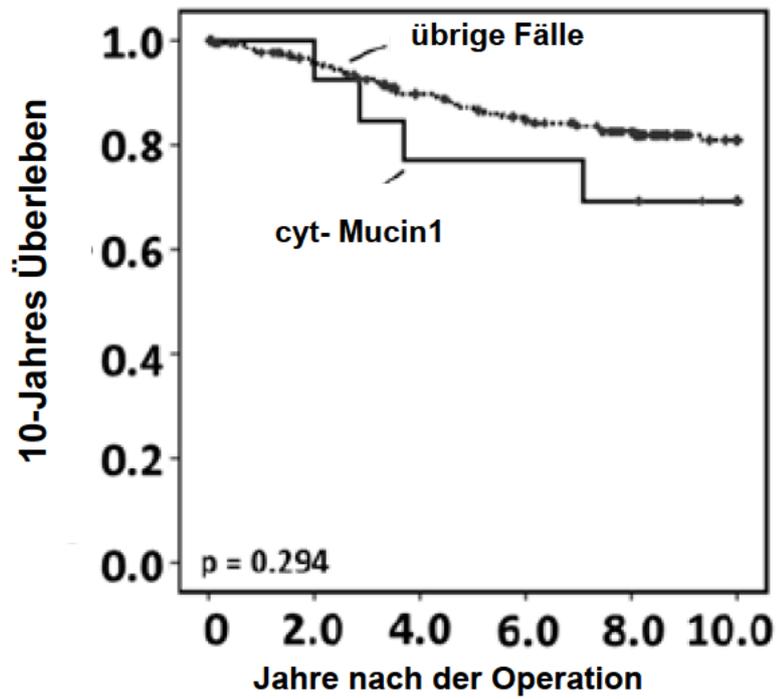


Abbildung 31 Kaplan Meier Analyse; Vergleich des 10- Jahres-Überlebens von Karzinomen mit zytoplasmatischem Mucin1 (=cyt-Mucin1) den übrigen Fälle

5. Diskussion

Bei der Frage nach den Zusammenhängen zwischen der Mucin1 Expression und den Expressionen des Thomsen-Friedenreich Antigens und von Her4/phospho-Her4 beim Mammakarzinom wurden histologische Präparate von 235 Brustkrebspatientinnen mittels einer immunhistochemischen Analyse untersucht. Die Färbung und die darauffolgende statistische Auswertung lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

Die Färbung von Mucin1 zeigt einerseits ein membranständiges Färbungsmuster (vgl. Abbildung 6), das aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Mucin1 um ein apikal gelegenes Transmembranprotein handelt [35, 68-70] auch zu erwarten ist. Andererseits lässt sich auch eine zytoplasmatische Expression von Mucin1 (vgl. Abbildung 10) verzeichnen, die sich durch die Oligomerisation und Verteilung von Mucin1 speziell im Zytoplasma von Karzinomzellen [35, 71, 72] erklären lässt. Bei der Färbung von Mucin 1 wurde dabei als Primärdetektor der monoklonale Antikörper PankoMab verwendet, der eine hohe Spezifität gegenüber Mucin1 aufweist, das von Tumoren exprimiert wurde [73, 74].

Bei der Färbung des Thomsen-Friedenreich Antigens kann man ebenfalls eine apikale membranständige Reaktion (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 18), beobachten. Auch dieses Ergebnis ist durch die Eigenschaft des TF-Antigens als extrazellulärer Kohlenhydratrest [46, 75] von Mucin1 zu erwarten.

Die Färbung von Her4 beziehungsweise von phosphoryliertem Her4 zeigt vor allem ein intrazelluläres Expressionsmuster (vgl. Abbildung 22 und Abbildung 27). Vereinzelt ist die Anfärbung rein membranständig (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 28) zu beobachten. Diese membranständige Expression ist aufgrund der transmembranen Lokalisation der Rezeptortyrosinkinase Her4 [76, 77] nachvollziehbar. Die intrazelluläre Färbereaktion lässt sich am besten durch eine kürzlich entdeckte Eigenschaft von Her4 erklären, bei der ein zytoplasmatisch-proteolysierter Abschnitt von Her4 im Zellinneren als Signaltransduktor fungiert [78-80].

Abhängig von der Differenzierung der Tumorzellen zeigt die membranständige Expression von Mucin1 eine geringe, aber hochsignifikante Verminderung bei schlecht differenzierten Tumoren (G3) im Gegensatz zu mäßig differenzierten Karzinomen (G2) (vgl. Abbildung 3). Dieses Ergebnis konnte bereits bei Studien von Dian et. al gezeigt werden [74].

5. Diskussion

Auch beim zytoplasmatischen Mucin1 lässt sich diese Abhängigkeit von der Differenzierung beobachten, allerdings ohne Signifikanz aufzuweisen (vgl. Abbildung 7). Die Färbereaktion des vom Thomsen-Friedenreich untersuchten Epitops TF2 zeigt dagegen einen hochsignifikanten Anstieg der Expression mit Abnahme der Zelldifferenzierung (vgl. Abbildung 15).

Her4 und seine phosphorylierte Form phospho-Her4 weisen unter Berücksichtigung der Zelldifferenzierung ein ähnliches Färbeverhalten wie Mucin1 auf, wobei die Unterschiede sehr gering und nicht signifikant sind. (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 24)

In Abhängigkeit des histologischen Subtyps zeigen sich vor allem in den duktalem, sowie in dessen Sonderform, den szirrhösen Karzinomen die stärksten Ausprägungen der untersuchten Antigene. Diese Ergebnisse sind sowohl für die beiden Expressionsformen von Mucin1, als auch für Her4 signifikant (vgl. Abbildung 4, 8, 25).

Die „matched pair“-Analyse weist keine signifikanten Unterschiede in den Antigen-Expressionen zwischen unifokalen und multifokalen/multizentrischen Karzinomen auf (vgl. Abbildung 5, 9, 13, 17, 21, 26).

Bei den Korrelationsanalysen zeigen sich vor allem bei den schlecht differenzierten Karzinomen (G3) viele signifikante Zusammenhänge (vgl. Tabelle 28). So lassen sich zwischen der zytoplasmatischen Expression von Mucin1 und den beiden Epitopen des Thomsen Friedenreich Antigens TF1 und TF2 positive und hochsignifikante Korrelationen nachweisen. Des Weiteren korrelieren die zytoplasmatische Ausprägung von Mucin1 und die phosphorylierte Form von Her4 positiv und signifikant miteinander. Diese Zusammenhänge gelten unter allen histologischen Subtypen vor allem für das duktales Mammakarzinom. Auch hier sind es die schlecht differenzierten Tumorzellen (G3), bei denen diese Ergebnisse signifikant bis hochsignifikant sind (vgl. Tabelle 35).

