

**Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. T. Kirchner (seit 1.11.2005)

Vormals: Prof. Dr. med. U. Löhrs em.

**TGF- β und seine Korrelation mit Faktoren der
Zellzyklusregulation und Zellinvasion beim
invasiven Mammakarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claudia Müller-Aufdemkamp

aus

Detmold

2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Annette Lebeau

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Oliver Stötzer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2016

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1	Einleitung	7
1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	7
1.2	Ätiologie des Mammakarzinoms	7
1.3	Pathomorphologie	8
1.4	Prognosefaktoren	9
1.5	Klassische und etablierte Prognosefaktoren	10
1.5.1	pTNM-Klassifikation	10
1.5.2	Grading	10
1.5.3	Hormonrezeptoren	10
1.5.4	HER-2/neu (c-erbB-2)	11
1.6	TGF- β	12
1.6.1	TGF- β -Superfamilie	12
1.6.2	Struktur des TGF- β	12
1.6.3	Wirkungsweise bzw. physiologische Funktion und Regulation der TGF- β -Isoformen	14
1.6.4	Rolle von TGF- β in Tumorgenese und -progression	19
1.7	Regulatoren der Zellproliferation	20
1.7.1	Zellzyklusregulation	20
1.7.2	p53	21
1.7.3	p21	22
1.7.4	Cyclin D1	22
1.7.5	EGFR	23
1.8	Zelladhäsionsmoleküle	23
1.8.1	Integrin und E-Cadherin	23
1.8.2	Kollagen IV	25
1.9	Faktoren der Tumorprogression	25
1.9.1	Matrix-Metalloproteinasen	25
1.9.2	Proliferationsmarker Ki-67	28
1.10	Vaskularisation	29
1.11	Fragestellung	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Material	31

2.2	Methoden	34
2.2.1	Allgemeines Prinzip der Immunhistochemie	34
2.2.2	Durchführung	36
2.3	Auswertung der Immunhistochemie	38
2.4	Statistik	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Faktoren der Zellproliferation, -adhäsion, -invasion und Angiogenese	42
3.1.1	Korrelation mit Tumortyp, pTN-Status und Grading	42
3.1.2	Korrelationen der potenziell regulatorischen Proteine untereinander und mit der Zellproliferation	49
3.1.3	MMPs	52
3.1.4	Vaskularisation (CD31)	58
3.2	TGF- β s	59
3.2.1	Lokalisation und morphometrische Analyse der TGF- β s in humanen Mammakarzinomen	59
3.2.2	Zusammenhang von TGF- β -Proteinexpression, der Proliferationsaktivität (Ki-67) den regulatorischen Proteinen p53, p21 und Cyclin D1 und den Rezeptoren der HER-Familie	66
3.2.3	Zusammenhang von TGF- β -Proteinexpression und den Faktoren der Zelladhäsion E-Cadherin , β 1-Integrin und Kollagen IV	72
3.2.4	Zusammenhang von TGF- β -Proteinexpression und MMP-Proteinexpression	73
3.2.5	Zusammenhang von TGF- β -Proteinexpression und Angiogenese	76
4	Diskussion	77
4.1	Zellzyklusregulatoren	78
4.2	Invasionsfaktoren	82
4.3	TGF- β s	87
4.3.1	Lokalisation der TGF- β -Expression und Zusammenhang mit konventioniellen pathomorphologischen Faktoren	87
4.3.2	Zusammenhang mit der Zellproliferation und bekannten Regulatoren	88
4.3.3	Zusammenhang mit Invasionsfaktoren	90
4.4	Synoptische Diskussion	93
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	113

7.1	Tabellenverzeichnis	113
7.2	Abbildungsverzeichnis	115
8	Anhang	117
8.1	Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie	118
8.2	Puffer und Reagenz-Lösungen	121
8.3	Patientenkollektiv	123

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildungen
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Methode
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AFP	alpha-Fetoprotein
AKT	zelluläres Homolog des transformierenden viralen Onkogens v-AKT; identisch mit PKB (Wagner und Müller, 2010)
ALH	atypische lobuläre Hyperplasie
ALK	activin receptor-like kinase
APAAP	Alkalischen-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Methode
APC	Tumorsuppressorgen bei adenomatöser Polyposis
AS	Aminosäure
ATM-Gen	Ataxia teleangiectatica
BFGF/bFGF	basic-fibroblast growth factor
BM	Basalmembran
BMP	<u>b</u> one <u>m</u> orphogenetic proteins (morphogenetische Knochenproteine)
BRCA	BReast CAncer gene
CAP	College of American Pathologists
Cdc25A	cell division cycle 2-activating phosphatase
CDK	cyclin-dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor (Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DGP	diffuse growth pattern
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ECM	extracellular Matrix (extrazelluläre Matrix)
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EIC	extensive intraductal component
EMT	epithelial-mesenchyme Transdifferenzierung
ER	Östrogenrezeptor

ErbB/ERBB	Das EGF(ERBB)-Gen wurde ursprünglich als Onkogen eines akut transformierenden retrovirus, des Erythroblastose-Virus, identifiziert. Das Gen kodiert für den Rezeptor des EGF. Das Onkogen HER-2/neu (ERBB2) ist Mitglied der EGFR-Genfamilie (Wagner und Müller, 2010)
ERE	estrogen response elements
FAK	fokal adhesion kinase
FasL	apoptosevermittelnder Ligand/Rezeptor
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
G1-G3	Grading
GDF	growth differentiation factor
HER1	human epidermal growth factor receptor 1
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HPF	high power field (Gesichtsfeldgröße)
HPV	humanes Papilloma-Virus
HRT	Hormonersatztherapie
IDC mit DGP	invasiv duktaler Typ mit diffusem Wachstumsmuster
IDC mit EIC	invasiv duktaler Typ mit extensiver intraduktaler Komponente
IDC mit LIC	invasiv duktaler Typ mit geringer oder keiner intraduktalen Komponente
ILC	invasiv lobulärer Typ
INF- γ	Interferon- γ
JAK	Tyrosinkinase
LAP	latency associate peptide
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LIC	low or no intraductal component
LN	lobuläre Neoplasie
LTBP	latent TGF- β binding proteins
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
MAPK	<u>micro</u> tubule- <u>ass</u> ociated <u>pro</u> tein <u>kin</u> ase
MDM2	murine double minute chromosome-2
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MT-MMPs	membran-tipe MMPs
NISH	nicht-radioaktive-in-situ-Hybridisierung
NO	Stickoxid/Stickstoff
NOS	not otherwise specified

PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PDGF	platelet-derived growth factor
PgR	Progesteronrezeptor
R	Rezeptor
RAf	Bestandteil von Signalwegen in Tumorzellen
ras	rat sarcoma
rb/RB	Retinoblastom
RR	relatives Risiko
SD	Standardabweichung
SERM	selektive ER-Modulatoren
SGF	sarcoma growth factor
SMAD	<u>s</u> imilar <u>m</u> others <u>a</u> gainst <u>d</u> ecapentaplegic
STAT	<u>s</u> ignal <u>t</u> ransducers and <u>a</u> ctivators of <u>t</u> ranscription
TGF- β	transforming growth factors (transformierende Wachstumsfaktoren) Sammelbezeichnung für TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3
TIE	TGF- β -Inhibitorelemente
TIMP	<u>t</u> issue <u>i</u> nhibitors of <u>m</u> etalloproteinase (Gewebsinhibitoren von Metalloproteinasen)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNM-Status	Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung
TP53	p53-kodierendes Gen, wird im Menschen TP53 genannt
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
WHI	Women`s Health Initiative
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau in den westlichen Industrieländern und der Welt. Dabei bestehen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Kontinenten bezüglich der Inzidenz und auch der Mortalität. In Deutschland liegt die Anzahl der Neuerkrankungen bei 74 pro 100.000 Frauen pro Jahr. Derzeit entwickelt ca. jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom. Mit zunehmendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, aber zunehmend sind auch jüngere Frauen betroffen. Für das Stadtgebiet München wurde in einer Feldstudie von 1996 bis 1998 ein Altersdurchschnitt von 61,4 Jahren ermittelt, dabei erkrankten 27,8% mit über 70 Jahren, 52% im Alter zwischen 50 und 69 Jahren und 20,2% im Alter unter 50 Jahren an einem Mammakarzinom. Die Mortalität liegt bei 24 Fällen pro 100.000 Frauen pro Jahr in Deutschland. Ein Anstieg der altersspezifischen Mortalität ist vor allem bei Frauen in der Postmenopause, und hier vor allem in der Altersgruppe der über 70-jährigen Frauen zu verzeichnen (Engel et al., 2003).

1.2 Ätiologie des Mammakarzinoms

Die Entstehung eines Mammakarzinoms ist in vielen Punkten noch ungeklärt, doch weiß man von einigen Faktoren, die mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergehen können. Dabei scheinen endogene Faktoren ebenso eine Rolle zu spielen wie exogene Einflüsse. Zu den etablierten Risikofaktoren für ein Mammakarzinom zählen (Sittek et al., 2003):

1. familiäre Belastung (Verwandtschaft ersten Grades; relatives Risiko [RR]: 1,4-13,6)
2. BRCA2/BRCA1 (breast cancer gene)-Mutationen; (RR: 7)
3. Alter (≥ 50 Jahre vs. < 50 Jahre; RR: 6,5)
4. Frauen mit einem behandelten Mammakarzinom; (RR: 5)
5. atypische duktale/lobuläre Hyperplasien; (RR: 4,0-4,4)
6. Nullipara, späte oder sehr frühe Erstgeburt (> 30 J. vs. < 20 J.; RR: 1,3-2,2)
7. Alter bei Menopause (≥ 55 J. vs. < 55 J.; RR: 1,5-2,0)
8. familiäre Belastung (Verwandtschaft zweiten Grades; RR: 1,5-1,8)
9. Alter bei Menarche (< 12 J. vs. ≥ 14 J.; RR: 1,2-1,5)
10. Hormonersatztherapie; (RR: 1,0-1,5)

Bei 5 bis maximal 10% aller Patienten mit einem Mammakarzinom liegt eine hereditäre Krebserkrankung vor. Hierbei sind, neben dem p53-Gen und dem ATM-Gen (Ataxia teleangiectatica), vor allem das BRCA1- und das BRCA2-Gen von Bedeutung. BRCA1 und

BRCA2 gehören in die Gruppe der Tumorsuppressorgene. Eine Mutation in einem oder beiden Genen führt zu einem erhöhten Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Das BRCA1-Gen ist auf Chromosom 17q, das BRCA2-Gen auf Chromosom 13q lokalisiert. Mutationen am BRCA1- und BRCA2-Gen werden in bis zu 60% aller Fälle der hereditären Mammakarzinome gefunden. Zusätzlich führen Veränderungen dieser Gene auch zu einem erhöhten Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Die Mehrzahl aller Mammakarzinome (mindestens 90%) wird jedoch nicht familiär vererbt, sondern tritt sporadisch auf (Stauber et al., 2001; Kiechle et al., 2003). Bei diesem Karzinom stellt die Anzahl der erlebten Hormonzyklen einen wichtigen Risikofaktor dar. So besteht ein erhöhtes Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken bei Frauen mit einer frühen Menarche und einer späten Menopause bei gleichzeitiger andauernder Östrogenstimulation.

Außerdem wird der Einsatz der Hormonersatztherapie (HRT) als Risikofaktor für das Mammakarzinom diskutiert. In mehreren Studien zeigte sich eine geringfügige Inzidenzzunahme nach einer mindestens fünfjährigen Hormonsubstitution. Daraus ergibt sich ein erhöhtes relatives Risiko für ein Mammakarzinom um den Faktor 1,35. Das Risiko scheint sich mit Länge der Einnahmedauer und ansteigender Dosis zu erhöhen und sinkt nach Absetzen der Hormonsubstitution wieder ab (Untch et al., 2003). Auch die Arbeit der „Women's Health Initiative“ (WHI) von 2002 bestätigte eine Erhöhung der Mammakarzinom-Inzidenz durch HRT (Writing Group for the Women's Health Investigators, 2002). Die Einnahme oraler Kontrazeptiva führt nicht zu einer Erhöhung des Mammakarzinomrisikos (Sittek et al., 2003).

Möglicherweise spielen neben genetischen Faktoren auch unterschiedliche Lebensgewohnheiten (z. B. Fettgehalt der Nahrung) und verschiedene Umwelteinflüsse für die geographische Verteilung des Mammakarzinoms eine Rolle. So liegt zum Beispiel die Inzidenzrate bei Japanerinnen im Vergleich zu Europäerinnen bei 1:6. Jedoch gleicht sich die Inzidenzrate bei den in den USA lebenden Japanerinnen in der 2. Generation an, sodass ein genetischer Code ausgeschlossen werden kann (Stauber et al., 2001; Kaufmann et al., 2006)

1.3 Pathomorphologie

Die histologische Klassifikation der Mammakarzinome folgt der aktuellen WHO-Klassifikation von 2003 (Tavassoli et al., 2003). Der invasive duktales Typ (NOS: not otherwise specified) ist mit 65-80% das häufigste invasive Karzinom der Brustdrüse. Danach folgt der invasive lobuläre Typ mit 6-15%. Die weiteren Karzinomtypen sind durch spezielle morphologische Merkmale gekennzeichnet und treten deutlich seltener auf. Dabei sind der tubuläre, der papilläre und der muzinöse Typ mit einer günstigeren Prognose verknüpft. Als

Präkanzerose im engeren Sinne ist das nicht-invasive duktales Carcinoma in situ (DCIS) aufzufassen, das in ca. 30-50% der Fälle nach zehn Jahren unbehandelt in ein invasives Karzinom übergeht. Als Indikator für ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko gilt die lobuläre Neoplasie (LN). Unter diesem Begriff werden E-Cadherin-negative intraduktale und intralobuläre Epithelproliferationen im Sinne eines lobulären Carcinoma in situ (LCIS) und einer atypischen lobulären Hyperplasie (ALH) zusammengefasst.

1.4 Prognosefaktoren

Mammakarzinome stellen kein einheitliches Krankheitsbild dar, vielmehr unterscheiden sie sich hinsichtlich ihres Phänotyps, des Verlaufs und des Ansprechens auf eine Therapie (Böcker et al., 1997). Da eine Tumorzell dissemination als Voraussetzung der Metastasierung bereits frühzeitig stattfindet, wird das Mammakarzinom heutzutage nicht als lokale, sondern als systemische Erkrankung aufgefasst (Fischer, 1979). Um den Verlauf der Erkrankung abschätzen zu können, werden verschiedene Faktoren herangezogen (Untch et al., 2003). Zu den Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz zählen die TNM-Klassifikation (Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung), der histologische Tumortyp, das histologische Grading, die peritumorale Gefäßinvasion, die Steroidhormonrezeptorexpression (Östrogen- und Progesteronrezeptor) sowie der HER-2/neu-Status. Potenzielle neue Prognosefaktoren sind molekularbiologische Marker, welche das tumorbiologische Verhalten näher charakterisieren und damit möglicherweise prognostisch und therapeutisch relevant sein könnten. Bevor ein neuer Prognosefaktor zur Therapieentscheidung und zur Vorhersage über den Krankheitsverlauf in der klinischen Praxis eingesetzt wird, muss er allerdings bestimmte Anforderungen und Kriterien erfüllen (z. B. statistische Relevanz in prospektiv randomisierten Studien etc.). Bislang sind nur zwei tumorassoziierte Proteolysefaktoren, der Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und sein Inhibitor PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) ausreichend validiert.