Um die gewonnenen Ergebnissen nun in einem Kontext sehen zu können, muss man die Eigenschaften von Mucin1, dem TF- Antigen und Her4 genauer betrachten:

Mucin1 liegt im gesunden und im gut differenzierten Gewebe (G1) an der apikalen Zellmembran [35, 71, 72]. Die N-terminale Untereinheit bildet dabei den extrazellulären Molekülabschnitt, während die C-terminale Domäne den transmembranen Abschnitt enthält [32]. Durch das Auftreten von apikalem-membranständigem Mucin1 bei gut differenziertem Gewebe (G1) wird eine hohe Expressionsrate von vielen Autoren mit einer höheren Überlebensrate der

5. Diskussion

Patientinnen und einem niedrigerem Rezidivaufreten [69, 70, 81-85], beziehungsweise kleineren Tumorgöße assoziiert [69]. Auch in der hier vorliegenden Studie kann eine hochsignifikante Abnahme der Expression von membranständigem Mucin1 mit fortschreitender Tumorprogression (vgl. Abbildung 3), sowie ein signifikant höheres Überleben bei membranständiger Mucin1 Expression beobachtet werden (vgl. Abbildung 29 und Abbildung 30). Auf noch ungeklärte Weise kann es während der Tumorprogression jedoch zum Verlust der Zellpolarität kommen, was bedeutet, dass in der Expression transmembraner Proteine nicht mehr zwischen apikal und basolateral unterschieden wird. Dabei kann sich der N-Terminale Mucin1-Abschnitt von der transmembranen Proteinstruktur lösen, wobei dieser als membranständiger Rezeptor zurückbleibt. Die zytoplasmatische Untereinheit von Mucin1 kann sich währenddessen auf den Intrazellulärraum verteilen, dort mit Proteinen wie Rezeptor-Tyrosinkinasen interagieren und im Zellkern (vgl. Abbildung 32) auf die Genexpression Einfluss nehmen [35, 71, 72]. Während das apikale Verteilungsmuster von Mucin1 bei Überexpression mit einer besseren Prognose einhergeht, wurde das intrazelluläre Vorkommen von Mucin1 von einigen Autoren als ein Faktor eingestuft, der mit einer schlechteren Prognose einhergeht [69, 70], was auch die vorliegende Studie bestätigt (vgl. Abbildung 31). Dies lässt vermuten, dass es hier zu Beeinflussung von Proteinen und Genexpressionen kommt, die eine Tumorprogression fördern. Einige Studien beschrieben hier bereits Korrelationen mit der vermehrten Expression von Protoonkogenen wie c-SRC [86] und c-ABL [87] und mit den Zellzyklus regulierenden Genen wie Glykogensynthase-Kinase 3 [88]. Dieses zytoplasmatische Aufkommen von Mucin1 wurde wie bereits erwähnt in der vorliegenden Studie ebenfalls immunhistochemisch detektiert und in der gesamten weiteren Analyse berücksichtigt.

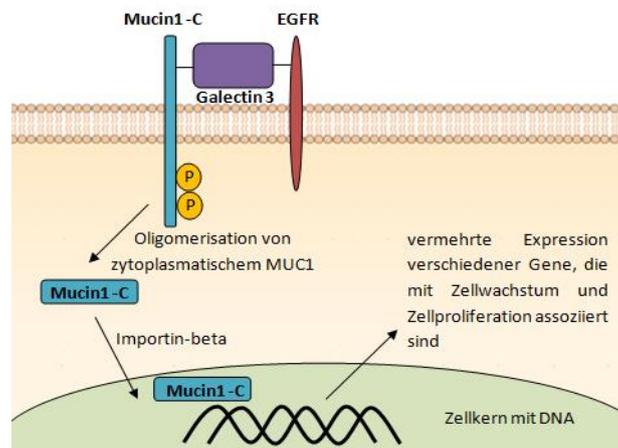


Abbildung 32 Intrazelluläre Signalfunktion von Mucin1; In Anlehnung an Kufe, D.W., *Mucins in cancer: function, prognosis and therapy*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(12): p. 874-85.

5. Diskussion

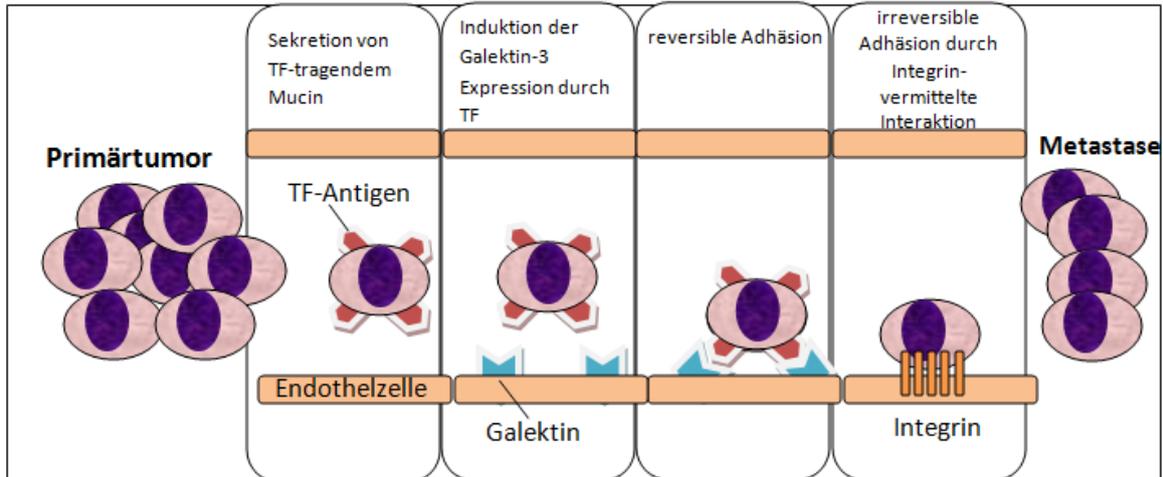


Abbildung 33 Einflüsse des TF-Antigens bei der Metastasierung, In Anlehnung an: Anti-Thomsen-Friedenreich-Ag (anti-TF-Ag) potential for cancer therapy; Adel Almogren, Julia Abdullah, Kshipra Ghapure, Kimiko Ferguson, Vladislav V. Glinsky, Kate Rittenhouse-Olson [Frontiers in Bioscience S4, 840-863, January 1, 2012]

Beim Thomsen-Friedenreich Antigen handelt es sich um eines von 4 mit Tumoren assoziierten extrazellulären Kohlenhydratepitopen von Transmembranproteinen wie Mucin1. Die Expression des TF-Antigens entsteht durch eine inkompletten Synthese von O-Glykanen an dem Trägerprotein [50]. Während die Kohlenhydratstruktur der Transmembranproteine im gesunden Gewebe durch die core-2- β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) kettenförmig verlängert wird, wird die verkürzte Kette im Tumorgewebe durch die β -galactoside- α 2,3-sialyltransferase (ST3Gal I) mit Sialylresten modifiziert und somit Tumor-assoziierte Epitope wie das Thomsen-Friedenreichantigen freigesetzt [39, 75, 89-91]. Grund dafür ist die im Gewebe vieler Karzinome verminderte Aktivität von C2GnT bei gleichzeitig stark erhöhter Aktivität der ST3Gal I [90], deren Kontrolle und die genauen Mechanismen deren Regulation weitgehend unbekannt sind [92]. Auch ein niedrigerer pH Wert im Tumorgewebe, der durch anaerobe Glykolyse bedingt sein kann (Warburg-Effekt [93]) begünstigt eine Syalinsierung der Kohlenhydratketten [94]. Große Bedeutung wird dem TF- Antigen vor allem bei der Tumorprogression und der Entstehung von Tumormetastasen beigemessen [50, 95, 96]. Dabei kommt es einerseits zu einer Bindung der Sialylreste an Galectin3, einem Transmembranprotein an Endothelzellen, wobei hier durch die Zelladhäsion die Voraussetzung für Metastasierungsprozesse gesetzt wird [96, 97] (vgl. Abbildung 33). Andererseits können die exprimierten TF-Epitope über noch ungeklärte Mechanismen die Galektin3-Expression von Endothelzellen mobilisieren [96] und über Carbohydrat-bindende Proteinen (Lectine) mit anderen Zellen interagieren und kommunizieren.

5. Diskussion

Dadurch kann zusätzlich der Metastasierungsvorgang und auch die Tumorprogression gefördert werden [50]. Diese Erkenntnisse lassen sich gut mit dem in der vorliegenden Studie herausgefundenen hochsignifikanten Anstieg der Expression des Thomsen-Friedenreich Antigens bei abnehmender Tumordifferenzierung in Einklang bringen (vgl. Abbildung 15). Die hochsignifikante positive Korrelation zwischen zytoplasmatischem Mucin1 und den beiden untersuchten Epitopen TF1 und TF2 beim duktalem, schlecht differenzierten Mammakarzinom (G3) (vgl. Tabelle 35) und die oben beschriebene Eigenschaft von zytoplasmatischem Mucin1 auf die Genexpression Einfluss zu nehmen, lässt auf eine Interaktion zwischen den beiden Akteuren hindeuten. Eine Beeinflussung der TF-Expression, deren Kontrolle im Detail noch geklärt ist, durch zytoplasmatisches Mucin1 ist durchaus denkbar. Diese könnte etwa durch Kontrolle der Enzyme C2GnT und ST3Gal-I oder durch Förderung der anaeroben Glykolyse stattfinden.

Bei Her4/phospho-Her4 handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase und damit um ein Transmembranprotein [76, 77]. Während das Struktur- verwandte und sehr gut untersuchte Protein Her2/neu in 20-30% aller Mammakarzinome stark überexprimiert ist, zeigt Her4 eine variable Expression und ist nur äußerst selten über das physiologische Ausmaß hinweg exprimiert [58], teilweise sogar vermindert [98]. Im Gegensatz zu Her2/neu sind die Eigenschaften und die Funktion von Her4 noch auf weiten Strecken unerforscht. Lange Zeit hatte Her4 daher die Rolle eines Tumorsuppressors inne, da Her4 nach Ligandenbindung vor allem für Zelldifferenzierung und Wachstumsstopp verantwortlich ist, beziehungsweise die Apoptose aktivieren kann [67, 98, 99]. Jene Vorstellung lässt sich durch verschiedene Arbeiten stützen, die Brustkrebspatientinnen mit einer Überexpression von Her4 ein bessere Prognose bescheinigten [58, 79, 100, 101]. Diese Erkenntnisse lassen sich jedoch nicht so leicht mit der in dieser Studie erwähnten hochsignifikanten positiven Korrelation zwischen phospho-Her4 und zytoplasmatischem Mucin1 bei schlecht differenzierten Tumoren in Einklang bringen (vgl. Tabelle 28). Die Eigenschaften von Her4 müssen daher differenzierter betrachtet werden, da neuere Erkenntnisse die Vielfalt und Komplexität der Her4 Funktion an den Tag gelegt haben [78, 80, 102, 103], weshalb sich der prognostischen Impact der Her4-Expression schwer beurteilen lässt [104], und eine Zuordnung zu den Tumorsuppressoren beziehungsweise zu den Onkogenen nicht so einfach getroffen werden kann [62, 103].

Einerseits ist die Funktionsweise der Signaltransduktion von Her4 nach Ligandenbindung sehr komplex, da es hier sowohl zu einer Homodimerisierung von zwei zytoplasmatischen Domänen von Her4, als auch zu einer Heterodimerisierung zwischen Her4 und anderen Mitgliedern der EGFR-Familie wie zum Beispiel Her2 kommen kann [58, 65]. Die Art der Dimerisierung entscheidet aufgrund unterschiedlicher Phosphorylierungsmuster der Tyrosinreste über die Palette von Genen, die nach Rezeptorbindung exprimiert wird und damit ob das Tumorwachstum angetrieben oder gehemmt wird. Laut einer Studie von Mill et.al. ist eine Heterodimerisierung zwischen Her4 und Her2 nötig, um nach Bindung eines Her4-Liganden nicht die bisher bekannte antiproliferative, proapoptotische Zellantwort zu erstellen, sondern das Tumorwachstum zu beschleunigen. Eine Homodimerisierung dagegen führt zu Zelldifferenzierung und Proliferationsstopp. Eine Hypothese von Mill et. al. besteht darin, dass die Amplifikation von Her2 bei einigen Mammakarzinomen, die Her4 Antwort dergestalt beeinflusst, dass es zur vermehrten Heterodimerisierung zwischen Her2 und Her4 kommt [62].

Andererseits besticht Her4 durch eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme auf das Zellwachstums, die einzigartig in der Familie der EGFR-Rezeptortyrosinkinasen ist. Man kennt inzwischen 4 Isoformen von Her4, die durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen, wobei 2 unterschiedliche extrazelluläre Domänen (JMa und JMb) und 2 intrazelluläre Untereinheiten (Cyt1 und Cyt2) beschrieben werden. Die extrazelluläre Variante JMa kann von Matrixmetalloproteasen wie Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) proteolysiert werden. Durch eine weitere Proteolyse der intrazellulären Untereinheit von Her4 durch die γ -Sekretase entsteht eine freie intrazelluläre Domäne von Her4 (4ICD), die unter anderem im Zellkern als Transkriptionsfaktor fungierend die Genexpression beeinflusst. Das Protein 4ICD der intrazellulären Variante Cyt2 ist im Stande Gene zu exprimieren, die für Zellwachstum und Proliferation verantwortlich sind und würde somit die Rolle eines Onkogens übernehmen (vgl.

Abbildung 34) [80, 103]. Das zeigt sich auch in verschiedenen Studien, in denen Patientinnen mit der zytoplasmatischen, beziehungsweise der nukleären Erscheinungsform von Her4 eine schlechtere Prognose im Gesamtüberleben zugeschrieben wurde [78, 79].

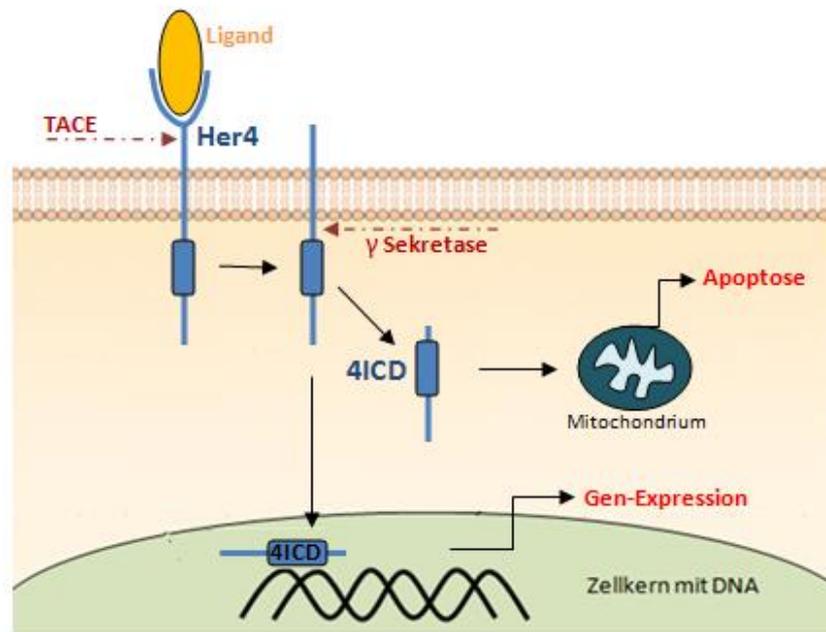


Abbildung 34 Intrazelluläre Signalfunktion von Her4 durch 4ICD nach Proteolyse, In Anlehnung an J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2008: 10.1007/s10911-008-9076-6. Epub 2008 May 13. HER4 intracellular domain (4ICD) activity in the developing mammary gland and breast cancer. Jones FE.