Es sind Faktoren, die am Umbau der extrazellulären Matrix, d.h. dem perizellulären Stroma, beteiligt sind. Man geht davon aus, dass sie zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit der Tumorzellen beitragen. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Konzentrationen von uPA und PAI-1 in Primärtumoren einen Einfluss auf das Gesamtüberleben und den Erfolg einer Chemotherapie haben (Harbeck et al., 2003). Zu den potenziellen neuen Prognosefaktoren werden verschiedene Invasions-, Wachstums- und Proliferationsfaktoren, einschließlich p53, p21, Cyclin D1, Ki-67, EGFR und TGF- β sowie MMPs gezählt. Sie gelten derzeit allerdings noch nicht als ausreichend erforscht und gesichert, um in der täglichen Praxis eingesetzt zu werden (Rakha et al., 2010; Harbeck et al., 2003).

1.5 Klassische und etablierte Prognosefaktoren

1.5.1 pTNM-Klassifikation

Die pTNM-Klassifikation von Karzinomen erfolgt postoperativ anhand der pathomorphologischen Befunde an den Operationspräparaten. Mit der pTNM-Klassifikation wird der Status des Primärtumors (pT), der Lymphknoten (pN) und der Fernmetastasen (pM) beurteilt (Harbeck et al., 2003; Lebeau, Nathrath und Permanetter, 2003).

Bis heute ist der axilläre Lymphknotenstatus beim Mammakarzinom der stärkste Prognosefaktor für das Rezidivrisiko und das Überleben. Hierbei korreliert die Anzahl der befallenen Lymphknoten direkt mit dem Risiko eines Rezidivs und des Todes. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Größe des Primärtumors und dem axillären Lymphknotenbefall. Für nodal-negative Karzinome ist die Tumorgöße ein wichtiger prognostischer Indikator, während bei den nodal-positiven Patientinnen in der multivariaten Analyse die Tumorgöße vom Lymphknotenbefall „überdeckt“ wird (Harbeck et al., 2003).

1.5.2 Grading

Das Staging wird noch durch die Bestimmung des histologischen Differenzierungsgrades (Grading) ergänzt. Es erfolgt zur Beurteilung des Malignitätsgrades invasiver Mammakarzinome aller histologischer Typen nach einer Modifikation von Bloom und Richardson entsprechend Elston und Ellis (Tavassoli et al., 2003).

Dabei werden Tubulusbildung, Kernpleomorphie und die Mitoserate beurteilt. Die Mammakarzinome werden in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht differenzierte Tumoren (G3) unterteilt. Das Grading korreliert mit dem Lymphknotenstatus, dem Rezeptorstatus, mit der Rezidivhäufigkeit und der Mortalität (Untch et al., 2003; Lebeau, Nathrath und Permanetter, 2003).

1.5.3 Hormonrezeptoren

Der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus) ist heute ein elementares Kriterium für die Planung einer adjuvanten Therapie. Bei Vorliegen eines invasiven Mammakarzinoms ist deshalb die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus obligat. Der Rezeptorstatus korreliert mit dem Grading. So sind 80-90% der G1-Karzinome Rezeptorpositiv, G2-Karzinome hingegen sind zu 17-25% und G3-Karzinome zu 30-50% Rezeptornegativ. Wenn die histologischen Typen betrachtet werden, so sind lobuläre Karzinome zu 80-90% und invasiv duktales Karzinome (IDC) zu 55-65% Östrogenrezeptor-positiv (Lebeau,

Nathrath und Permanetter, 2003; Bässler, 1997). Den Rezeptoren wird eine unterschiedliche prognostische Bedeutung zugeschrieben. Der Östrogenrezeptor (ER) gilt als prognostischer Faktor bei den nodal-negativen Karzinomen. Der Progesteronrezeptor (PgR) hingegen ist ein wichtiger prognostischer Faktor für ein rezidivfreies Überleben bei nodal-positiven Fällen (Kaufmann et al., 2006; Bässler, 1997).

1.5.4 HER-2/neu (c-erbB-2)

Das HER-2/neu-Onkogen ist auf Chromosom 17q12-21.32 lokalisiert. Es kodiert ein 185 kDa transmembranes Protein (p185) mit 50% Homologie zum EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor). Die Bezeichnung HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) weist auf die strukturelle Ähnlichkeit zum humanen EGFR oder HER-1 (c-erbB-1) hin. In diese Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören zwei weitere Rezeptoren: HER-3 und HER-4. Durch die Verwandtschaft mit dem v-erbB-Onkogen bekam das Gen eine zusätzliche Bezeichnung: c-erbB-2. Der Zusatz *neu* weist auf die Homologie mit dem Rattengen *neu* hin, welches von Weinberg 1981 in einer Ratten-Neuroblastomzelllinie entdeckt wurde, (Wedad et al., 1999; Ross et al., 1999). Das HER-2/neu-Protein setzt sich aus einer Oberflächen-, Transmembran- und Zytoplasma-Komponente zusammen und ist, ebenso wie der EGF-Rezeptor, an der Zelldifferenzierung, Zelladhäsion und Zellmotilität beteiligt (Bässler, 1997). Es wurde 1985 erstmals in menschlichen Brustdrüsenzellen beschrieben. Durch eine Amplifikation des HER-2/neu-Gens kommt es zu einer Aktivierung des Onkogens mit Überexpression des Proteins und gesteigerter Proliferation der Zelle (Slamon et al., 1989; Tanner et al., 1992).

Insgesamt weisen ca. 15%-20% der invasiven Mammakarzinome eine Überexpression des HER-2/neu-Onkoproteins auf. Eine HER-2/neu-Proteinüberexpression ohne eine nachweisbare Genamplifikation wird in 3-10% der Mammakarzinom-Fälle beobachtet. Umgekehrt liegt eine isolierte Amplifikation ohne fassbare Proteinüberexpression in 6-9% der Tumoren vor (Lebeau et al., 2003; Slamon et al., 1989). Seit der Entdeckung des HER-2/neu-Gens haben mehrere Arbeitsgruppen den Zusammenhang zwischen der HER-2/neu-Amplifikation bzw. -Überexpression und dem Gesamtüberleben beim Mammakarzinom untersucht. Die Gesamtüberlebensrate ist bei einer Überexpression des HER-2/neu-Proteins schlechter, die Tumoren zeigen ein aggressiveres Wachstum und eine höhere Rezidivneigung (Harbeck et al. 2003). Ein signifikanter Zusammenhang besteht auch zum Lymphknotenstatus und dem p53-Onkoprotein (Wedad et al., 1999). Daten zu dem Zusammenhang zwischen HER-2/neu und TGF- β lagen zu Beginn der eigenen Arbeit in der verfügbaren Literatur nicht vor.

1.6 TGF- β

1.6.1 TGF- β -Superfamilie

Sezernierte Proteine spielen eine Schlüsselrolle in Wachstums- und Entwicklungsprozessen, bei der Regeneration von Organen sowie in ihrer Homöostase, denn sie erlauben den Zellen miteinander zu kommunizieren. Die Superfamilie der TGF- β -Wachstumsfaktoren umfasst eine große Gruppe sezernerter Proteine, die sich aufgrund ihrer strukturellen und biologischen Ähnlichkeiten in mehrere Unterfamilien gliedern lassen: GDFs (growth differentiation factors), BMPs (bone morphogenetic proteins), die TGF- β s (transforming growth factors β), die Aktivine und Inhibine sowie eine Reihe weiterer Faktoren.

Die TGF- β -Superfamilie besteht aus 30 Mitgliedern, zu denen auch vier Aktivine und Inhibine sowie über 20 BMPs gehören. Während die TGF- β -Isoformen β 1, β 2 und β 3, Aktivin und Inhibin ausschließlich in Säugetierzellen vorkommen, sind die Isoformen TGF- β 4 und TGF- β 5 sowie die BMPs auch in der Drosophila-Fliege, im Xenopus und in Geflügeltieren nachgewiesen worden (Lawrence, 1996; Dennler et al., 2002). In dieser Arbeit werden die TGF- β -Isoformen β 1 bis β 3, die ausschließlich in Säugetierzellen vorkommen, hinsichtlich ihrer Rolle im menschlichen Mammakarzinom, untersucht. Sie wurden unabhängig voneinander von Harold Moses und Michael Sporn entdeckt (Lawrence, 1996). Ausschlaggebend für ihre Entdeckung war eine Arbeit aus dem Jahre 1970, die sich mit Säugetier- und Vogel-Retroviren beschäftigte. Retroviren haben die Fähigkeit, Sarkome in Säugetierzellen zu bilden. Aus diesen Säugetierzellkulturen wurde eine Substanz, der SGF (sarcoma growth factor) extrahiert, welcher eine Kombination aus zwei verschiedenen Molekülen ist, dem TGF-alpha und TGF-beta. TGF-alpha gehört zur Familie der EGF-Wachstumsfaktoren. Mittlerweile sind TGF- β 1, - β 2 und - β 3 aus zahlreichen Geweben und Zellen, u.a. aus Placenta und Thrombozyten, isoliert worden (Lawrence, 1996; Taipale et al., 1998).

1.6.2 Struktur des TGF- β

a) TGF- β -Isoformen

Von den insgesamt fünf Isoformen der TGF- β kommen nur drei bei Säugetieren vor: TGF- β 1, - β 2, und - β 3. Alle drei Isoformen sind in ihrer biologisch aktiven Form 25kD Homodimere und bestehen aus zwei Ketten mit jeweils 112 Aminosäuren (AS) mit neun Cysteinresten. Diese haben untereinander ein hohes Maß an Identität in der Abfolge der Aminosäuresequenz, d.h. in der Sequenzkonservierung: β 1/ β 2 zu 74%, β 2/ β 3 zu 82% und β 1/ β 3 zu 78%. Die 25kD-Formen von TGF- β 1, - β 2 und - β 3 stellen das C-terminale Ende großer Vorläufermoleküle dar (β 1: 390 AS pro Monomer, β 2 und β 3: 412 AS pro Monomer) (Lawrence, 1996).

b) TGF- β -Gene

Die Gene der verschiedenen TGF- β -Isoformen liegen auf unterschiedlichen Chromosomen: TGF- β 1 auf Chromosom 19q13, TGF- β 2 auf Chromosom 1q41 und TGF- β 3 auf Chromosom 14q24. Alle diese Gene enthalten sieben Exons und sechs Introns.

Unterschiede bestehen in der Promotorregion. Die Promotorregion des TGF- β 1 enthält eine sogenannte TATA-Box, das sind Adenin- und Thymin-reiche Genabschnitte. Die Promotorregionen von TGF- β 2 und - β 3 können das c-AMP bindende Protein CAP (catabolite activator protein), ein sogenanntes Kontrollprotein, binden, das die Transkription fördert. Außerdem enthält der TGF- β 1-Promotor ein Aktivatorprotein das Aminopeptidyl-1 (Lawrence, 1996; Taipale et al., 1998; Hirsch-Kaufmann und Schweiger, 1992).

c) Large-latent-TGF- β -Komplex

Die drei TGF- β -Isoformen werden von den meisten Zelltypen in biologisch inaktiver Form, als Large-latent-TGF- β -Komplex sezerniert, wie in Abbildung 1.1 dargestellt. Der Large-latent-TGF- β -Komplex setzt sich aus zwei TGF- β -Homodimeren (25kD), zwei Propeptiden, den TGF- β 1-LAPs (TGF- β 1 latency associate peptide, 100kD) und einem weiteren Genprodukt, dem LTBP (Latent-TGF- β -Bindungsprotein, 235kD) zusammen. Die Komplexe werden jeweils durch Schwefelbrücken zusammengehalten. Die Halbwertszeit von latentem TGF- β 1 beträgt 90 Minuten. Aktiviertes latentes TGF- β 1 wird in 2-3 Minuten von der Leber eliminiert. Es sind insgesamt vier LTBP-Gene isoliert worden. Sie unterscheiden sich durch die Anordnung und Anzahl von Aminosäuresequenzen (Taipale et al., 1998). Das LTBP hat zwei Hauptfunktionen: Zum einen erleichtert es die Sekretion von Latent-TGF- β 1 und zum anderen spielt es möglicherweise eine Rolle bei der Ausrichtung des Wachstumsfaktors im Hinblick auf die extrazelluläre Matrix (ECM). Zusätzlich wird LTBP eine Rolle als Strukturprotein in der Knochenbildung zugeschrieben. Der Large-latent-TGF- β -Komplex wird durch Thrombozyten sezerniert. Daneben gibt es auch einen Small-latent-TGF- β -Komplex, der kein LTBP enthält und nur von zahlreichen Kulturzellen sezerniert wird.

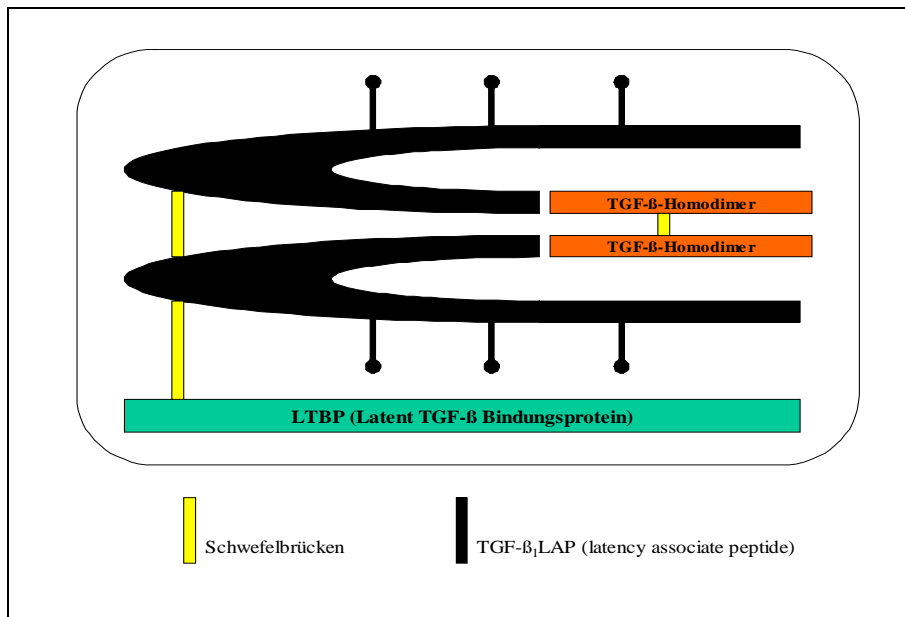


Abb.1.1: Large-latent-TGF-β-Komplex (Abbildung in Anlehnung an Lawrence, 1996)

Eine Aktivierung des Latent-TGF-β ist durch verschiedene Mechanismen möglich. Beispielsweise können niedrige pH-Werte (pH 3,0), hohe Temperaturen bis 100°C oder radioaktive Strahlung die latente Form der drei TGF-β aktivieren (Lawrence, 1996; Koli und Keski-Oja, 1996). Aber auch Proteasen wie Plasmin und Cathepsin D, Elastase oder saure Glykosidasen, Kallikrein, MMP-9, Thrombospondin-1 und die Behandlung mit Urea bewirken eine Aktivierung (Lawrence, 1996; Taipale et al., 1998; Bierie und Moses, 2009). Davon ist die proteolytische Spaltung des LAP *in vivo* der wichtigste Mechanismus, um TGF-β zu aktivieren. Nach heutigem Kenntnisstand erfolgt die extrazelluläre Aktivierung von TGF-β schrittweise. Danach wird TGF-β₁ durch Serin-Proteinasen aus der ECM freigesetzt. Anschließend verbindet sich der freigesetzte Large-latent-TGF-β-Komplex mit der Zelloberfläche, β₁-LAP wird abgespalten und TGF-β aktiviert. Das aktivierte TGF-β bindet an Betaglycan, einen Bestandteil des TGF-β-Rezeptors und die Signaltransduktion im Zellinneren kann stattfinden (Taipale et al., 1998; Hirsch-Kaufmann und Schweiger, 1992).