Die genauen Mechanismen, die Einfluss auf die Dimerisierung, beziehungsweise das alternative Spleißen nehmen und somit mitbestimmend sind ob eine Zelle unkontrolliert wächst oder sich ausdifferenziert sind weitgehend unbekannt. Es konnte bisher lediglich eine gewisse gegenseitige Wechselwirkung mit dem Östrogenrezeptor festgestellt werden, wobei einerseits gezeigt wurde, dass die Proteolyse-Mechanismen östrogenabhängig stimuliert werden kann und andererseits, dass 4ICD die zellproliferative Wirkung von Östrogen potenziert [105]. Auch konnten in Zellkultur-Studien eine Her4-vermittelte Wachstumsstimulation von Hormonrezeptor positiven Tumorzellen nachgewiesen werden [106, 107].

Da in der vorliegenden Studie vorwiegend intrazelluläre Expressionsmuster von Her4 beziehungsweise seiner phosphorylierten Form phospho-Her4 zu verzeichnen sind, und diese mit der zytoplasmatischen Expression von Mucin1 vor allem bei schlecht differenzierten Karzinomen (G3) positiv signifikant korrelieren, sind auch hier Interaktionen möglich. Wie bereits beschrieben, verfügt die zytoplasmatische Lokalisation von Mucin1 über einen Einfluss auf die Expression verschiedenster Gene. Auch sind Stimulationen des Her4 Struktur-verwandten Her2 durch Mucin1 beschrieben [108], sodass aktivierende Einflüsse von Mucin1 auch auf die oben genannten, Zellwachstums-stimulierenden Funktionen von Her4 denkbar sind.

Kritisch betrachtet ergeben sich folgende Sachverhalte, die die Ergebnisse der vorliegenden Studie in ihrer Aussagekraft limitieren und die bei der Interpretation dieser berücksichtigt werden müssen:

Einerseits muss die Methode der immunhistochemischen Analyse differenziert angesehen werden. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mittels IRS Score als eine rein subjektive Methode kann die Tragweite der Ergebnisse durchaus einschränken.

Andererseits wurde bei der immunhistochemischen Färbung von phospho-Her4 in dieser Studie eine einzige Phosphorylierungsstelle berücksichtigt (Tyrosinrest pY1162). Laut Chuu et.al. ist es jedoch für den Einfluss auf das Zellwachstum nicht unerheblich, welcher Tyrosinrest phosphoryliert ist [103]. So kann man auch hier eine Limitierung des Ergebniswerts nicht vollkommen ausschließen.

Des Weiteren konnten in der Auswahl des Patientinnenkollektivs nicht alle zusätzlichen, die Expressionen stimulierenden oder hemmenden Faktoren berücksichtigt werden. So hat zum Beispiel der nicht in die Studie mit einbezogen Östrogenrezeptorstatus eine nicht zu vernachlässigenden Gewichtung in der Beeinflussung der Her4 Expression und Funktion [105-107]. Auch dieser Punkt darf bei der kritischen Betrachtung und Bewertung der Ergebnisse dieser Studie nicht vergessen werden.

Außerdem wurden in dieser Arbeit Gewebeproben in unterschiedliche histologische Subtypen klassifiziert, die heute als zusammengefasst betrachtet werden, wie etwa das duktales Mammakarzinom und der szirrhöse Subtyp. Dies diente in dieser Studie einer differenzierteren Betrachtung der Expressionseigenschaften des Tumors bezogen auf die histologische Morphologie.

Resümierend sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage für Interaktionen zwischen dem zytoplasmatischen Mucin1 und seinem Epitop, dem Thomsen Friedenreichrezeptor als auch mit der Rezeptotyrosinkinase Her4. Anhand der Ergebnisse können diese Aussagen vor allem für den duktales Subtyp des Mammakarzinoms getroffen werden, der jedoch 80% aller malignen Brusttumore ausmacht [109].

Ob und wie Mucin1 die putativen Interaktionspartner auf molekularer Ebene beeinflusst, beziehungsweise von ihnen beeinflusst wird sollte in Zentrum der Fragestellungen weiterer Studien stehen, da dieser Sachverhalt nicht unerheblich für zukünftige Diagnostik und Therapie von Mammakarzinompatientinnen sein könnte.

Denn sowohl Mucin1, das Thomsen Friedenreich-Epitop, als auch Her4 werden als zukünftige Ziele im Sinne des „targeted-therapy“-Konzepts gehandhabt, und damit ähnliche Erfolge erhofft, wie mit dem in der klinischen Routine eingesetzten Trastuzumab gegen die Rezeptortyrosinkinase Her2 [110].

Bei Mucin1 sind sowohl Impfstudien durchgeführt worden [32, 35, 72], als auch monoklonale Antikörper, wie der hier zur immunhistochemischen Färbung verwendete Antikörper PankoMab in Erprobung [73].

Das Thomsen-Friedenreich Antigen könnte ebenfalls ein Ziel einer immunologisch orientierten Therapie sein. Auch hier gibt es Impfstudien, zum Beispiel mit einem mit TF-Antigen konjugiertem Tetanus-Toxoid [51, 52]. Des Weiteren konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine Therapie mit JAA-F11, einem monoklonalen Immunglobulin gegen das TF-Antigen, den Metastasierungsprozess inhibieren und damit die Prognose verbessern kann [52].

Bei der Betrachtung von Her4 als Therapieziel konnten Mill et.al. zeigen, dass der monoklonale Antikörper Pertuzumab, ein Antagonist von Her2, der Her2/Her4 Heterodimerisierung verhindern kann und somit die Zellwachstums-stimulierenden Funktion von Her4 zu vermindern vermag [62]. Allgemein darf man aber, wenn man Her4 als Therapieziel ins Auge fasst, nicht die oben bereits beschriebenen Tumorsupprimierenden Eigenschaften von Her4 vergessen, die während der Rekonvaleszenz eines Mammakarzinoms erwünscht sind.

5. Diskussion

Sollte sich nun eine Zusammenarbeit der untersuchten Antigene zusätzlich auf molekularer Ebene nachweisen lassen, könnten Patientinnen, die eine verstärkte Expression jener Akteure aufweisen von Kombinationstherapien gegen diese Ziele profitieren. Denn hierdurch wäre eine Verstärkung der Wirkung im Sinne eines pharmakodynamischen Synergismus der einzelnen Präparate denkbar.

Dabei wäre dann noch des Weiteren die Frage zu klären in welchem Ausmaß diese vermeintlichen Ziele einer immunologischen Therapie zugänglich sind, da sich ja ein nicht unerheblicher Teil der untersuchten Antigene im intrazellulären Raum aufhält und damit den im Blut zirkulierenden Antikörpern verborgen bleibt. Auch die Entwicklung von Therapieresistenzen wäre denkbar, wenn die Ziele zum Beispiel durch einen Therapie-bedingten Selektionsprozess zur Gänze nur noch intrazellulär exprimiert werden würden.

6. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist weltweit mit über 508.000 Sterbefällen die häufigste krebsbedingte Todesursache. Um dennoch eine Heilung erzielen zu können, existiert ein multimodales Therapiekonzept mit kurativer Absicht. Zu diesem Konzept gehört unter anderem auch die gezielte Krebstherapie, bei welchem sich ein Pharmakon spezifisch gegen Tumorantigene richtet.