1.6.3 Wirkungsweise bzw. physiologische Funktion und Regulation der TGF-β-

Isoformen

Drei Hauptwirkungen des TGF-β auf den Organismus sind bekannt (Lawrence, 1996; Taipale et al., 1998; Tan et al., 2009):

- Wachstumsinhibition von Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen.
- Stimulation der Bildung von Bestandteilen der ECM in mesenchymalen Zellen (Kollagen, Fibronectin, Tenascin, Glycosaminoglycane und Proteoglycane). Parallel können Mesenchymzellen, in Abhängigkeit von der Konzentration auch mit einer

Wachstumssteigerung reagieren.

- Immunsuppression (Inhibition von B- und T-Lymphozyten)

Zusammenfassend spielen die TGF- β s eine wichtige Rolle in der Homöostase von vielen verschiedenen Gewebearten. Ist dieses Gleichgewicht gestört bzw. ist die Kontrolle über diese zellulären Funktionen verloren gegangen, ist die Grundlage für Tumorwachstum und Entartung gelegt (siehe Abb. 1.2).

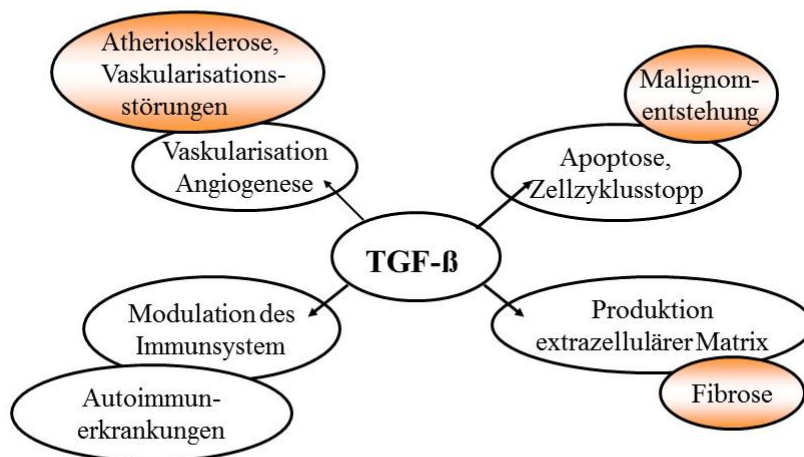


Abb. 1.2: TGF- β als multifunktionaler Regulator

Die Funktionen der TGF- β -Isoformen werden über TGF- β -Bindungsproteine und -Rezeptoren vermittelt, welche von normalen Zellen und Tumorzellen exprimiert werden.

a) TGF- β -Bindungsproteine

Normale Zellen und Tumorzellen können zehn bis viertausend Bindungsstellen mit unterschiedlich hoher Affinität zu den drei TGF- β s exprimieren. Diese Bindungsstellen präsentieren verschiedene Proteine, die für die Affinität der Bindungsproteine und wiederum für verschiedene Signalwege verantwortlich sind (Taipale et al., 1998). Das Betaglycan, das vorwiegend den Rezeptor-Typ III ausbildet, bindet alle drei TGF- β -Isoformen mit einer mittleren Affinität. Es induziert eine hohe Bindungsaffinität von TGF- β 2 zu dem TGF- β -Rezeptor II (siehe auch Absatz b: TGF- β -Rezeptoren).

Die ECM-Proteine Fibronectin, Thrombospondin und Kollagen IV binden TGF- β 1 mit hoher Affinität. Die Core-Proteine der ECM-Proteoglycane Decorin und Biglycan und Alpha-Fetoprotein (AFP) binden alle drei TGF- β s und können deren Aktivität neutralisieren

(Lawrence, 1996; Taipale et al., 1998). Extrazelluläre Proteine, welche außerdem die TGF- β -Isoformen binden können, sind das von Endothelzellen und myeloischen Zellen produzierte Endoglin, das TGF- β 1 sowie - β 3 mit hoher und TGF- β 2 mit niedrigerer Affinität bindet. Der Plasma-Proteaseinhibitor alpha₂-Makroglobulin hat eine zehnmal höhere Bindungsaffinität zu TGF- β 2 als zu TGF- β 1 (Lawrence, 1996; Koli und Keski-Oja, 1996; Taipale et al., 1998). Im menschlichen Serum interagiert TGF- β mit alpha-Makroglobulin in latenter, inaktiver Form. Eine Bindung von Heparin an TGF- β 1 kann die Interaktion mit alpha₂-Makroglobulin inhibieren und z. B. eine Thrombopenie auslösen.

b) TGF- β -Rezeptoren

Heutzutage sind drei verschiedene TGF- β Rezeptoren bekannt: Typ I bis Typ III. Typ I- und Typ II-Rezeptoren sind transmembrane Rezeptoren, welche einen extrazellulären Anteil, reich an Cystein, einen transmembranen Anteil und einen intrazellulären Anteil mit Serin/Threoninkinase-Funktion besitzen. Der Typ-II-Rezeptor ist eine konstitutiv aktive Kinase, der Seronin/Threonin-Reste autophosphoryliert und hierdurch den Typ-I-Rezeptor über eine Ligandenbindung transphosphoryliert und damit aktiviert. Der Typ-I-Rezeptor kann in der Folge weitere intrazelluläre Proteine, wie zum Beispiel die SMAD-Proteine (similar mothers against decapentaplegic), phosphorylieren und die Signalkaskade fortsetzen. Der Typ-III-Rezeptor ist ein transmembranes Protein, auch Betaglycan genannt, das keine bekannte enzymatische Aktivität aufweist und nicht direkt an der Signaltransduktion beteiligt ist. Er assistiert bei der Ligandenpräsentation für den TGF- β -Rezeptor II. Mittlerweile sind verschiedene Typ-I-Rezeptoren, sogenannte ALK (activin receptor-like kinase) bekannt, die einen Einfluss auf die TGF- β -Antwort haben. Außerdem wurden verschiedene Typ-II-Rezeptoren identifiziert (ActR-II oder ActR-IIB), die eine Ligandenspezifität in bestimmten Zelltypen aufweisen. In den meisten Zelltypen bindet das TGF- β zuerst an den Typ-II-Rezeptor und anschließend an den Typ-I-Rezeptor (ALK-5). Das TGF- β 1 und das TGF- β 3 haben eine hohe Affinität für den Typ-II-Rezeptor. TGF- β 2 bindet deutlich weniger effizient an den Typ-II-Rezeptor und benötigt hierzu die Vermittlung des Typ-III-Rezeptors (Lawrence, 1996, Dennler et al., 2002; Bierie und Moses, 2009). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ligandenspezifität vom Typ-II-Rezeptor bestimmt wird, während die Signalweiterleitung vom Typ-I-Rezeptor abhängig ist (Wagener und Müller, 2010).

c) Intrazelluläre TGF- β -Signalwege

Die TGF- β -Isoformen haben unterschiedliche Effekte auf die Proliferation von Zellen. Zum einen können sie das Wachstum stimulieren, beispielsweise von Fibroblasten. Zum anderen agiert TGF- β als potenter Wachstumsinhibitor vieler Zellen. Als Beispiele seien Epithelzellen und die hämatopoetischen Zellen genannt (Koli und Keski-Oja, 1996; Moustakas et al., 2002; Dennler et al., 2002). Um diese unterschiedlichen Effekte zu erzielen, greifen die TGF- β -Isoformen über verschiedene Signalkaskaden aktiv in den Zellzyklus ein und können auch Apoptose induzieren. In Abbildung 1.3 wird dies im Überblick dargestellt.

Außerdem wirkt TGF- β auf die Transkription einer Reihe weiterer Proteine ein, die in die Transkriptions- und Proliferationsregulatoren eingebunden sind (siehe Tabelle 1.1).

In der vorgestellten Arbeit wurde unter anderem beispielhaft die Expression von einzelnen ausgewählten TGF- β -abhängigen Proteinen untersucht. Dabei sind die beteiligten Signalwege, welche die Expression dieser Proteine steuern, in ihrer Komplexität allerdings nur unvollständig bekannt. Welche Signalkaskade durch TGF- β aktiviert wird und auf welchem Wege, ist vom Zelltyp und dessen Differenzierungszustand, der Zellzyklusphase sowie der Anwesenheit weiterer extra- und intrazellulärer Wachstumsregulatoren abhängig. Bekannt ist, dass Signale vom TGF- β -Rezeptor über sogenannte SMAD-Proteine weitergegeben werden. SMAD-Proteine sind homolog zum *Drosophila*-Protein Mad. Neun SMAD-Proteine konnten bisher beim Menschen identifiziert werden. Die meisten davon sind spezifisch für bestimmte TGF- β -Rezeptoren. Nach Aktivierung des TGF- β -Typ-I-Rezeptors werden die SMAD-Proteine 2 und 3 phosphoryliert, die dann mit SMAD4 einen oligomeren Komplex bilden und zusammen in den Zellkern wandern, um dort die Transkription zu beeinflussen. SMAD6 und SMAD7 verhindern die Interaktion von SMAD2 und SMAD3 mit SMAD4. Die Expression von SMAD6 und SMAD7 wird durch TGF- β -Rezeptoren aktiviert, sodass eine negative Rückkopplungsschleife entsteht (Wagener und Müller, 2010).

TGF-β Zielgene	TGF-β-Regulation
TGF-β-Signalwegkomponenten	
-TGF- β 1	Induktion
-T β RI, T β RII	Induktion/Repression
-SMAD3	Repression
-SMAD6	Induktion
-SMAD7	Induktion
Transkriptionsregulatoren	
-c-Jun	Induktion
-Jun-B	Induktion
-c-Myc	Repression
-B-Myc	Repression
-c-Fos	Induktion
-Fos-B	Induktion
Zellzyklusregulatoren	
-p15	Induktion
-p21	Induktion
-Cdc25A	Repression
-Cyclin D1	Induktion/ Repression
-Cyclin A	Repression

Tabelle 1.1 Überblick der TGF- β -Zielgene zur Regulation der Zellproliferation (aus: de Castecker et al., 2000)

An Zellkulturen und Mausmodellen wurde experimentell nachgewiesen, dass TGF- β den Zellzyklus in der mittleren bis späten G1-Phase stoppen kann, indem es verhindert, dass das Retinoblastoma-Protein (Rb) durch verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen (CDK4 oder CDK6) phosphoryliert und der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird (Reddy und Howe, 1993; Hannon und Beach, 1994; Sandhu et al., 1997; Robson et al., 1999). Dies geschieht über eine Induktion der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKI) p15, p16, p21 und p27. Außerdem wird die cdk2-Aktivität reduziert (Lawrence, 1996; Dennler et al., 2002; Moustakas et al., 2002; Hanahan und Weinberg, 2000; Ravitz und Wenner, 1997).

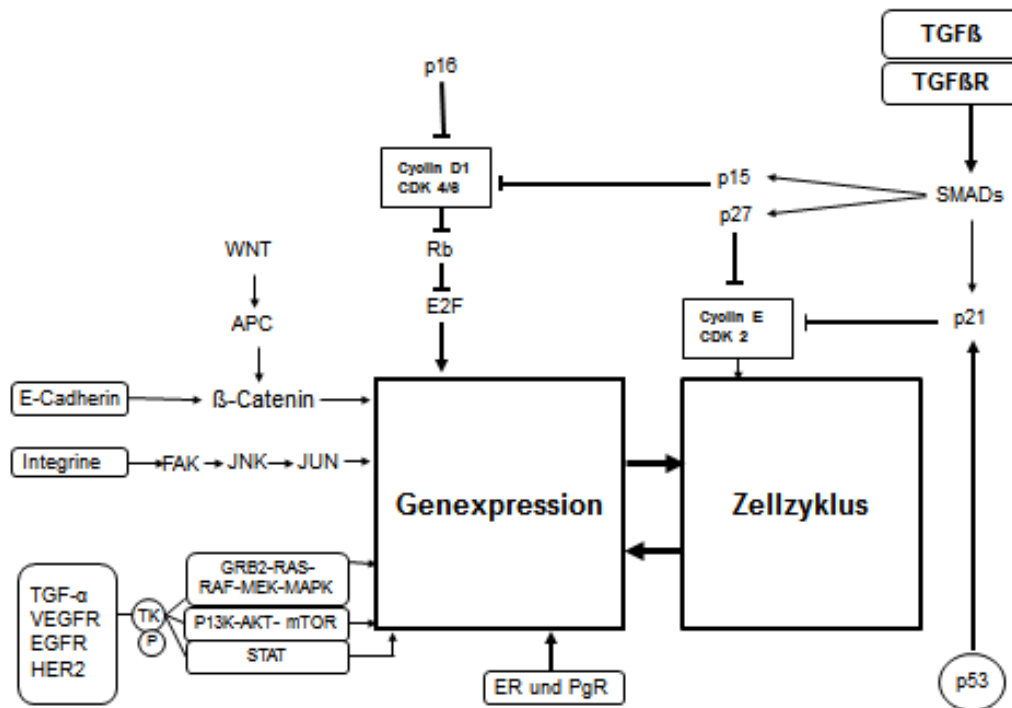


Abb. 1.3: Effekte des TGF-β auf Faktoren des Zellzyklus

Vereinfachte Darstellung verschiedener Signalwege in Zellen. Die Pfeile symbolisieren Interaktionen und generelle Wirkungen der Proteine. Der TGF-β-/SMAD-Signalweg reguliert Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Zellmigration. Welche dieser Wirkungen überwiegt, hängt vom Zellzyklusstadium und vom Zelltyp ab. Proteine die den Signalweg aktivieren, gelten als Tumorsuppressorproteine (z.B. p53, Rb, SMAD-Proteine, TGF-β-Rezeptor, p16). Proto-Onkoproteine sind Cyclin D und E, Faktoren des MAPK-, des PI3K/AKT- und des JAK/STAT-Signalweges.