Da viele Tumorantigene jedoch nicht von allen Mammakarzinomen exprimiert werden, ist die Suche nach weiteren potentiellen Zielen für dieses Konzept sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Expressionsverhalten einiger relevanter Antigene analysiert. Dabei wurden die Antigene Mucin1, sein Epitop, das Thomsen-Friedenreich Antigen und die Tyrosinkinase Her4, beziehungsweise seine aktivierte, phosphorlierte Form phospho-Her4 untersucht.

Mucin1, einem beim Mammakarzinom überexprimierten Transmembranprotein wird dabei eine wichtige Rolle in der Tumorprogression zugeschrieben, indem es sich während der Tumorgenese anreichern und somit die Genexpression beeinflussen kann.

Das TF-Antigen wird hauptsächlich von Karzinomen und embryofetalem Gewebe gezeigt. Als Oberflächenepitop wird ihm Einfluss auf Adhäsions- und damit Metastasierungsprozesse zugeschrieben.

Die Rolle von Her4 in der Tumorprogression dagegen ist trotz Verwandtschaft zum bekannten Onkogen Her2/neu nicht ganz geklärt. Sowohl tumorsuppressives, wie auch onkogenes Potential sind beschrieben.

In der vorliegenden Studie wurden nun die genannten Antigene zu ihrem Verhältnis zur Zelldifferenzierung und zu ihrer Verteilung bezüglich des histologischen Subtyps, sowie der Herdverteilung untersucht. Des Weiteren wurden die Korrelationen der Antigene untereinander analysiert.

Dabei wurde Tumorgewebe von 235 operierten Mammakarzinompatientinnen untersucht. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde dabei per ABC-Methode immunhistochemisch gefärbt, mittels IRS-Score nach Remmele und Stenger bewertet und danach mit dem Kruskal-Wallis Test, dem Mann-WhitneyTest und der Korrelationsanalyse nach Pearson statistisch ausgewertet. Des Weiteren wurde das Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit ihres Mucin1-Expressionsmusters mittels Kaplan Meier Analyse und Cox-Regression untersucht.

6. Zusammenfassung

Bei der optischen Auswertung von Mucin1 fallen zwei verschiedene Färbereaktionen auf, sodass bei der weiteren Analyse eine membranständige von einer zytoplasmatischen Expression differenziert werden konnten. Auch bei Her4/phospho-Her4 ist die Expression vor allem intrazellulär auszumachen, trotz der Tatsache, dass es sich bei Her4 um ein Transmembranprotein handelt. Eine Erklärung hierfür könnten Veränderungen der Zellstruktur bei Tumoren liefern. Verschiedene Autoren konnten diesbezüglich zeigen, dass in Karzinomen sowohl Mucin1 als auch Her4/phospho-Her4 ihre Lokalisation von der Zellmembran ins Zellinnere verlegen können, um sich dadurch über Beeinflussung der Genexpression am Tumorwachstum zu beteiligen. Das Thomsen-Friedenreich Antigen befindet sich dagegen wie bei einem Oberflächenepitop zu erwarten an der Zellmembran.

Die statistische Auswertung beschreibt vor allem bei schlecht differenzierten (G3), duktal-klassifizierten Mammakarzinomen hochsignifikante, positive Korrelationen des zytoplasmatischen Mucin1 mit dem TF-Antigen und mit phospho-Her4. Jenes zytoplasmatische Mucin1 zeigt dabei ein schlechteres Überleben als die membranständige Mucin1-Expression.

Diese signifikanten Korrelationen und die Erkenntnis, dass zytoplasmatisch-exprimiertes Mucin1 die Genexpression zu beeinflussen vermag, könnten einen Erklärungsansatz für die TF-Expression bei Karzinomen liefern, deren Regulation noch nicht vollständig geklärt ist. Genauer gesagt, eine Interaktion der beiden Akteure untereinander bei schlecht differenzierten, dukalen Karzinomen ist durchaus denkbar.

Die Regulation der proteolytischen Verlagerung von Her4/phospho-Her4 ins Zellinnere, welche Her4 erst ein onkogenes Potential verleiht, ist ebenfalls auf weiten Strecken unerforscht. Auch hier könnte durch die beschriebene Korrelation eine Interaktion mit Mucin1 mitverantwortlich gemacht werden.

Wenn eine Zusammenarbeit der beschriebenen Antigene auch auf molekularer Ebene nachgewiesen werden könnten, würden diese ein denkbares, potentes Ziel für die beschriebene „targeted therapy“ darstellen. Denn eine antagonisierende Therapie gegen Proteine, die sich gegenseitig beeinflussen lässt eine Verstärkung der Therpiewirkung, im Sinne eines pharmakodynamischen Synergismus erhoffen.

Die intrazelluläre Lage der Antigene könnte dagegen ein pharmakokinetisches Hindernis bei einer monokloalen Antikörpertherapie darstellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Riede, U.-N., H.-E. Schäfer, and M. Werner, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2004. p. 973.
2. WHO. *Breast cancer: prevention and control*. 2014 [cited 2014; Available from: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>].
3. WHO, *International Agency for Research on Cancer - Handbooks of Cancer Prevention: Breast Cancer Screening*. 2014. p. 1-2.
4. *Zentrum für Krebsregisterdaten - Brustkrebs*. 13.12.2013 [cited 2014; Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html].
5. Dumitrescu, R.G. and I. Cotarla, *Understanding breast cancer risk, where do we stand in 2005?* . J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 208-221.
6. McPherson, K., C.M. Steel, and J.M. Dixon, *ABC of breast diseases. Breast cancer - epidemiology, risk factors, and genetics*. Bmj, 2000. **321**(7261): p. 24-28.
7. Antoniou, A., et al., *Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies*. American journal of human genetics, 2005. **72**(5): p. 1117-1130.
8. Anne, C.R. and K. Possinger, *Mammakarzinom: Manual Diagnostik und Therapie*. 2005: Deutscher Ärzteverlag.
9. Baltzer, J., H.G. Mehrpohl, and J. Bahnsen, *Praxis der Frauenheilkunde: Praxis der gynäkologischen Onkologie: Konzepte für das differenzierte Vorgehen in Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 2000, Thieme: Stuttgart. p. 279.
10. Roodi, N., et al., *Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor - negative primary breast cancer*. J Natl Cancer Inst., 1995. **87**(6): p. 446-51.
11. Hanstein, B. and e. al., *Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer*. European Journal of Endocrinology 2004. **150**(3): p. 243-55.

7. Literaturverzeichnis

12. *Anforderungen an strukturierte Behandlungsprogramme für Patientinnen mit Brustkrebs“, Anlage 3 zu §§ 28b bis 28 g der Risikostrukturausgleichs-Verordnung nach § 137f SGB Fünftes Buch (V).*
13. Blichert-Toft, M., *The axilla: to clear or not to clear? That is the question!* Recent Results in Cancer Research, 1998. **152**: p. 149-160.
14. Fisher, B., et al., *Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: an update of the national surgical adjuvant breast and bowel project experience.* Seminars in Oncology, 2001. **28**(4): p. 400-418.
15. Kuehn, T., et al., *A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance.* Cancer 2005. **103**(3): p. 451-461.
16. Lanitis, S., et al., *Comparison of skinsparing mastectomy versus non skinsparing mastectomy for breast cancer: a metaanalysis of observational studies.* Annals of Surgery, 2012. **251**(4): p. 632-663.
17. Darby, S., et al., *Effect of radiotherapy after breast conserving surgery on 10 year recurrence and 15year breast cancer death: metaanalysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials.* Lancet, 2011. **378**(9804): p. 1707-1716.
18. Kaufmann, M., et al., *Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update.* Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(12): p. 1940-1949.
19. Bria, E., et al., *Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients.* Cancer, 2006. **106**(11): p. 2337-2344.
20. Clarke, M., et al., *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15year survival: an overview of the randomised trials.* Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2087-2106
21. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient level metaanalysis of randomised trials.* Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-784.
22. Harris, E.E., et al., *Impact of concurrent versus sequential tamoxifen with radiation therapy in early stage breast cancer patients undergoing breast conservation treatment.* Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(1): p. 11-16.