1.6.4 Rolle von TGF-β in Tumorgenese und -progression

TGF-β übernimmt in der Tumorgenese und -progression offenbar verschiedenartige Funktionen. In mehreren Arbeiten wurde die Funktion des TGF-β als Zweiphasen-Akteur beschrieben. Das heißt, in einem frühen Tumorstadium wird die Tumorphoresis von TGF-β deutlich gehemmt. In einem fortgeschrittenen Stadium lässt die Inhibition offenbar nach (Dennler et al., 2002; Taipale et al., 1998; Moustakas et al., 2002; de Caestecker et al., 2000; Akhurst und Balmain, 1999). Die möglichen Ursachen für die Abschwächung des Tumorsuppressions-Effektes werden bei Taipale et al., 1998, mit einem Verlust der Sensitivität der Zellen gegenüber TGF-β erklärt. Dieser Sensitivitätsverlust kann durch die verminderte Expression eines TGF-β-Rezeptors hervorgerufen werden. Ein Beispiel hierfür ist die akute oder chronische myeloische Leukämie, bei der eine verminderte Expression der TGF-β-Typ-II-Rezeptor-mRNA gefunden wurde (Dennler et al., 2002). Als weitere Ursachen

wurden Mutationen im Bereich des TGF- β -Typ-II-Rezeptors beschrieben. Diese lagen bei bis zu 90% der Kolonkarzinome vor (Dennler et al., 2002). Außerdem kann durch eine Mutation oder Deletion von Genen eine Veränderung der intrazellulären Signalproteine wie der SMAD-Proteine hervorgerufen und somit der inhibitorische Effekt von TGF- β aufgehoben werden (Dennler et al., 2002; Akhurst und Balmain, 1999; Taipale et al., 1998). Etwa 30% der Pankreaskarzinome zeigen solche Aberrationen. Ein Sensitivitätsverlust der Zellen gegenüber dem TGF- β kann auch durch Onkogene wie dem Ha-Ras-Onkogen oder dem Myc-Onkogen sowie durch Infektion mit onkogenen Viren wie dem SV40, Adenoviren, EBV oder HPV bewirkt werden (Taipale et al., 1998). Von Moustakas et al., 2002, Dennler et al., 2002, und Miettinen et al., 1994, wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass der Wechsel des TGF- β von einem dominanten Wachstumsinhibitor zum Tumorprogressor in einer späteren Tumorphase mit der Modulation des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls E-Cadherin durch TGF- β einhergeht. Dies kann zu einer Epithel-Mesenchym-Transdifferenzierung (EMT) führen. Fortgeschrittene Tumorstadien gehen gehäuft mit einer Überexpression von TGF- β einher. Dabei besteht eine Assoziation zu vermehrter Tumorstromabildung und Knochenmetastasierung (Lawrence, 1996; Akhurst und Balmain, 1999; Walker und Dearing, 1992). In Arbeiten an Zellkulturen wurde gezeigt, dass TGF- β 1 die Aktivität von bestimmten Proteasen, z. B. der Matrixmetalloproteinase MMP-9, induzieren kann. Eine Imbalance zwischen den beiden Faktoren kann hierdurch begünstigt werden (Rifkin et al., 1999; Duivenvoorden et al., 1999).

Da in den meisten publizierten Arbeiten die Wirkungen von TGF- β s nur *in vitro* analysiert wurden, sollte in dieser Arbeit versucht werden, diese potenziellen Effekte von TGF- β auf der *In-vivo*-Ebene an menschlichen Mammakarzinomen zu untersuchen. Um ein möglichst genaues Bild von den Funktionen der TGF- β -Isoformen zu bekommen, wurden in der vorgelegten Arbeit deshalb die Zusammenhänge mit ausgewählten potenziellen Zielmolekülen näher analysiert. Zur Einführung in die Thematik werden diese im Folgenden kurz dargestellt.

1.7 Regulatoren der Zellproliferation

1.7.1 Zellzyklusregulation

Die beiden zentralen Regulationswege der Zellvermehrung sind der p53- und der Retinoblastoma(RB)-Regulationsweg, die in malignen Tumoren regelmäßig Aberrationen aufweisen. Transformierte Zellen sind durch eine abnorm gesteigerte Proliferation charakterisiert, die Folge einer defekten Zellzykluskontrolle ist. Ein besonderer Zielpunkt des Transformationsprozesses ist der Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus, denn die

Expression von Proteinen, die diesen Restriktions-(R)-punkt kontrollieren, ist in Malignomen besonders häufig verändert (Übersichten bei: Landberg, 2002; Lui und Grandis, 2002; Sherr, 1996). Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Zellzyklusprogression. Es werden heutzutage zwei Gruppen von mitogenen Faktoren unterschieden. Die sogenannten kompetenten Faktoren, zu denen der platelet-derived growth factor (PDGF) und der basic-fibroblast growth factor (bFGF) gehören, führen zu einer Signalaktivierung, die bewirkt, dass die Zelle die Ruhephase G₀ verlässt und in die G₁-Phase des Zellzyklus eintritt. Demgegenüber stimulieren die sogenannten Progressionsfaktoren wie EGF oder Insulin die Passage des R-Punktes.

Cycline bzw. Cyclin-abhängige Kinasen (cyclin dependent kinase, CDK) und aktivierende sowie hemmende Proteine (CDK-Inhibitoren) sind an der Kontrolle der G₁/S-Passage beteiligt. Im Prinzip aktivieren die Cycline der Gruppen D und E sequenziell cdk-4/6 und cdk-2, wodurch die Phosphorylierung von RB und damit die Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren ausgelöst wird. Es existieren zwei Familien von CDK-Inhibitoren, von denen die Aktivität der Kinasekomplexe beeinflusst wird. Die INK4-Familie (p15, p16, p18 und p19) beinhaltet CDK-Inhibitoren, die hauptsächlich auf die Cyclin-D-CDK4/6-Komplexe wirken. Die andere Klasse von CDK-Inhibitoren, die CIP/KIP-Familie (p21, p27, p57), hat einen weniger selektiven Effekt auf viele CDK-Komplexe. Ihre Hauptaktivität üben sie während der G₁- und S-Phase aus. Bemerkenswert ist, dass p21 und p27 auch stabilisierend auf die CDKs wirken und für die vollständige Aktivität der CDK-Komplexe notwendig sind. Die Bindung der verschiedenen aktiven CDK-Komplexe, die notwendig sind, damit die Zelle den R-Punkt und die S-Phase durchläuft, stellt eine komplexe Kaskade aktivierender und hemmender Ereignisse dar, die eine Vielfalt an Möglichkeiten für eine Aberration in Malignomen bietet. Verschiedene molekulare Mechanismen stehen hinter den Veränderungen von G₁/S-regulatorischen Proteinen.

1.7.2 p53

p53 ist ein wichtiger Regulator des Zellwachstums. Er wird durch DNA-Schäden, NO, Nukleotidmangel, Aktivierung von Onkogenen (z.B. MDM2) und Hypoxie aktiviert. In normalen, nicht neoplastischen Zellen bewirkt p53 den Zellzyklusstopp in der G₁-Phase oder in der G₂-Phase, um eine Reparatur der DNA zu ermöglichen. Ist die Reparatur nicht erfolgreich, initiiert p53 den sogenannten programmierten Zelltod, die Apoptose (Levine, 1997; Zoltan et al., 1994; Weinberg, 1995). Eine Inaktivierung von p53 durch Mutation kann zu einem Verlust der Kontrolle im Zellzyklus und zur Tumorentstehung führen. p53-Mutationen gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen (50%-55%) in malignen Zellen (Levine, 1997). Ein direkter Zusammenhang zwischen p53 und den TGF- β -Isoformen

wurde bis jetzt nicht nachgewiesen. Allerdings können beide Proteine eventuell über ähnliche Mediatoren, wie zum Beispiel den Mdm2-Bypass, in die Zellzyklusregulation eingreifen (Sun et al., 1998; Levine, 1997). Mdm2, das Produkt des MDM2-Gens, ist der wichtigste negative Regulator von p53.

1.7.3 p21

p21 hemmt als CDK-Inhibitor verschiedene Mitglieder der Cyclin/CDK-Familie und bewirkt einen Wachstumsstopp in den frühen Phasen des Zellzyklus (Ravitz and Wenner, 1997; Xiong et al., 1993; Jean and Quaroni, 1999). Eine Expression und Aktivierung des CDK-Inhibitors p21 kann unter anderem durch eine hohe Konzentration von p53 induziert werden (Ravitz und Wenner, 1997; Weinberg, 1995; Oda et al.; 1992). TGF- β kann eine vermehrte Synthese von p21 hervorrufen und die Zellproliferation hemmen (Lawrence, 1996; Taipale et al., 1998; Ravitz und Wenner, 1997).

1.7.4 Cyclin D1

Der Zellzyklus wird durch Cycline kontrolliert und gesteuert. Cyclin D1 und die cyclinabhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 nehmen dabei eine Schlüsselposition am G1-Kontrollpunkt ein. Sie bilden Komplexe miteinander und werden durch Phosphorylierungsvorgänge aktiviert. Durch einen Mitogenentzug, z. B. das Fehlen von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , durch Bindung an Inhibitoren der CDK (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKI) oder durch die Aktivität intakter Tumorsuppressorgene wie p16, p21, p27 und p53 werden die Cyclin-D1-Komplexe inaktiviert und die Zellteilung verhindert (Kaufmann et al., 2006).

Die Angaben in der Literatur zu den Cyclin-D1-Expressionsraten des Mammakarzinoms variieren zwischen 21% und 59%. Cyclin-D1-Expression kann sowohl bei In-situ- als auch bei invasiven Mammakarzinomen, nicht jedoch bei nicht malignen Läsionen nachgewiesen werden. Eine wichtige Bedeutung für die Entstehung des Mammakarzinoms erlangte das Cyclin D1 bei Versuchen mit transgenen Mäusen. Bei einer Überexpression des Cyclin D1 in den Brustdrüsen entwickelten die Mäuse ein Mammakarzinom und verstarben daran. Yu und Mitarbeiter konnten in einer 2001 veröffentlichten Arbeit zeigen, dass ein Verlust von Cyclin D1 in transgenen Mäusen die Entstehung von Mammakarzinomen durch Aktivierung der Onkogene *Ras* und *neu* verhindern kann (Yu et al., 2001).

Übereinstimmend findet sich eine positive Korrelation zwischen der Cyclin D1- und Östrogenrezeptor-Expression (Murray et al., 1993; Vos et al., 1999; Gillett et al., 1994). Dagegen bestehen keine signifikanten Korrelationen zwischen der Überexpression von Cyclin D1 und dem Grading, der Tumorgroße oder dem Lymphknotenstatus in Mammakarzinomen (van Diest et al., 1997; Vos et al., 1999). Ein direkter Zusammenhang zwischen TGF- β und

Cyclin D1 ist bislang nicht bekannt.

1.7.5 EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR/ HER-1) ist wie HER-2/neu ein Mitglied der Typ-1-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Der EGFR ist in die Regulation des Wachstums verschiedener Zellarten einbezogen. Das transmembranständige Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa wird von dem Proto-Onkogen c-erbB-1 kodiert (Ioachim et al., 1996). Durch Bindung von Liganden, wie zum Beispiel den Wachstumsfaktoren EGF oder TGF- α , kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors und zur Fortleitung und Verstärkung ihrer Signale ins Innere der Zelle. Infolgedessen werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Diese regulieren vor allem die Zellteilung und -differenzierung. Es wird vermutet, dass es in der Tumorzelle über Signalwege wie den Ras/Raf/MAPK, den STAT und PI3K/AKT auch zur Hochregulierung von Zellzyklus-Inhibitoren wie p27 und einem daraus folgenden G1-Zellzyklus-Arrest kommt (Jud et al., 2007). Der EGFR wird unterschiedlich stark auf der Zelloberfläche eines großen Teils maligner epithelialer Tumoren exprimiert: kolorektale Karzinome 25-77%, Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich 95-100%, Bronchialkarzinome 40-80%, Mammakarzinome 14-91%, Ovarialkarzinome 35-70% (Bässler, 1997; Busam et al., 1999; Salomon et al., 1995; Walker und Dearing, 1999). Der EGFR stellt keinen unabhängigen Prognosefaktor beim Mammakarzinom dar (Ioachim et al., 1996; Busam et al., 1999; Okamura et al., 1997). Die EGFR-Expression scheint mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung und damit einem kürzeren Überleben assoziiert zu sein; gesichert ist jedoch eine Korrelation zu herkömmlichen Prognosefaktoren wie Grading und Hormonrezeptorstatus (Bässler, 1997; Ioachim et al., 1996; Okamura et al., 1997; Neskovic-Kontantinovic et al., 1999).

1.8 Zelladhäsionsmoleküle

1.8.1 Integrin und E-Cadherin

Die Zelladhäsionsmoleküle sind im Bereich der Zellmembran lokalisiert. Sie steuern sowohl die Interaktionen zwischen den Zellen als auch die Beziehungen zwischen Zellen und der ECM (Bässler, 1997). Zelladhäsionsmoleküle sind an allen Schritten der malignen Progression beteiligt. In der eigenen Arbeit wurden β 1-Integrine als Beispiel für ein Zell-Matrix-Adhäsionsmolekül und E-Cadherin als wichtigstes Zell-Zell-Adhäsionsmolekül untersucht.

Integrine sind für die Struktur von Epithelien und Endothelien, für den Aufbau des Bindegewebes sowie für Entzündungsreaktionen und die Wundheilung verantwortlich.

Integrine kommen ubiquitär vor. Dabei können bestimmte Zellarten verschiedene Integrine exprimieren, andere hingegen nur ein spezifisches Integrin, zum Beispiel kommt in Leukozyten nur das $\beta 2$ -Integrin vor (Wagener und Müller, 2010). Alle Integrine sind heterodimere, transmembrane Rezeptoren, die aus variablen alpha- und beta- Untereinheiten zusammengesetzt sind. Sie sind wichtige Ligandenrezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine wie z. B. Typ-IV-Kollagen, Fibronectin, Laminin oder Vitronectin (Böcker et al., 1997). Die Integrine befinden sich die meiste Zeit in einem inaktiven Zustand auf der Zelloberfläche, in dem sie weder Liganden binden noch Signale in die Zelle übertragen. Erst durch bestimmte physiologische oder pathologische Gegebenheiten wird die Bindungsfunktion der Integrine aktiviert (Wagener und Müller, 2010). Normales Brustdrüsengewebe, Fibroadenome und Mastopathien zeigen eine starke Expression von $\beta 1$ -Integrin. In Mammakarzinomen wird eine signifikant erniedrigte Expression von $\beta 1$ -Integrin beobachtet (Bässler, 1997). Dabei zeigt sich häufig eine sehr heterogene Verteilung und Farbintensität in den Tumoren (Jonjic´ et al., 1993). Die $\beta 1$ -Integrin-Expression in Karzinomen ist mit dem Grading und dem Tumortyp assoziiert (Bässler, 1997; Gonzalez et al., 1999; Koukoulis et al., 1991). Ob ein direkter Zusammenhang zwischen TGF- β und $\beta 1$ -Integrin-Expression besteht, wurde bis jetzt beim Mammakarzinom nicht untersucht.

Das **E-Cadherin** ist ein kalziumabhängiges Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das über zytoplasmatische Proteine, wie α -, β -, und γ -Catenin, mit Aktin und Vinkulin als Anteil des kontraktilen Zytoskeletts interagiert. E-Cadherin ist somit Teil eines Multiproteinkomplexes, der in den Zonulae adhaerentes gefunden wird und benachbarte Zellen mechanisch an deren Zellmembran zusammenhält und somit eine wichtige Funktion zur Erhaltung der Gewebearchitektur darstellt (Bässler, 1997; Gonzalez et al., 1999; Jungck et al., 1999).

In normalen Darmepithelzellen führt eine Bindung des Tumorsuppressorproteins APC (adenomatöse Polyposis coli) an die β -Catenin-Untereinheit des E-Cadherins zu einer Lockerung der Zelladhäsionskräfte in den Zonulae adhaerentes. Folge ist eine Abschilferung der Epithelzellen ins Darmlumen. Eine Mutation im APC-Gen oder ein Wachstumssignal von außen führen zu einer verringerten Bindung von APC an das β -Catenin. Dadurch erhöht sich die Konzentration des β -Catenins im Zytoplasma. Ungebundenes β -Catenin verlagert sich in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor zu einer vermehrten Zellproliferation führt (Jungck et al., 1999). Beim Mammakarzinom ist ein Verlust der E-Cadherin- und β -Catenin-Expression mit einem lobulären Wachstumstyp assoziiert (Gondalez et al., 1999; Siitonen et al., 1996; Charpin et al., 1997; Bukholm et al., 1998). Eine erhaltene E-Cadherin-Expression korreliert mit einem hohen Tumordifferenzierungsgrad und einer niedrigen Proliferationsrate. Eine reduzierte E-Cadherin-Expression ist mit einem kürzeren krankheitsfreien Intervall und

der Neigung zur Metastasierung verbunden (Gondalez et al., 1999; Siitonen et al., 1996; Charpin et al., 1997).

In einer *In-vitro*-Studie an Brustdrüsenzellen der Maus von Miettinen et al. (1994) wurde dem TGF- β die Fähigkeit zugesprochen, die E-Cadherin-Expression so zu beeinflussen, dass es zu einer reversiblen Epithel-Mesenchym-Transdifferenzierung (EMT) kommt.

1.8.2 Kollagen IV

Kollagen IV ist neben Laminin und anderen Matrixkomponenten der wichtigste Bestandteil der Basalmembran. Die Basalmembran bildet eine Grenzlamelle zwischen Epithelzellen, Endothelzellen, Mesenchymzellen und dem Stroma. In Geweben hat die Basalmembran strukturelle Aufgaben, dient der Zellverankerung und übernimmt Filterfunktionen. Erst durch proteolytischen Abbau der Basalmembrankomponenten durch spezifische Kollagenasen wird diese permeabel unter anderem für Tumorzellen. Diese Kollagenasen können auch von Tumorzellen und Bakterien produziert werden und spielen eine Rolle bei der Tumordinvasion und bei Entzündungsprozessen (Böcker et al., 1997; Monteagudo et al., 1990). Außerdem ist bekannt, dass Mammakarzinomzellen Kollagen IV synthetisieren können. In der eigenen Arbeit wurde Kollagen IV immunhistochemisch dargestellt, um in intraduktalen Tumorabschnitten die Integrität der Basalmembran bzw. deren Abbau analysieren zu können. In den invasiven Tumorabschnitten wurde untersucht, ob Hinweise auf eine Neusynthese von Kollagen IV bestehen. Hierbei interessierte insbesondere der Zusammenhang zur TGF- β -Expression. Hierzu lagen zum Zeitpunkt des Beginns der eigenen Arbeit keine Daten vor.

1.9 Faktoren der Tumorprogression

1.9.1 Matrix-Metalloproteinasen

Metalloproteinasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, die in verschiedene Subklassen unterteilt werden:

- a) Interstitielle Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), welche vor allem fibrilläre Kollagene (I, II, III, VII, VIII, X) abbauen.
- b) Stromelysine (MMP-3, MMP-10 und MMP-11) einschließlich Matrilysin (MMP-7), die Proteoglykane, Kernproteine, Laminin, Fibronectin und die nichthelikale Form des Kollagen IV degradieren.
- c) Gelatinasen A und B (Typ IV-Kollagenasen: MMP-2 und MMP-9), die in der Lage sind, denaturiertes Kollagen, Kollagen IV und nicht-kollagene Proteine wie Fibronectin und Elastin abzubauen.

d) Membran-gebundene MMPs (MT-MMPs), die unter anderem an der Aktivierung anderer MMPs beteiligt sind (Benaud et al., 1998).

Matrix-Metalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle beim Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) sowohl unter physiologischen Bedingungen wie bei der Gewebemorphogenese, Wundheilung und Angiogenese als auch im Rahmen pathologischer Prozesse wie rheumatoider Arthritis oder Tumordinvasion und Metastasierung (Übersichten bei: Cox und O`Byrne, 2001; Egeblad und Werb, 2002; Overall und Lopez-Otin, 2002; Vihinen und Kahari, 2002).

Die MMPs sind eine Familie von endokrinen Endopeptidasen, die nach derzeitigem Kenntnisstand 24 menschliche MMPs und homologe oder andere Spezies umfassen. Sie sind als Kollektiv in der Lage, praktisch alle Komponenten der ECM zu spalten. In der Vergangenheit wurden die MMPs auf dem Boden ihrer Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Matrilysine unterteilt. Dies spiegelt sich in den noch vielfach verwendeten Bezeichnungen für die MMPs wieder, z. B. Gelatinase A (MMP-2), Stromelysin 1 (MMP-3) und Gelatinase B (MMP-9). Mittlerweile wurde ein sequenzielles Nummerierungssystem eingeführt und die MMPs werden heute entsprechend ihrer Struktur in acht Klassen eingeteilt. Davon werden fünf sezerniert und drei sind membrangebunden (membrane-type MMPs; MT-MMPs). Die in der vorgelegten Arbeit untersuchten MMP zählen zu jenen mit Hämapexin-ähnlicher Domäne (MMP-3) sowie mit Fibronectin-ähnlicher Domäne (MMP-2 und -9).

Die MMP werden als inaktive Zymogene sezerniert (pro-MMPs). Die Aktivierung erfordert die proteolytische Entfernung der Propeptid-Prodomäne (Sternlicht und Werb, 2001). Dies geschieht meist extrazellulär durch andere aktivierte MMPs oder Serinproteinasen (z. B. uPA). MMP-11, -28 und die MT-MMPs können allerdings auch innerhalb der Zelle durch intrazelluläre Furin-ähnliche Serin-Proteinasen aktiviert werden. Die Aktivierung von MMP-2 an der Zelloberfläche ist einzigartig und erfolgt in mehreren Schritten, an denen MMP-14 (MT1-MMP) und der tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) beteiligt sind.

Die Aktivität der MMPs wird streng kontrolliert. Dies geschieht sowohl auf der Ebene der Genexpression durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren (u. a. EGF, TGF- β) als auch auf der Ebene der Expressionsprodukte durch die genannten Aktivierungswege sowie durch die physiologischen MMP-Inhibitoren. Zu diesen zählen alpha-2-Makroglobulin und Thrombospondin-2. Die TIMPs (I bis IV) sind die am besten untersuchten endogenen MMP-Inhibitoren. Sie hemmen die MMPs reversibel in einem stöchiometrischen molaren Verhältnis von 1:1. Sie unterscheiden sich in ihrer gewebespezifischen Expression und ihrer Fähigkeit, die verschiedenen MMPs zu inhibieren.

Ursprünglich wurde den MMPs vor allem die Funktion zugeschrieben, strukturelle Komponenten der ECM zu degradieren und auf diese Weise die Zellmigration zu erleichtern. So gelten als Substrate von MMP-2, -3 und -9 unter anderem Kollagen Typ IV, V und XI sowie Gelatine, Decorin und Elastin. MMP-2 und -3 spalten außerdem unter anderem Kollagen Typ I, III, VII und X sowie Fibronektin, Laminin und Tenascin. Da aber die Zellen mit Rezeptoren für strukturelle ECM-Komponenten ausgestattet sind (z. B. Integrine), beeinflusst die Spaltung der ECM-Proteine auch zelluläre Signalwege und Funktionen. Außerdem können durch die Spaltung von bestimmten ECM-Komponenten Fragmente mit neuen Funktionen entstehen. Die Proteolyse von Laminin V und Kollagen Typ IV führt zur Freilegung von kryptischen Bindungsstellen, welche die Migration fördern. Zusätzlich können Wachstumsfaktoren proteolytisch freigesetzt und aktiviert werden, die entweder extrazellulär an Proteine gebunden sind (z. B. FGF, TGF- β) oder deren Vorläufer Zellmembran-gebunden sind (z. B. TGF- α). Auch Wachstumsfaktor-Rezeptoren stellen Substrate für MMPs dar. Die extrazellulären Domänen von HER-2, HER-4 und c-Met werden durch MMPs von der Zelloberfläche abgetrennt. Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und CD44 werden ebenfalls von MMPs gespalten mit der Folge eines gesteigerten invasiven Verhaltens.

Die grundlegende Funktion der MMPs, die Degradation von Proteinen, reguliert verschiedene Zelleigenschaften, die für die Tumorbilogie von Bedeutung sind. Zu diesen Eigenschaften zählt das Zellwachstum der Karzinomzellen, Differenzierung, Apoptose, Zellmigration, Invasion sowie die Regulation von Tumorangiogenese und Immunüberwachung (Übersicht bei Egeblad und Werb, 2002). Den Beweis für die Rolle der MMPs in der Tumorprogression haben Tierexperimente geliefert. Die Expression von MMP-3 und MMP-14 in Brustdrüsen führte zu spontanen Mammakarzinomen. In Xenograph-Experimenten entwickelten Malignomzellen ein aggressives Verhalten, wenn die MMP-Expression hochreguliert wurde und umgekehrt.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Expression und Aktivität von MMP-2, -3 und -9 in menschlichen Mammakarzinomen gegenüber dem Normalgewebe erhöht sind und häufig mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, erhöhter Metastasierungsrate und verkürztem Überleben korrelieren (Übersicht bei Egeblad und Werb, 2002). Somit sprechen die klinischen Befunde dafür, dass die genannten MMPs eine Rolle in der Tumorprogression des Mammakarzinoms spielen.

Anders als bei klassischen Onkogenen beruht die Hochregulation der MMP-Expression in Karzinomzellen üblicherweise nicht auf genetischen Alterationen. Amplifikationen oder aktivierende Mutationen als regelmäßige Quelle einer veränderten Transkription wurden bislang nicht identifiziert. Somit kann eine veränderte Transkription vermutet werden, die

durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, die Aktivierung von Onkogenen ohne den Verlust von Tumorsuppressoren moduliert wird. Die MMP-Transkription ist *in vitro* unter anderem durch Interleukin-1 β , VEGF, EGF, BFGF und TNF- α induzierbar sowie durch TGF- β hemmbar oder auch stimulierbar. Integrine können je nach Zelltyp und Zusammensetzung die MMP-Expression sowohl steigern als auch vermindern (Brakebusch et. al., 2002). Die Herunterregulation von E-Cadherin ist experimentell mit gesteigerter MMP-9-Expression verbunden (Llorens et. al., 1998). Durch die Transfektion von E-Cadherin kann die Expression von MMPs unterdrückt werden (Luo et. al., 1999).

In diesem Zusammenhang verdient die Tatsache besondere Beachtung, dass in menschlichen Tumoren offenbar nicht nur Karzinomzellen selbst die Quelle der meisten MMPs darstellen, sondern die Stromazellen wesentlich an der Synthese beteiligt sind. Allerdings sind die Angaben in der verfügbaren Literatur zur zellulären Lokalisation der MMP-Transkripte und Proteine *in vivo* widersprüchlich (Lebeau et al., 1999). Daher wurde dieser Punkt in der eigenen Untersuchung näher bearbeitet. Es wird angenommen, dass Karzinomzellen in der Lage sind, die MMP-Produktion in den Stromazellen parakrin durch Sekretion von Interleukinen, Interferonen, Emprinen und Wachstumsfaktoren zu steigern (Sternlicht und Werb, 2001).

Daneben können MMPs aber auch die Zellproliferation durch Aktivierung von TGF- β oder durch Erzeugung apoptotisch wirksamer Moleküle wie FasL, TNF- α negativ regulieren. MMPs gelten auch als wichtige positive Regulatoren der Angiogenese. Dies wird gestützt durch tierexperimentelle Daten, die belegen, dass endogene wie synthetische MMP-Inhibitoren die Tumorangio-genese herunterregulieren. Außerdem sind MMPs an Mechanismen beteiligt, mit denen Karzinomzellen der Erkennung und Attacke durch das Immunsystem entgehen. MMPs aktivieren unter anderem TGF- β als wichtigen Inhibitor der T-lymphozytären antitumoralen Antwort.

Somit bestehen im Rahmen der Tumorprogression potenziell zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den MMPs und den TGF- β s. In den Arbeiten von Benaud et al. (1998), Duivenvoorden et al. (1999) und von Overall et al. (2002) war übereinstimmend zu finden, dass TGF- β die MMP-Expression herunterreguliert und eine vermehrte Expression der TIMPs induziert. Festzuhalten ist, dass zu Beginn der eigenen Arbeit nicht bekannt war, welche Rolle diese Interaktionen in der Morphogenese und Progression des menschlichen Mammakarzinoms spielen.

1.9.2 Proliferationsmarker Ki-67

Ki-67 ist ein proliferationsassoziiertes nukleäres Antigen. Es wird in der G1-, S-, G2- und in

der M-Phase exprimiert, nicht aber in der G0-Phase. Die Expression von Ki-67 ist somit ein Maß für die (Tumor-)Zellproliferation. Beim Mammakarzinom liegt die Expressionsrate für Ki-67 zwischen 6,5% bis 60% (Bässler, 1997; Lelle et al., 1987; Bacus et al., 1989). Ki-67 korreliert mit der Tumorgröße, dem Grading, der Gefäßinvasion, dem Lymphknotenstatus sowie invers mit dem Hormonrezeptorstatus. In der eigenen Arbeit wurde der Ki-67 genutzt, um die Proliferationsaktivität der untersuchten Karzinome zu bestimmen.

1.10 Vaskularisation

Das Tumorwachstum ist in hohem Maße von einer tumoreigenen Gefäßversorgung abhängig. Ist die Tumorgröße von 2mm überschritten, kann sich der Tumor nicht mehr durch Diffusion aus der Umgebung ernähren. Ein Tumorwachstum ist dann nur noch durch eine eigene Gefäßneubildung möglich. Diese Neoangiogenese ist Teil des Matrixumbaus in den Tumoren. Tumorzellen sezernieren unter anderem den Tumorangiogenese-Faktor (TAF) und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (β -FGF), der ein Einsprossen von Kapillaren und Fibroblasten ermöglicht, sodass die Tumorzellen nun durch Perfusion ernährt werden können. Unter diesen Bedingungen kann der Tumor exponentiell wachsen. Da er aber häufig schneller wächst als sich Gefäße neu bilden, kommt es zu ischämischen Nekrosen (Böcker et al., 1997). Beim Carcinoma in situ des Mammakarzinoms erfolgt die Induktion einer Neoangiogenese erst in fortgeschrittenen Stadien und ringförmig im Stroma. Sie ist eine wichtige Voraussetzung für Gefäßinvasion, für lymphogene und hämatogene Metastasen. Die Bestimmung der Vaskularisation in der eigenen Arbeit erfolgte über die immunhistochemische Darstellung von CD31, das in Endothelzellen von Blut-, nicht aber von Lymphgefäßen exprimiert wird. Zu Beginn der eigenen Arbeit gab es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen TGF- β 2 und dem korrespondierenden Rezeptor (TGF- β 2-R) und der Vaskularisation (De Jong et al., 1998 (I); De Jong et al., 1998 (II)).

1.11 Fragestellung

Die exakte Rolle der transformierenden Wachstumsfaktoren TGF- β 1, -2 und -3 ist bislang nicht geklärt. Es ist zwar aus *In-vitro*-Untersuchungen bekannt, dass die TGF- β multifunktionelle Regulationsproteine sind, die in Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion und -invasion eingreifen können, allerdings liegt bislang kein schlüssiges Konzept beim menschlichen Mammakarzinom vor, in welcher Weise sie diese Effekte haben. Deshalb wurde in der eigenen Arbeit versucht, sich der Beantwortung durch einen komplexen Untersuchungsansatz zu nähern, der sowohl Faktoren der Zellzyklussteuerung als auch der Zellinvasion berücksichtigt. Um zu einem besseren Verständnis der *In-vivo*-Situation beizutragen, wurden die Analysen nicht an Tumorzelllinien, sondern an Gewebeproben menschlicher Mammakarzinome durchgeführt. Dies berücksichtigt die potenziellen Interaktionen zwischen Tumorzelle und Mikro-Umfeld, die sich *in vitro* nicht in dieser Vielschichtigkeit studieren lassen.