7. Literaturverzeichnis

23. Burstein, H.J., et al., *American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor positive breast cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. **28**(23): p. 3784-3796.
24. *National Cancer Institute at the National Institutes of Health: General Information About Breast Cancer*. 21.02.2014 [cited 2014; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/healthprofessional>].
25. *Advanced breast cancer: Diagnosis and Treatment*, in *NICE Clinical Guidelines*. 2009, National Collaborating Centre for Cancer. p. 1-98.
26. Dalgleish, A. and H. Pandha, *Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines*. *Advances in Cancer Research*, 2007. **96**: p. 175-190.
27. *Deutsches Krebsforschungszentrum, Das Immunsystem: Funktion und Bedeutung bei Krebs*. 2010; Available from: <http://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/immunsystem.php>.
28. Kessler, J.H., et al., *BCR-ABL fusion regions as a source of multiple leukemia-specific CD8+ T-cell epitopes*. *Leukemia*, 2006. **20**: p. 1738-1750.
29. Yang, F. and X.F. Yang, *New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors*. *Cellular & Molecular Immunology*, 2005. **2**: p. 331–341.
30. Untch, M., et al., *Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen*. *Deutsches Ärzteblatt*, 2006. **103**: p. 3406-3410.
31. Hanisch, F.-G. and S. Müller, *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*. *Glycobiology*, 2000. **10**(5): p. 439-449.
32. Apostolopoulos, V., I.F. McKenzie, and G.A. Pietersz, *Breast cancer immunotherapy: current status and future prospects*. *Immunology & Cell Biology*, 1996. **74**(5): p. 457-464.
33. Duffy, M., et al., *CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer*. *The International Journal of Biological Markers*, 2000. **15**(4): p. 330–333.
34. Gadducci, A., et al., *Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004. **58**(1): p. 24-38.
35. Kufe, D.W., *Mucins in cancer: function, prognosis and therapy*. *Nature Reviews Cancer*, 2009. **9**(12): p. 874-885.

36. Ligtenberg, M., et al., *Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin*. *Cancer Research*, 1992. **52**: p. 2318–2324.
37. J., W., et al., *Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components*. *The Journal of Cell Biology*, 1995. **129**: p. 255–265.
38. Lloyd, K.O., et al., *Comparison of o-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**: p. 33325–33334.
39. Hanisch, F.G., et al., *Structures of neutral O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly-N-acetyllactosamine backbones with Gal β (1-6) repeating units*. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. **264**: p. 872–883.
40. Goletz, S., et al., *Thomsen-Friedenreich antigen: the "hidden" tumor antigen*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2003. **535**: p. 147–162.
41. Cao, Y., U. Karsten, and J. Hilgers, *Immunohistochemical characterization of a panel of 56 antibodies with normal human small intestine, colon, and breast tissues*. *Tumor Biology*, 1998. **19**(1): p. 88-99.
42. Cao, Y. and U. Karsten, *Binding pattern of 51 monoclonal antibodies to peptide and carbohydrate epitopes of the epithelial mucin (MUC1) on tissue sections of adenolymphomas of the parotid (Warthin's tumours): role of epitope masking by glycans*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2001. **115**: p. 349–356.
43. Cao, Y., P.M. Schlag, and U. Karsten, *Immunodetection of epithelial mucin (MUC1, MUC3) and mucin-associated glycotopes (TF, Tn, and sialosyl-Tn) in benign and malignant lesions of colonic epithelium: apolar localization corresponds to malignant transformation*. *Virchows Archiv*, 1997. **431**: p. 159–166.
44. Taylor-Papadimitriou, J., et al., *MUC1 and Cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999. **1455**: p. 301–313.
45. Cao, Y., et al., *Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study*. *Histochemistry and Cell Biology*, 1996. **106**(2): p. 197-207.
46. Springer, G.F., *T and Tn, general carcinoma autoantigens*. *Science* 1984. **224**(4654): p. 1198-206.

47. Richter, D.U., et al., *Expression of the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in the human placenta* Anticancer Research, 2000. **20**(6D): p. 5129-5133.
48. Jeschke, U., et al., *Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1 or an anti-TF antibody*. Histochemistry and Cell Biology, 2006. **126**(4): p. 437-444.
49. Barr, N., et al., *Are pancarcinoma T and Tn differentiation antigens?* Cancer, 1989 **64**(4): p. 834-841.
50. Yu, L.-G., *The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression*. Glycoconjugate Journal, 2007. **24**: p. 411–420.
51. Hoffmann-Röder, A., et al., *Synthetische Antitumorvakzine aus Tetanus-Toxoid-Konjugaten von MUC1-Glycopeptiden mit Thomsen-Friedenreich-Antigen und dessen fluorsubstituiertem Analogon*. Angewandte Chemie, 2010. **122**(45): p. 8676–8681.
52. Almogren, A., et al., *Anti-Thomsen-Friedenreich-Ag (anti-TF-Ag) potential for cancer therapy*. Frontiers in Bioscience, 2012. **4**: p. 840-863.
53. Andergassen, U., et al., *Detection of breast cancer cells in blood samples by immunostaining of the Thomsen-Friedenreich antigen*. Future Oncology, 2013. **9** (5): p. 747-752.
54. Andergassen, U., et al., *Detection and characterisation of disseminated tumour cells in bone marrow of breast cancer patients by immunostaining of Her-2 and MUC-1 in combination with Thomsen-Friedenreich (CD176)*. Histology and Histopathology, 2014.
55. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie*. Vol. 6. 2007, Heidelberg Spektrum Akademischer Verlag.
56. Dutta, P.R. and A. Maity, *Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy*. Cancer Letters, 2007. **254**(2): p. 165-177.
57. Ciardiello, F., *EGF-Rezeptorblockade mit monoklonalen Antikörpern und so genannten «small molecules*. Onkologie - International Journal for Cancer Research and Treatment 2005. **28**(4): p. 18-24.
58. Earp, H.S., B.F. Calvo, and C.I. Sartor, *The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4*. Transactions of the American Clinical and Climatological Association, 2003. **114**: p. 315-334.