Folgende Fragen wurden im Einzelnen bearbeitet:

1. Welche Zellen exprimieren TGF- β 1, - β 2 und - β 3 im Normalgewebe sowie im intraduktalen und invasiven Mammakarzinom?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von TGF- β 1, - β 2 und - β 3 und dem Wachstumsverhalten menschlicher Mammakarzinome sowie den Tumoreigenschaften, Proliferationsaktivität, Angiogenese und Kollagen-IV-Expression?
3. Welcher Zusammenhang besteht im menschlichen Mammakarzinom zwischen der Proteinexpression von TGF- β 1, - β 2 und - β 3 sowie potenziellen Zielmolekülen und Koregulatoren der Zellproliferation und -invasion?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Das Untersuchungskollektiv bestand aus insgesamt 66 Patientinnen, die in den Jahren 1986 bis 1998 in der Frauenklinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München an einem Mammakarzinom operiert wurden. Die Gewebeproben wurden entweder unfixiert zur intraoperativen Schnellschnittuntersuchung oder in 4-10%igem Formalin an das Pathologische Institut der LMU München übersandt und dort nach den Standardprotokollen für die diagnostische Beurteilung bearbeitet. Alle Gewebeproben stammten aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der LMU.

Voraussetzung für die Verwendung des Materials in der eigenen Arbeit war, dass die pathomorphologische Diagnostik hierdurch nicht eingeschränkt wurde bzw. diese bereits abgeschlossen war.

Im Hinblick auf den Datenschutz erfolgte eine Pseudonymisierung der Patientinnen. Dazu wurden die Namen, Geburtsdaten und andere Identifikationsmerkmale (z. B. für die diagnostische Beurteilung vergebene Journalnummern) durch einen Zahlencode ersetzt.

Generell ist hinsichtlich der geltenden Datenschutzgesetze und -richtlinien im Jahre 1998, als die Untersuchungen im Wesentlichen durchgeführt wurden, folgendes festzuhalten: Auf Studien mit Verwendung archivierter Gewebeproben, insofern retrospektive Untersuchungen von der hier vorgenommenen Art, trafen und treffen die Arzneimittel- und Medizinprodukte-Gesetze nicht zu. Eine Beratungsverpflichtung gemäß der Berufsordnung für Ärzte bestand nicht. Dies ergab sich nicht zuletzt aus den zahlreichen Kontakten des primären Betreuers dieser Dissertation mit der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU. Außerdem dokumentieren die zur Behandlung in eine der Kliniken des Klinikums der LMU aufgenommenen Patientinnen und Patienten bei fehlendem Widerspruch mit ihrer Unterschrift auf dem Behandlungsvertrag aufgrund eines darin enthaltenen Passus ihr Einverständnis mit der Verwendung von residualem Zell- und Gewebematerial für Forschungszwecke.

Die invasiven Karzinome wurden entsprechend der modifizierten WHO-Klassifikation (Rosen und Obermann, 1993) typisiert. Karzinome vom invasiven duktalem Typ (*not otherwise specified, NOS*) bildeten die größte Gruppe (n = 41) und wurden entsprechend der Ausdehnung ihrer **intraduktalen Tumorkomponente** und ihres **invasiven Wachstumsmusters** weiter unterteilt. Nach den Kriterien von Schnitt et al. 1994 wurden Karzinome, die eine extensive intraduktale Komponente (*extensive intraductal component, EIC*) aufwiesen, von solchen mit niedriger oder fehlender intraduktaler Komponente (*low or no intraductal component, LIC*) unterschieden. Wenn Karzinome vom duktalem Typ mit LIC

einige, aber nicht alle Kriterien des invasiven lobulären Karzinoms aufwiesen, wurden sie als invasive duktales Karzinome mit diffusem Wachstumsmuster (*diffuse growth pattern*, **DGP**) klassifiziert. Das histologische Grading erfolgte nach Elston und Ellis (1991). Die Mammakarzinome wurden gemäß ihrer tubulären Differenzierung, dem Grad der Kernpolymorphie und der Anzahl der Mitosen pro Gesichtsfeld in drei histologische Grade eingeteilt. Drei Mammakarzinome wurden als G1-Tumoren eingestuft, 31 Tumore wiesen einen mittleren Malignitätsgrad (G2) auf und in 32 Fällen handelte es sich um G3-Tumoren.

Die Angaben zu den TNM-Stadien der Patientinnen wurden den pathologischen Befunden des Pathologischen Institutes der LMU München entnommen. Fernmetastasen (pM1) lagen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nur in einem Fall vor.

Das Alter der Patientinnen betrug im Durchschnitt 61 Jahre (Mittelwert: 60,9; Median: 61; Minimum: 34; Maximum: 85). Die pathomorphologischen Eigenschaften der bearbeiteten Fälle sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Von den 66 Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom befanden sich zum Zeitpunkt der Erkrankung 9 Frauen in einem prämenopausalen (≤ 50 Jahre) und 57 Frauen in einem postmenopausalen (≥ 50 Jahre) Status (Wango, 1996).

Bei 44 der 66 Karzinome lag neben der invasiven auch eine intraduktale Tumorkomponente vor, die bei bestimmten Markern zusätzlich ausgewertet wurde (TGF- β s, MMPs, Kollagen Typ IV).

Tabelle 2.1: Untersuchungskollektiv beim invasiven Mammakarzinom

Eigenschaften	Anzahl (n)	%
Alter:	34-85 Jahre	
Mittelwert:	60,9	
Histologischer Typ (Schnitt et al., 1994; Rosen und Obermann, 1993)		
invasiv duktal mit LIC	41	62,1
invasiv duktal mit EIC	10	15,1
invasiv duktal mit DGP	9	13,6
invasiv lobulär	6	9,2
pTNM-Klassifikation (UICC 2002)		
pT		
pT1	8	12,1
pT2	36	54,6
pT3	20	30,3
pT4	2	3,0
pN		
pN0	27	41,0
pN1	34	51,5
pN2	5	7,5
pM		
pM1	65	98,5
pMx	1	1,5
Histologischer Grad (Elston und Ellis, 1991)		
G1	3	4,5
G2	31	47,0
G3	32	48,5
Gesamt	66	100,0

Abkürzungen:

LIC, low or no intraductal component

EIC, extensive intraductal component

DGP, diffuse growth pattern

2.2 Methoden

Die Rezepturen für die verwendeten Puffer und Reagenz-Lösungen sind im Anhang in Tabelle 8.2 aufgeführt. Der Nachweis der analysierten Proteine und Proteinase erfolgte mittels Immunhistochemie.

2.2.1 Allgemeines Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine etablierte Methode in der pathologischen Diagnostik und Forschung. Durch sie können zelluläre Antigene in Geweben oder in zytologischem Material nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgt durch verschiedene Systeme, die auf hochspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen (Storjohann, 1998).

Durch den Einsatz von Antikörpern und Farbkomplexen können bestimmte antigenträgende Strukturen, vor allem Proteine, am Gewebeschnitt dargestellt werden. Heutzutage erfolgt die Lokalisation der Antigene zumeist indirekt; das heißt, das Gewebe wird zunächst mit nicht-markierten monoklonalen (z. B. aus der Maus) oder polyklonalen Antikörpern (z. B. aus dem Kaninchen) überschichtet. Die Detektion erfolgt dann mittels verschiedener Systeme, die zumeist auf einer 2-Schritt- (Enzym-markierter Sekundärantikörper) oder 3-Schritt-Methode (lösliche Enzym-Immunkomplex-Methode oder Avidin-Biotin-Methode) basieren. Deren Ziel ist es, eine Signalamplifikation zu erreichen. In Abhängigkeit von dem verwendeten System ist gegebenenfalls eine Blockierung endogener Enzymaktivitäten notwendig.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene, jeweils hochsensitive dreistufige immunhistochemische Methoden der Detektion eingesetzt.

Bei der **Alkalischen Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Methode (APAAP-Methode)** für Primärantikörper aus der Maus stellt ein Brückenantikörper die Verbindung zwischen dem Primärantikörper und einem löslichen Enzym-Anti-Enzym-Immunkomplex aus zwei Molekülen alkalischer Kälberdarmphosphatase und einem Anti-alkalischen-Kälberdarmphosphatase-Antikörper (IgG) von der Maus her. Der Kaninchen-Brückenantikörper ist gegen Immunglobuline der Spezies Maus gerichtet, von der sowohl Primärantikörper als auch Enzym-Immunkomplex stammen. Die alkalische Phosphatase katalysiert schließlich die Farbreaktion. In der Arbeit wurden hochsensitive, kommerziell erhältliche, standardisierte APAAP-Systeme (siehe Tabelle 8.1 im Anhang) verwendet.

Die **Avidin-Biotin-Methode** beruht auf der Fähigkeit des tetrameren Glykoproteins Avidin, mit bis zu vier Molekülen des Vitamins Biotin sehr stabile Komplexverbindungen eingehen zu können. Heutzutage wird Avidin häufig durch Streptavidin ersetzt, das aus dem Bakterium

Streptomyces avidinii isoliert wird Streptavidin hat den Vorteil, dass es eine geringere Neigung zu unspezifischen Bindungen hat und somit eine geringere Hintergrundfärbung bietet. Auf der ersten Stufe wird ein mono- oder polyklonaler Primärantikörper gegen das gesuchte Antigen auf den Gewebeschnitt aufgetragen. Danach folgt ein biotinylierter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und aus einer anderen Tierspezies stammt. Die dritte Stufe besteht in der Interaktion zwischen einem Enzym-markierten Streptavidin-Komplex und dem biotinylierten Sekundärantikörper. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Avidin-Biotin-Systeme verwendet: Bei der Streptavidin-Biotin-Complex-Methode (Strept-ABC) interagiert ein Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex, der vor dem Auftragen auf den Schnitt aus Streptavidin und biotinyliertem Enzym hergestellt wird, mit einem biotinylierten Brückenantikörper. Bei der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB; siehe Tabelle 8.1 im Anhang) bindet Enzym-konjugiertes Streptavidin an den biotinylierten Brückenantikörper. Bei der F(ab')-Methode ist der Brückenantikörper entweder ein komplettes Immunglobulinmolekül (Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Immunglobulin) oder ein F(ab')₂-Fragment, bestehend aus zwei kovalent gebundenen F(ab')-Fragmenten. Die farbliche Markierung der Reaktion und damit des gesuchten Antigens ist Folge einer Wechselbeziehung der Peroxidase mit einem geeigneten Chromogen (z. B. 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid = DAB oder 3-Amino-9-Ethylcarbazol = AEC). Die in der Arbeit verwendeten Brückenantikörper und das Peroxidase-konjugierte Streptavidin entstammten teils einzeln erhältlichen Konzentraten, teils gebrauchsfertigen, kommerziell erhältlichen standardisierten Lösungen (siehe Tabelle 8.1 im Anhang).

Auf einem ähnlichen, aber vereinfachten Prinzip basiert das ebenfalls in der Arbeit angewandte **EnVision™ System** (siehe Tabelle 8.1 im Anhang) zur Verstärkung immunhistochemischer Signale. Der vorgeformte Komplex besteht hier aus einem Dextrangerüst, das zahlreiche Peroxidase- und Sekundärantikörper-Moleküle trägt. Dieses Prinzip wird auch im HercepTest™ (siehe Tabelle 8.1 im Anhang) zum Nachweis der HER-2/neu-Überexpression genutzt.

Die Verwendung von Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe macht zumeist eine Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene notwendig, die mittels verschiedener Enzyme (u. a. Protease E), Detergentien (Saponin) oder durch Erhitzen in Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert (z. B. Mikrowelle) erfolgen kann.

Die Vorbehandlung und Detektion der jeweils analysierten Antigene wurde im Vorfeld der Untersuchungen in Testserien optimiert.

2.2.2 Durchführung

Von den Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Gewebeproben wurden 2-3µm dicke Schnitte angefertigt, auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus[®]; Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und über Nacht bei 50-60°C getrocknet. Die Schnitte wurden in Xylol für 2 x 15 Minuten **entparaffiniert** und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe **rehydriert**. Nach dem Spülen der Schnitte in Aqua dest. erfolgte die **Antigendemaskierung**. Die jeweils eingesetzte Technik ist in Tabelle 8.1 im Anhang aufgeführt. Die Vorbehandlungen mit Enzymen und Saponin wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zur Hitze-Demaskierung wurden die Schnitte in der jeweils eingesetzten Pufferlösung (vgl. Tabelle 8.2 im Anhang) in Mikrowellen-festen Plastikkuvetten (TPX, Brand, Deutschland) bei 750 Watt in handelsüblichen Mikrowellengeräten oder in einem Wasserbad bei 95-99°C erhitzt. Nach der Abkühlungsphase (20 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Schnitte in TRIS-Puffer (siehe Tabelle 8.2 im Anhang) 2 x 5 Minuten gewaschen. In Abhängigkeit von dem verwendeten Antikörper erfolgte die anschließende Detektion entweder mittels APAAP- oder ABC-Methode (vgl. Tabelle 8.1 im Anhang).

Für die **APAAP-Methode** wurde als nächster Schritt der Primärantikörper aufgetragen. Die jeweiligen Bezugsquellen, Verdünnungen und Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 8.1 aufgeführt. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in Tris-Brij-Puffer gespült, gefolgt von der Inkubation mit dem Brückenantikörper für 30 Minuten bei einer Verdünnung von 1:125. An ein erneutes Spülen der Schnitte für 2 x 5 Minuten in Tris-Brij-Puffer schloss sich die Inkubation mit APAAP-Komplex (DAKO) 1:50 verdünnt für 30 Minuten an. Nach einem weiteren Spülschritt für 2 x 5 Minuten in Tris-Brij-Puffer wurde die Prozedur mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex zur Verstärkung der Reaktion ein- bis zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Farbreaktion mit Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tabletten-Sets (Sigma, St. Louis, USA) für 10 Minuten. Die Schnitte wurden für 10 Minuten fließend gewässert mit sich anschließender Kerngegenfärbung in Hämalaun nach Mayer für 30-50 Sekunden. Das Eindecken in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte nach erneutem Spülen der Schnitte in fließendem Wasser für 10 Minuten.

Bei der **ABC-Methode** erfolgte eine Blockade der endogenen Peroxidase-Aktivität mittels Perhydrol 20% (1:4 in Aqua dest. verdünnt; Merck) für jeweils 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte in fließendem Wasser und TRIS-Puffer jeweils für 10 Minuten gespült. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe wurden die Schnitte entweder für 10 Minuten mit einem Protein-Blocker (DAKO) oder für 20 Minuten mit Normalserum der Spezies überschichtet, aus welcher der biotinylierte Brückenantikörper stammte (DAKO oder Vector Laboratories). Anschließend erfolgte die Überschichtung und Inkubation mit dem Primäantikörper. Die Bezugsquellen, Verdünnungen und Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 8.1 aufgeführt. Nach einem Spülen der Schnitte in Tris-Brij-Puffer für 3 x 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten Brückenantikörper (DAKO oder Vector Laboratories) für 30 Minuten. Im Anschluss an einen weiteren Spülschritt in Tris-Brij-Puffer für 2 x 5 Minuten wurden die Schnitte je nach System mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO), dem Avidin-Biotin-Komplex (Vector-Laboratories) oder Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (DAKO) für 30 Minuten überschichtet. Nachdem die Schnitte in Tris-Brij-Puffer für 2 x 5 Minuten gespült wurden, erfolgte die Farbreaktion in einer AEC- (Sigma) oder DAB-Lösung (DAKO) für 15 Minuten. Die Schnitte wurden 10 Minuten lang fließend gewässert und wie oben gegengefärbt sowie eingedeckt.

Der **HercepTestTM** wurde exakt nach den Angaben des Herstellers (DAKO HercepTestTM Kurzanleitung) durchgeführt.