7. Literaturverzeichnis

59. Olayioye, M.A., *Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members*. Breast Cancer Res, 2001. **3**(6): p. 385-389.
60. Gala, K. and S. Chandarlapaty, *Molecular Pathways: HER3 Targeted Therapy*. Clinical Cancer Research, 2014.
61. Monsey, J., et al., *Her4 and Her2/neu tyrosine kinase domains dimerize and activate in a reconstituted in vitro system*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **185**(10): p. 7035-7044.
62. Mill, C.P., et al., *ErbB2 Is Necessary for ErbB4 Ligands to Stimulate Oncogenic Activities in Models of Human Breast Cancer*. Genes Cancer, 2011. **2**(8): p. 792-804.
63. Pentassuglia, L. and D.B. Sawyer, *The role of Neuregulin-1beta/ErbB signaling in the heart*. Experimental Cell Research, 2009. **315**(4): p. 627-637.
64. Birchmeier, C., *ErbB receptors and the development of the nervous system*. Experimental Cell Research, 2009. **315**: p. 611-618.
65. Qiu, C., et al., *Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase*. Structure, 2008. **16**(3): p. 460-467.
66. Silberberg, G., et al., *The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies*. American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics, 2006. **141**(B2): p. 142-148.
67. Karamouzis, M.V., F.A. Badra, and A.G. Papavassiliou, *Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**: p. 851–856.
68. Seregini, E., A. Coli, and N. Mazzucca, *Circulating tumour markers in breast cancer*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2004. **31**(1): p. 15-22.
69. van der Vegt, B., et al., *The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma*. Histopathology, 2007. **51**(3): p. 322-335.
70. de Oliveira, J.T., et al., *MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features*. The Veterinary Journal, 2009. **182**(3): p. 491-493.
71. Singh, P.K. and M.A. Hollingsworth, *Cell surface-associated mucins in signal transduction*. Trends in Cell Biology, 2006. **16**(9): p. 467-476.

7. Literaturverzeichnis

72. Kufe, D.W., *Targeting the human MUC1 oncoprotein: a tale of two proteins*. Cancer biology & therapy 2008. **7**(1): p. 81-84.
73. Danielczyk, A., et al., *PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2006. **5**(11): p. 1337-1347.
74. Dian, D., et al., *Evaluation of a Novel Anti-Mucin 1 (MUC1) Antibody (PankoMab) as a Potential Diagnostic Tool in Human Ductal Breast Cancer; Comparison with Two Established Antibodies*. Onkologie, 2009. **32**(5): p. 238-244.
75. Dalziel, M., et al., *The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **275**: p. 11007-11015.
76. Zimonjic, D.B., et al., *Localization of the human HER4/erbB-4 gene to chromosome 2*. Oncogene, 1995. **10**(6): p. 1235–1237.
77. Sardi, S.P., et al., *Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain*. Cell, 2006. **127**(1): p. 185–197.
78. Määttä, J.A., et al., *Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth*. Molecular Biology of the Cell, 2006. **17**(1): p. 67–79.
79. Junttila, T.T., et al., *Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells*. Cancer Research, 2005. **65**: p. 1384–1393.
80. Koutras, A.K., et al., *The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer*. Critical Reviews in Oncology /Hematology, 2010. **74**(2): p. 73-78.
81. Lundy, J., et al., *Monoclonal antibody DF3 correlates with tumor differentiation and hormone receptor status in breast cancer patients*. Breast Cancer Research and Treatment, 1985. **5**(3): p. 269-276.
82. Rahn, J.J., et al., *The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature*. Cancer, 2001. **91**(11): p. 1973-1982.
83. Ellis, I.O., et al., *Immunocytochemical staining of breast carcinoma with the monoclonal antibody NCRC 11: a new prognostic indicator*. British medical journal (Clinical research ed.), 1985. **290**(6472): p. 881-883.

7. Literaturverzeichnis

84. Baildam, A.D., et al., *The expression of milk fat globule antigens within human mammary tumours: relationship to steroid hormone receptors and response to endocrine treatment*. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 1989. **25**(3): p. 459-467.
85. Walker, R.A., *Assessment of milk fat globule membrane antibodies and lectins as markers of short-term prognosis in breast cancer*. British journal of cancer, 1990. **62**(3): p. 462-466.
86. Li, Y., et al., *The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 β and β -catenin*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 6061–6064.
87. Raina, D., et al., *MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage*. The EMBO Journal, 2006. **25**: p. 3774–3783.
88. Li, Y., et al., *Interaction of glycogen synthase kinase 3 β with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and β -catenin*. Molecular and Cellular Biology, 1998. **18**: p. 7216–7224.
89. Amano, J., et al., *Structures of mucin-type sugar chains of the galactosyltransferase purified from human milk. Occurrence of the ABO and Lewis blood group determinants*. The Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**: p. 11461–11477.
90. Brockhausen, I., et al., *Mechanism underlying aberrant glycosylation of the MUC1 mucin in breast cancer cells*. European Journal of Biochemistry 1995. **233**: p. 607–617.
91. Burchell, J.M., A. Mungul, and J. Taylor-Papadimitriou, *O-linked glycosylation in the mammary gland: Changes that occur during malignancy*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2001. **6**: p. 355–364.
92. Solatycka, A., et al., *MUC1 in human and murine mammary carcinoma cells decreases the expression of core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and β -galactoside α 2,3-sialyltransferase*. Glycobiology, 2012. **22**(8): p. 1042-1054.
93. Hsu, P. and D. Sabatini, *Cancer cell metabolism: Warburg and beyond*. Cell, 2008. **134**(5): p. 703-707.
94. Kannagi, R., *Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited*. Glycoconjugate Journal, 2004. **20**(5): p. 353-364.

7. Literaturverzeichnis

95. Yu, L.-G., et al., *Galectin- 3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion*. The Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**: p. 773–781.
96. Glinsky, V.V., et al., *The Role of Thomsen-Friedenreich Antigen in Adhesion of Human Breast and Prostate Cancer Cells to the Endothelium1*. Cancer Research, 2001. **61**(12): p. 4851-4857.
97. Regimbald, L.H., et al., *The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer*. Cancer Research, 1996. **56**(18): p. 4244–4249.
98. Pitfield, S.E., et al., *Phosphorylation of ErbB4 on tyrosine 1056 is critical for ErbB4 coupling to inhibition of colony formation by human mammary cell lines*. Oncology Research, 2006. **16**(4): p. 179-193.
99. Feng, S.M., et al., *The HER4 cytoplasmic domain, but not its C terminus, inhibits mammary cell proliferation*. Molecular Endocrinology, 2007. **21**(8): p. 1861-1876.
100. Kew, T.Y., et al., *c-erbB-4 protein expression in human breast cancer*. British Journal of Cancer, 2000. **82**: p. 1163-1170.
101. Witton, C.J., et al., *Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer*. The Journal of Pathology, 2003. **200**: p. 290–297.
102. Zhu, Y., et al., *Coregulation of estrogen receptor by estrogen-inducible ERBB4/HER4 establishes a growth promoting autocrine signal in breast cancer*. Cancer Research, 2006. **66**: p. 7991–7998.
103. Chuu, C.P., et al., *Systems-level analysis of ErbB4 signaling in breast cancer: a laboratory to clinical perspective*. Molecular Cancer Research, 2008. **6**(6): p. 885-891.
104. Machleidt, A., et al., *The prognostic value of Her4 receptor isoform expression in triple-negative and Her2 positive breast cancer patients*. BMC Cancer, 2013. **24**(13): p. 437.
105. Han, W. and F.E. Jones, *HER4 selectively coregulates estrogen stimulated genes associated with breast tumor cell proliferation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014. **443**(2): p. 458-463.

7. Literaturverzeichnis

106. Cohen, B.D., et al., *HER4-mediated biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. Evidence for HER1-HER4 heterodimers*. The Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**: p. 4813–4818.
107. Tang, C.K., et al., *Ribozyme-mediated down-regulation of ErbB-4 in estrogen receptor-positive breast cancer cells inhibits proliferation both in vitro and in vivo*. Cancer Research, 1999. **59**: p. 5315–5322.
108. Raina, D., et al., *Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells*. Oncogene, 2013.
109. Lakhani, S.R., et al., *WHO Classification of Tumours of the Breast, Volume 4*. 2012, Switzerland: WHO PRESS.
110. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. The New England Journal of Medicine, 2005. **353**: p. 1673-17684.