Kontrollexperimente

Die Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Reaktionen erfolgte regelmäßig durch Kontrollexperimente. Die Spezifität der Immunreaktionen wurde im Rahmen der Basistestung eines Antikörpers überprüft, indem der jeweilige Primäantikörper aus Maus oder Kaninchen durch das entsprechende Isotyp-Immunglobulin ersetzt wurde (**Isotypenkontrolle**). Als sogenannte **Negativkontrolle** wurde außerdem der Primäantikörper durch das Antikörper-Verdünnungsmedium ersetzt (Systemkontrolle).

Mammakarzinome mit bekanntem Expressionsniveau für die verschiedenen Marker dienten als regelmäßige **externe Positivkontrollen** zur Überprüfung der Sensitivität in den jeweiligen Färbeläufen. Zur Validierung der Färbeprozedur mit dem HercepTest[®] wurden bei jedem Färbelauf die Kontrollobjekträger mitgeführt, die im Kit enthalten sind. Als **interne Positivkontrolle** konnte das in den Schnittpräparaten zumindest zum Teil erhaltene Normalgewebe für jene Marker herangezogen werden, die auch in nicht-neoplastischen Epithelien und/oder Stromazellen exprimiert werden (ER, PgR, Ki-67, Cyclin D1, p21, p53,

MMP-2, MMP-3, MMP-9, β 1-Integrin, E-Cadherin, EGFR, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3).

Nur bei adäquater Reaktivität der Kontrollen wurden die immunhistologischen Untersuchungspräparate gewertet.

2.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistologischen Präparate erfolgte an zwei verschiedenen Axioplan-Mikroskopen der Firma Zeiss (high power fields, HPF, Gesichtsfeldgröße 0,159 mm² pro HPF und 0,307 mm² pro HPF), davon eins mit einer Mikroskopkamera. Zum Auszählen der Schnittpräparate diente ein Assistent-Counter AC-8 von der Firma Karl Hecht aus Sondheim. Die immunhistologischen Präparate wurden mit einer Kamera der Firma Photometrics aufgenommen und im Computer gespeichert. Die Bilder sind in den laufenden Text im Ergebnisteil eingearbeitet.

Bei der Auswertung der **TGF- β s** (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) und der **MMPs** (MMP-2, MMP-3, MMP-9) wurde der Prozentsatz positiver Tumorzellen und peritumorale Stromazellen bestimmt. Als peritumoral galten dabei jene Stromazellen, die innerhalb eines maximalen Radius von 0,5mm lagen. Fibroblasten, Makrophagen und Endothelien wurden als peritumorale Stromazellen gewertet. Die Auswertung von intraduktalen und invasiven Tumorkomponenten erfolgte getrennt. Für jeden Tumorschnitt wurden mindestens vier Gesichtsfelder bei 40facher Vergrößerung (0,196mm² pro HPF) ausgezählt, von denen mindestens jeweils zwei im Tumorzentrum und der -peripherie lokalisiert waren. Die Werte für die peripheren und zentralen Tumoreale der invasiven Komponente wurden getrennt erfasst. Um die Ergebnisse mit pathomorphologischen Parametern und anderen Markern vergleichen zu können, wurden Mittelwerte gebildet. Parallel wurde in jeweils mindestens zehn Fällen auch die Expression für die verschiedenen MMPs und TGF- β s in normalem Brustdrüsengewebe bestimmt (Epithelien und Stromazellen getrennt).

Für die Auswertung der **Kollagen-IV-Färbereaktion** wurden keine Grenzwerte festgelegt, sondern die positive Darstellung der Basalmembran in der Umgebung der Tumorzellverbände in vier Gruppen (< 10%; 10-50%; 50-80%; > 80%) sowohl für die intraduktale als auch für die invasive Tumorkomponente eingeteilt und ausgewertet.

Bei allen übrigen Faktoren wurde nur die invasive Komponente ausgewertet, da für die Proteine bereits zu Beginn der Studie klar war, dass sie für den Übergang zwischen intraduktalem und invasivem Wachstum keine entscheidende Rolle spielen.

Für die Beurteilung der **nukleären Antigene** (ER, PgR, Ki-67, Cyclin D1, p21, p53) wurden

regelmäßig 500 invasive Tumorzellkerne ausgezählt. Die Tumoren waren entsprechend den Vorgaben der St. Gallen-Konsensus-Konferenz (Goldhirsch et al., 2001) als ER- oder PgR-positiv, wenn mindestens 10% der Tumorzellkerne eine Färbereaktion aufwiesen. Eine Immunreaktion von mehr als 10% der Tumorzellkerne wurde als erhöhte Proliferationsaktivität im Falle Ki-67-positiver Zellkerne oder als Überexpression von Cyclin D1 bzw. p21 bewertet. Diese Grenzwerte wurden im Einklang mit verfügbarer Literatur gewählt (Bose et al., 1996; Fiche et al., 2000; Oh et al., 2001), um eine Überexpression von Cyclin D1 und p21 bzw. eine erhöhte Proliferationsaktivität eindeutig von der basalen Expression dieser Marker im Normalgewebe zu unterscheiden. Normale Brustdrüsenepithelien zeigten eine Immunreaktivität für Ki-67, Cyclin D1 und p21 in weniger als 10% der Zellkerne. Der immunhistologische Nachweis von p53 führte in bis zu 40% der normalen Brustdrüsenepithelien zu einer schwachen Färbereaktion. Daher wurde eine p53-Akkumulation als Färbereaktion in mehr als 40% der Zellkerne definiert, die üblicherweise von mittlerer oder starker Intensität war.

Bei der Auswertung der **Zellmembran-ständigen Antigene** (E-Cadherin, β 1-Integrin, EGFR, HER-2/neu) wurden in der Regel mindestens invasive 500 Tumorzellen ausgezählt. Jede eindeutige membranständige Reaktivität für E-Cadherin, β 1-Integrin und EGFR wurde als positiv gewertet. Bei der Beurteilung der HER-2/neu-Überexpression folgte die Interpretation der Färbereaktion den Kriterien und Vorgaben des Herstellers des HercepTestsTM (siehe Tabelle 2.2). Diese Kriterien wurden auch in den Herceptin[®]-Zulassungsstudien angewandt (Cobleigh et al., 1999; Slamon et al., 2001). Für den Vergleich mit anderen Parametern galten in der vorgelegten Studie nur die Fälle mit einem Score 3+ als eindeutig als HER-2-positiv.

Tabelle 2.2: Auswertungskriterien HER-2/neu-Immunhistochemie und Bewertung der Scores

	Score	Bewertung
Tumore mit einem Anteil < 10% positiver Tumorzellen oder mit negativen Tumorzellen	0	negativ
Tumore mit einem Anteil > 10% positiver Tumorzellen und einer Membranfärbung, aber inkomplett	1+	negativ
Tumore mit einem Anteil > 10% positiver Tumorzellen und mit kompletter Membranfärbung von der Farbintensität gering bis mäßig	2+	negativ
Tumore mit einem Anteil > 10% positiver Tumorzellen und kompletter Membranfärbung von starker Farbintensität	3+	positiv

Für die Auswertung der Vaskularisation (**CD31**) wurden, nach Fox et al. (1993) bei jedem Tumorschnitt je nach Gefäßdichte ein bis drei sogenannte Hot-Spots ausgewählt. Hot-Spots sind Tumoreale mit der höchsten Gefäßdichte, sie liegen häufig in der Tumorperipherie. In jedem dieser Hot-Spots wurde in vier Gesichtsfeldern bei 40facher Vergrößerung (0,307 mm² pro HPF) die Anzahl der Gefäße gezählt und auf eine Fläche von 1mm² umgerechnet. Die Gefäßdichte eines Tumors entsprach dann dem Mittelwert der Hot-Spots.

2.4 Statistik

Als Statistikprogramm diente SPSS (Superior Performance Software Systems) 10.0 für Windows verwendet.

Die Zusammenhänge zwischen nicht metrischen, also nominal oder ordinal skalierten Variablen wurden in Kreuztabellen dargestellt und mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson geprüft.

Die Prüfung auf Normalverteilung der metrisch skalierten Variablen erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Mittelwertunterschiede der metrisch skalierten Daten wurden bei Normalverteilung der ausgewerteten Daten mit dem t-Test oder dem einfaktoriellem ANOVA-Test, bei nicht normal verteilten Daten mit dem Wilcoxon-Test, dem U-Test nach Mann-Whitney oder dem H-Test nach Kruskal-Wallis berechnet.

Korrelationen zwischen TGFβs, MMPs, der Gefäßdichte (CD31) und dem Alter wurden mit dem Pearsons-Korrelations-Koeffizienten bei normal verteilten Daten oder mit dem Kendalls-

Tau-Korrelations-Koeffizienten bei nicht normal verteilten Daten ermittelt. Das Signifikanzniveau lag bei allen Tests bei $p < 0,05$ (zweiseitig).

3 Ergebnisse

3.1 Faktoren der Zellproliferation, -adhäsion, -invasion und Angiogenese

3.1.1 Korrelation mit Tumortyp, pTN-Status und Grading

Die immunhistologischen Reaktionsergebnisse in der invasiven Tumorkomponente bezogen auf den histologischen Typ, die Tumorgröße und den Lymphknotenbefall sowie den histologischen Differenzierungsgrad sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Im Falle von E-Cadherin konnten in 4 Fällen die immunhistochemischen Reaktionsergebnisse nicht verwertet werden, da in den Schnittpräparaten vorhandenes normales Drüsengewebe keinen adäquaten Reaktionsausfall zeigte.

Insgesamt waren 68,2% der invasiven Mammakarzinome **ER-positiv** und 47,0% **PgR-positiv**. Von den 8 prämenopausalen Patientinnen waren 50% ER-positiv, bei den postmenopausalen waren es 71,93%. Die Auswertung der Hormonrezeptoren in Bezug auf die konventionellen histomorphologischen Parameter ergab eine Korrelation zwischen Grading und ER-Status ($p = 0,011$). Die Tumorstadien korrelierten nicht mit dem Rezeptorstatus ($p > 0,05$).

Ki-67, p53, p21^{WAF} und Cyclin D1 sind nukleäre Proteine. Die Verteilung und Farbintensität der positiven Tumorzellen waren zum Teil inhomogen, das heißt, dass positive Tumorzellen nicht gleichmäßig über die gesamte Tumorfläche verteilt waren.

Eine erhöhte **Proliferationsaktivität**, signalisiert durch **Ki-67-positiv > 10%**, fand sich in 58,5% der Karzinome, wie in Abbildung 3.1; A zu sehen ist. Die Proliferationsaktivität korrelierte signifikant mit der Tumorgröße ($p = 0,002$). Der histologische Wachstumstyp und pN-Status korrelierten nicht mit der Proliferationsaktivität ($p > 0,05$). Karzinome mit einem geringen Differenzierungsgrad (G3) wiesen signifikant die höchste Expressionsrate auf ($p < 0,001$).

Eine Akkumulation von **p53** lag in 21,2% der Fälle vor (Abbildung 3.1; B). Diese fand sich ausschließlich in invasiv duktalem Karzinomen mit LIC ($p = 0,011$) und hohem Grading ($p < 0,001$). Eine **p21-Überexpression** (Abbildung 3.1; C) wurde in 30,8% der Mammakarzinome nachgewiesen und korrelierte mit einem positiven Lymphknotenstatus ($p = 0,017$).

Cyclin D1 wurde in 21,5% der Tumoren überexprimiert (Abbildung 3.1; D). Es fand sich keine Korrelation mit den konventionellen pathomorphologischen Parametern ($p > 0,05$).

Zusätzlich wurden zwei Wachstumsfaktor-Rezeptoren vom Tyrosinkinasetyp, der **EGFR** und **HER-2/neu**, immunhistochemisch untersucht.

EGFR wurde in normalem Brustdrüsengewebe, Haut- und Hautanhangsgebilden und Stromazellen nachgewiesen. In Tumorzellen zeigte sich ein feingranuläres, membranöses Muster, das bezüglich der Verteilung und Intensität sehr inhomogen war (Abbildung 3.1; E). Bemerkenswert war, dass bei einigen Karzinomen die Tumorzellen, die EGFR-positiv waren, ausschließlich im Bereich der sogenannten Invasionsfront in der Tumorperipherie zu finden waren. Die EGFR-Expressionsrate lag bei 32,3%. Sie trat signifikant gehäuft in Karzinomen vom invasiv duktalem Typ mit LIC ($p = 0,038$) und in schlecht differenzierten Karzinomen (G3) auf ($p = 0,007$). Karzinome vom lobulären Typ waren alle EGFR-negativ.

Eine **HER-2/neu-Überexpression** (Score 3+) wurde in 11 von 66 Fällen (16,7%) nachgewiesen, wie in Abbildung 3.1; F zu sehen ist. Am häufigsten wurde HER-2/neu in Karzinomen vom duktalem Typ mit EIC überexprimiert ($p = 0,066$). Eine signifikante Assoziation zeigte sich mit dem Grading ($p = 0,014$).

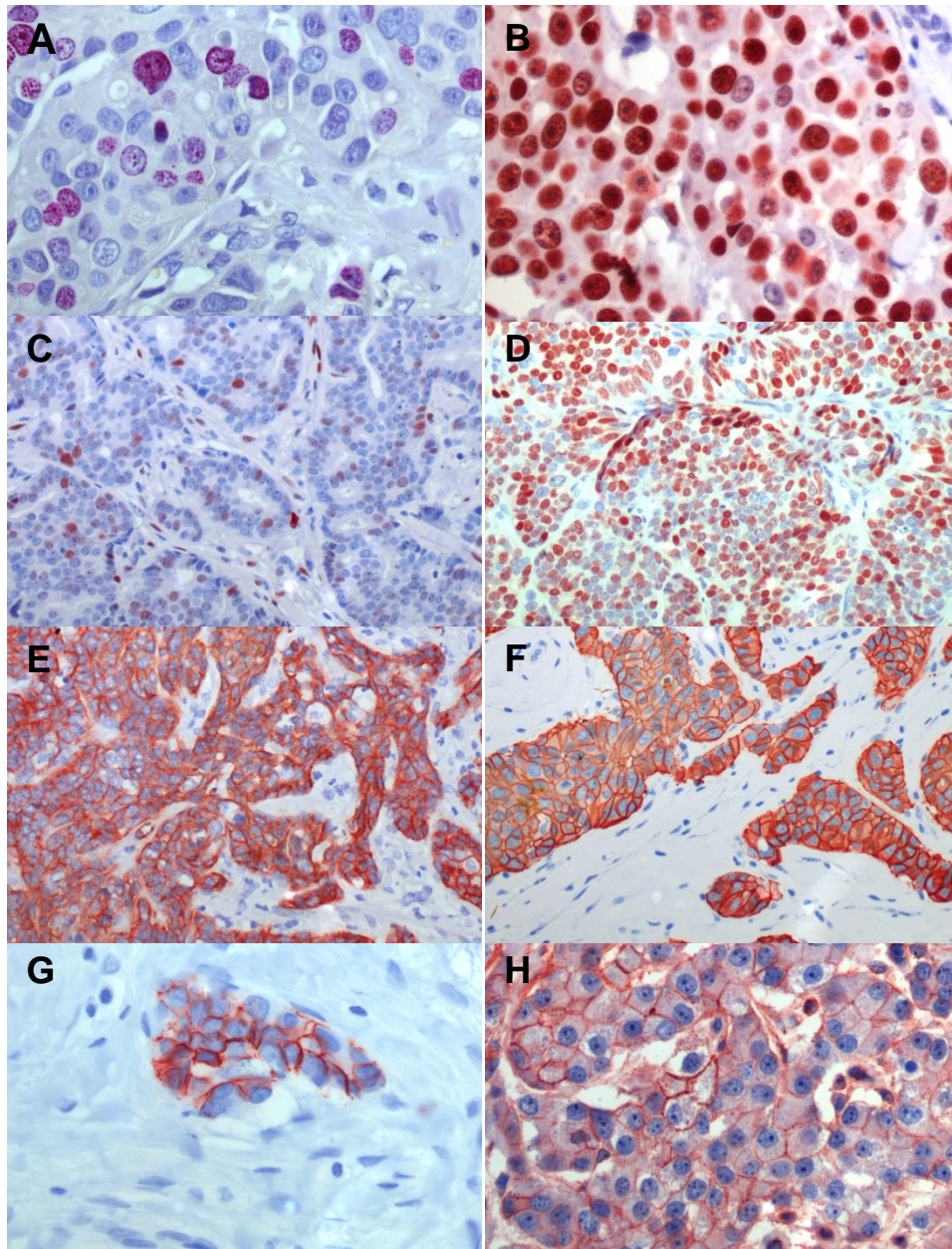
E-Cadherin, ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das an der Oberfläche von normalen Drüsenepithelien lokalisiert ist, wurde in 80,3% der Mammakarzinome exprimiert. Im Schnittpräparat stellte sich dieses als Wabenmuster dar (Abbildung 3.1; G). Die Positivitätsrate korrelierte mit dem Wachstumstyp ($p < 0,001$) und betrug 98% (48/49) für duktales Karzinome mit LIC, 100% (13/13) für duktales Karzinome mit EIC, 75% (9/12) für duktales Karzinome mit DGP und 0% (0/9) für lobuläre Karzinome. Die Expression von E-Cadherin an der Tumorzelloberfläche korrelierte außerdem signifikant mit dem Grading ($p = 0,007$).