8. Anhang

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1 Altersverteilung der Patientinnen	- 12 -
Abbildung 2 ABC-Methode.	- 17 -
Abbildung 3 IRS abhängig von der Differenzierung bei Muc1 (membranständig) -	25 -
Abbildung 4 IRS abhängig von der Histologie bei Muc1 (membranständig)	- 26 -
Abbildung 5 IRS abhängig von der Herdverteilung bei Muc1 (membranständig) .-	27 -
Abbildung 6 membranständige Expression von Muc1	- 28 -
Abbildung 7 IRS abhängig von der Differenzierung bei Muc1 (zytoplasmatisch) .-	29 -
Abbildung 8 IRS abhängig von der Histologie bei Muc1 (zytoplasmatisch)	- 30 -
Abbildung 9 IRS abhängig von der Herdverteilung bei Muc1 (zytoplasmatisch) ..	- 31 -
Abbildung 10 zytoplasmatische Expression von Muc1	- 32 -
Abbildung 11 IRS abhängig von der Differenzierung bei TF1	- 33 -
Abbildung 12 IRS abhängig von der Histologie bei TF1	- 34 -
Abbildung 13 IRS abhängig von der Herdverteilung bei TF1	- 35 -
Abbildung 14 Expression von TF1	- 36 -
Abbildung 15 IRS abhängig von der Differenzierung bei TF2.....	- 37 -
Abbildung 16 IRS abhängig von der Histologie bei TF2	- 38 -
Abbildung 17 IRS abhängig von der Herdverteilung bei TF2.....	- 39 -
Abbildung 18 Expression von TF2.....	- 40 -
Abbildung 19 IRS abhängig von der Differenzierung bei Her4	- 41 -
Abbildung 20 IRS abhängig von der Histologie bei Her4.....	- 42 -
Abbildung 21 IRS abhängig von der Herdverteilung bei Her4	- 43 -
Abbildung 22 intrazelluläre Expression von Her4	- 44 -
Abbildung 23 membranständige Expression von Her4	- 44 -
Abbildung 24 IRS abhängig von der Differenzierung bei phospho-Her4	- 45 -
Abbildung 25 IRS abhängig von der Histologie bei phospho-Her4	- 46 -
Abbildung 26 IRS abhängig von der Herdverteilung bei phospho-Her4	- 47 -
Abbildung 27 intrazelluläre Expression von phospho-Her4	- 48 -
Abbildung 28 membranständige Expression von phospho-Her4	- 48 -
Abbildung 29 Kaplan Meier Analyse; Muc1 membranst. vs. zytoplasm.	- 56 -
Abbildung 30 Kaplan Meier Analyse; Muc1 membranständig vs. übrige Fälle	- 56 -
Abbildung 31 Muc1 zytoplasmatisch vs. übrige Fälle	- 57 -
Abbildung 32 Intrazelluläre Signalfunktion von Mucin1	- 60 -
Abbildung 33 Einflüsse des TF-Antigens bei der Metastasierung.....	- 61 -
Abbildung 34 Intrazelluläre Signalfunktion von Her4	- 64 -

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 Risikofaktoren	- 2 -
Tabelle 2 Altersverteilung	- 12 -
Tabelle 3 Verteilung der Differenzierung und Subtypen	- 13 -
Tabelle 4 Verwendete Materialien	- 14 -
Tabelle 5 Verwendete Reagenzien.....	- 15 -
Tabelle 6 Verwendete Antikörper	- 15 -
Tabelle 7 IRS abhängig von der Differenzierung bei Muc1 (membranständig).....	- 25 -
Tabelle 8 IRS abhängig von der Histologie bei Muc1 (membranständig)	- 26 -
Tabelle 9 IRS abhängig von der Herdverteilung bei Muc1 (membranständig).....	- 27 -
Tabelle 10 IRS abhängig von der Differenzierung bei Muc1 (zytoplasmatisch)....	- 29 -
Tabelle 11 IRS abhängig von der Histologie bei Muc1 (zytoplasmatisch)	- 30 -
Tabelle 12 IRS abhängig von der Herdverteilung bei Muc1 (zytoplasmatisch).....	- 31 -
Tabelle 13 IRS abhängig von der Differenzierung bei TF1	- 33 -
Tabelle 14 IRS abhängig von der Histologie bei TF1	- 34 -
Tabelle 15 IRS abhängig von der Herdverteilung bei TF1	- 35 -
Tabelle 16 IRS abhängig von der Differenzierung bei TF2	- 37 -
Tabelle 17 IRS abhängig von der Histologie bei TF2	- 38 -
Tabelle 18 IRS abhängig von der Herdverteilung bei TF2.....	- 39 -
Tabelle 19 IRS abhängig von der Differenzierung bei Her4.....	- 41 -
Tabelle 20 IRS abhängig von der Histologie bei Her4	- 42 -
Tabelle 21 IRS abhängig von der Herdverteilung bei Her4.....	- 43 -
Tabelle 22 IRS abhängig von der Differenzierung bei phospho-Her4.....	- 45 -
Tabelle 23 IRS abhängig von der Histologie bei phospho-Her4	- 46 -
Tabelle 24 IRS abhängig von der Herdverteilung bei phospho-Her4.....	- 47 -
Tabelle 25 Korrelation Gesamt	- 49 -
Tabelle 26 Korrelation G1	- 49 -
Tabelle 27 Korrelation G2.....	- 50 -
Tabelle 28 Korrelation G3.....	- 50 -
Tabelle 29 Korrelation duktal	- 51 -
Tabelle 30 Korrelation lobulär	- 51 -
Tabelle 31 Korrelation medullär.....	- 52 -
Tabelle 32 Korellation szirrhös	- 52 -
Tabelle 33 Korrelation duktal G1	- 53 -
Tabelle 34 Korrelation duktal G2	- 53 -
Tabelle 35 Korrelation duktal G3	- 54 -
Tabelle 36 Korrelation multifokal/multizentrisch.....	- 54 -
Tabelle 37 Ergebnisse des Cox Modells für die Überlebenszeit.....	- 55 -
	- 81 -

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne noch bei einigen Menschen bedanken, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle gilt der Dank meinem Doktorvater Professor Udo Jeschke, der mir nicht nur die Welt der Wissenschaft offenbart und diese Arbeit anvertraut hat, sondern auch immer wieder für interessante Plaudereien zu haben war.

Des Weiteren sei allen Mitarbeitern des Immunhistologischen Labors der Universitätsfrauenklinik Innenstadt für die fachliche Hilfe, lockere Atmosphäre und die tolle Betreuung zu danken. Hier bin ich vor allem Frau Christina Kuhn für die Einweisung in die Methodik und darüber hinaus für die netten Gespräche zu Dank verpflichtet.

Auch meiner Mama, meinem Papa, meinem Bruder Alexander und meiner Schwester Beatrice gilt sehr großer Dank, dafür dass sie mir sowohl das Studium in München ermöglicht haben und mich dazu ständig motiviert haben immer mein Bestes zu geben.

Meiner Partnerin Ayşe bin ebenfalls sehr dankbar dafür, dass sie mich stets angetrieben hat und den Verzicht schweigsam erduldet hat, wenn ich unzählige Stunden im Labor oder vor dem Laptop verbracht habe.

DANKE!