β 1-Integrin wurde in normalem Brustdrüsengewebe im Myoepithel nachgewiesen, das unmittelbar an die Basalmembran angrenzt (Abbildung 3.1; H). In Tumorzellen wurde β 1-Integrin auch an Zell-Zell-Grenzen exprimiert. Im Schnittpräparat stellte sich dies als Honigwabenmuster dar. β 1-Integrin wurde in 90,9% der Mammakarzinome nachgewiesen. Es fand sich keine Korrelation mit den verschiedenen pathomorphologischen Parametern ($p > 0,05$).

In normalem Brustdrüsengewebe lag regelmäßig eine intakte periduktales **Kollagen-VI**-positive Basalmembran vor. Die immunhistochemische Bestimmung der Basalmembran-Komponente Kollagen IV in invasiven Mammakarzinomen ergab einen fast vollständigen Verlust der Basalmembran in 80% der Proben. Die Basalmembran war nur noch in Fragmenten in der Umgebung von Tumorzellgruppen nachweisbar. In invasiven Karzinomen mit einer extensiven intraduktalen Komponente (EIC) war eine nahezu intakte Basalmembran im Bereich der intraduktalen Tumorkomponente zu erkennen. Nur teilweise fanden sich fokale Lücken in der Kollagen-IV-positiven Basalmembran. In invasiv lobulären Karzinomen (ILC) wurde Kollagen IV im Trend am geringsten exprimiert ($p = 0,075$). Vergleiche hierzu

auch die Abbildung 3.2.

Abbildung 3.1: Immunhistochemischer Nachweis von Ki 67, p53, p21, Cyclin D1, EGFR, HER-2/neu, E-Cadherin und β 1-Integrin



A: Erhöhte Proliferationsaktivität mit positiver **Ki-67**-Immunreaktion in mehr als 10% der Tumorzellkerne

B: Starke Akkumulation von **p53** in einem invasiv duktalem Karzinom mit LIC in mehr als 40% der Tumorzellen

C und D: **p21**-Überexpression (C) und **Cyclin-D1**-Überexpression (D) mit Immunreaktion in

mehr als 10% der Tumorzellkerne

E: **EGFR**-Expression mit starker zirkulärer Immunreaktion im Bereich der Tumorzellmembranen

F: **HER-2/neu**-Überexpression (Score 3+) mit starker zirkulärer Immunreaktion im Bereich der Tumorzellmembranen

G: **E-Cadherin**-Expression in einem invasiv duktalem Karzinom mit charakteristischem Wabenmuster

H: **β 1-Integrin**-Expression in einem invasiv duktalem Karzinom

Vergrößerung: A, B, G und H: 200fach; C, D, E und F: 100fach

Tabelle 3.1: Korrelation zwischen Hormonrezeptoren und Faktoren der Zellproliferation sowie der Zelladhäsion in der invasiven Tumorkomponente und dem Tumortyp, histologischem Grad sowie pT- und pN-Status

	ER	PgR	p53	p21	Ki-67	Cyclin D1	EGFR	HER-2/ neu	β1- Integrin	E- Cadherin
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Histologischer Typ										
invasiv duktal mit LIC	26/41 (63,4)	17/41 (41,5)	13/41 (31,7)	15/41 (36,6)	29/41 (70,7)	7/41 (17,1)	17/41 (41,5)	8/41 (19,5)	36/41 (87,8)	38/39 (97,4)
invasiv duktal mit EIC	6/9 (66,7)	5/9 (55,6)	0/10 (0)	3/10 (30,0)	3/10 (30,0)	1/10 (10,0)	3/10 (30,0)	3/10 (30,0)	9/10 (90)	8/8 (100)
invasiv duktal mit DGP	8/9 (88,9)	6/9 (66,7)	0/9 (0)	3/9 (33,3)	4/9 (44,4)	3/9 (33,3)	1/9 (11,1)	0/9 (0)	9/9 (100)	6/9 (66,7)
invasiv lobulär	5/6 (83,3)	3/6 (50,0)	1/6 (16,7)	1/6 (16,7)	2/6 (33,3)	3/6 (50,0)	0/6 (0)	0/6 (0)	6/6 (100)	0/6 (0)
p < 0,05			0,011				0,038			< 0,001

Grading

G1	1/3 (33,3)	2/3 (66,7)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	3/3 (100)	1/1 (100)
G2	26/30 (86,7)	17/30 (56,7)	1/31 (3,2)	10/31 (32,3)	10/31 (32,3)	10/31 (32,3)	4/31 (12,9)	1/31 (3,2)	28/31 (90,3)	20/29 (69,0)
G3	18/32 (56,3)	12/32 (37,5)	13/32 (40,6)	10/32 (31,3)	28/32 (87,5)	4/32 (12,5)	16/32 (50,0)	9/32 (28,1)	29/32 (90,6)	31/32 (96,9)
p < 0,05	0,011		< 0,001		< 0,001		0,007	0,014		0,007

	ER	PgR	p53	p21	Ki-67	Cyclin D1	EGFR	HER-2/ neu	β1- Integrin	E- Cadherin
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
pT										
pT1	4/7 (57,1)	3/7 (42,9)	0/8 (0)	2/8 (25,0)	0/8 (0)	2/8 (25,0)	1/8 (12,5)	0/8 (0)	6/8 (75,0)	6/6 (100)
pT2	27/36 (75,0)	18/36 (50,0)	8/36 (22,2)	13/36 (36,1)	23/36 (63,9)	8/36 (22,2)	9/36 (25,0)	9/36 (25,0)	32/36 (88,9)	29/35 (82,9)
pT3	13/20 (65,0)	10/20 (50,0)	5/20 (25,0)	5/20 (25,0)	13/20 (65,0)	4/20 (20,0)	10/20 (50,0)	2/20 (10,0)	20/20 (100)	15/19 (78,9)
pT4	1/2 (50,0)	0/2 (0)	1/2 (50,0)	0/2 (0)	2/2 (100)	0/2 (0)	1/2 (50,0)	0/2 (0)	2/2 (100)	2/2 (100)
p < 0,05					0,002					

pN										
pN1	17/26 (65,4)	11/26 (42,3)	7/27 (25,9)	5/27 (18,5)	16/27 (59,3)	5/27 (18,5)	9/27 (33,3)	4/27 (14,8)	25/27 (92,6)	20/24 (83,3)
pN2	26/34 (76,5)	18/34 (52,9)	6/34 (17,6)	15/34 (44,1)	19/34 (55,9)	9/34 (26,5)	10/34 (29,4)	7/34 (20,6)	30/34 (88,2)	29/33 (87,9)
pN3	2/5 (40,0)	2/5 (40,0)	1/5 (20)	0/5 (0)	3/5 (60,0)	0/5 (0)	2/5 (40,0)	0/5 (0)	5/5 (100)	3/5 (60,0)
p < 0,05				0,017						
Gesamt	45/65 (69,2)	31/65 (47,1)	14/66 (21,2)	20/66 (30,3)	38/66 (57,6)	14/66 (21,2)	21/66 (31,8)	11/66 (16,7)	60/66 (90,9)	52/62 (83,9)

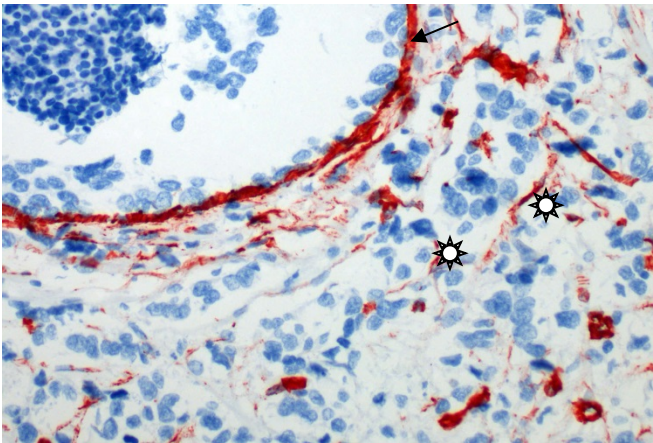


Abb. 3.2: Kollagen-IV-Expression in einem invasiven duktalem Karzinom mit EIC. Eine intakte Basalmembran umgibt die intraduktale Tumorkomponente (Pfeil). Kollagen-IV-positive Fragmente in der Umgebung invasiver Tumorzellkomplexe (Stern; 100fach).

3.1.2 Korrelationen der potenziell regulatorischen Proteine untereinander und mit der Zellproliferation

Ein **positiver ER-Status** korrelierte statistisch signifikant mit einem positiven PgR-Status ($p < 0,001$) und einer Cyclin-D1-Überexpression ($p = 0,003$). Alle Cyclin-D1-überexprimierenden Karzinome waren ER-positiv. Außerdem bestand im Trend eine Beziehung zwischen positivem ER-Status und p21-Überexpression ($p = 0,066$). Ein **negativer ER-Status** korrelierte signifikant mit einer EGFR-Expression ($p < 0,001$) und einer p53-Akkumulation ($p = 0,007$) sowie im Trend mit einer starken HER-2/neu-Überexpression ($p = 0,079$), während ein **negativer PgR-Status** nur mit einer EGFR-Expression ($p = 0,008$) statistisch signifikant verknüpft war.

Weitere signifikante Korrelationen zeigten sich zwischen der **EGFR-Expression** und der **p53-Akkumulation** ($p = 0,008$) sowie zwischen einem negativen EGFR-Status und einer Cyclin-D1-Überexpression ($p = 0,026$). **Kollagen-IV-** und **EGFR-Expression** korrelierten ebenfalls signifikant miteinander ($p = 0,025$). Außerdem war eine signifikante Abhängigkeit zwischen **Cyclin D1-** und **p21-Überexpression** zu beobachten ($p = 0,023$).

EGFR-Expression und **p53-Akkumulation** waren statistisch signifikant mit einer **erhöhten Proliferationsaktivität** verbunden ($p = 0,002$ und $p < 0,001$; siehe Tabelle 3.2). Karzinome mit HER-2/neu-Überexpression zeigten zwar tendenziell eine höhere Proliferationsaktivität, der Zusammenhang war aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,338$). Bei ER-negativen Mammakarzinomen war ein Trend zu einer höheren Proliferationsaktivität zu sehen als bei ER-positiven Karzinomen ($p = 0,071$).

Die Überexpression von Cyclin D1 und p21 korrelierte nicht mit der Proliferationsaktivität der invasiven Karzinome ($p > 0,05$).

Ein **E-Cadherin-Verlust** und eine niedrige Proliferationsaktivität waren signifikant miteinander assoziiert ($p = 0,037$).

Alle Karzinome mit erhöhter Proliferationsaktivität waren für mindestens einen der folgenden Marker positiv: ER, p53, EGFR oder HER-2/neu.

Tabelle 3.2: Korrelation der potenziell regulatorischen Proteine untereinander und mit der Proliferationsaktivität (n.s.= nicht signifikant)

	ER	PgR	P53	P21	Cyclin D1	EGFR	HER-2/neu	E-Cadherin	β1-Integrin	Ki-67
ER	–	p < 0,001	p = 0,007	n.s.	p = 0,003	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,071
PgR	p < 0,001	–	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,009	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p53	p < 0,007	n.s.	–	n.s.	n.s.	p = 0,008	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,001
p21	n.s.	n.s.	n.s.	–	p = 0,023	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cyclin D1	p = 0,003	n.s.	n.s.	p = 0,023	–	p = 0,026	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
EGFR	p < 0,001	p = 0,009	p = 0,008	n.s.	p = 0,026	–	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,003
HER-2/neu	p = 0,079	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	–	n.s.	n.s.	n.s.
E-Cadherin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	–	n.s.	p = 0,037
β1-Integrin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	–	n.s.
Ki 67	p = 0,071	n.s.	p < 0,001	n.s.	n.s.	p = 0,003	n.s.	p = 0,037	n.s.	–

3.1.3 MMPs

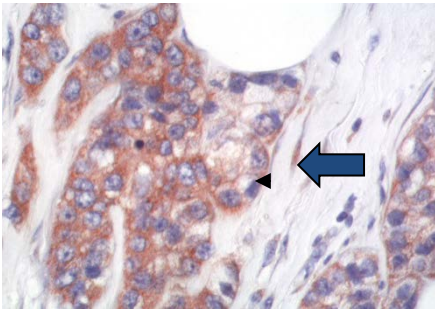
Bei der immunhistochemischen Untersuchung von MMP-2, -3 und -9 (siehe Abb. 3.3) wurde, genauso wie bei den TGF- β s, die Expression der invasiven und intraduktalen Tumorzellen sowie auch der peritumoralen Stromazellen für invasive und intraduktale Tumorkomponenten getrennt ausgewertet.

Um zunächst festzustellen, ob sich Tumor- und Normalgewebe hinsichtlich der MMP-2-, -3- und -9-Proteinexpression unterscheiden, wurde in 10 Fällen die Anzahl positiver Epithelzellen und umgebender Stromazellen des **Normalgewebes** quantifiziert und mit dem Prozentsatz positiver invasiver Karzinomzellen und peritumoraler Stromazellen verglichen (vgl. Tabelle 3.3). Dabei exprimierten statistisch signifikant mehr Karzinomzellen MMP-2-Protein als normale Epithelzellen ($p = 0,028$). MMP-3-Protein wurde in signifikant mehr Stromazellen des Normalgewebes als peritumoral nachgewiesen ($p = 0,022$). Weitere Unterschiede zwischen Normalgewebe und Karzinomzellen ergaben sich nicht. Der Vergleich zwischen **intraduktalen und invasiven Tumorzellen** ergab in erster Linie, dass MMP-2 und MMP-9 in mehr Stromazellen in der Nachbarschaft von invasiven Tumorzellen exprimiert wurde als in solchen, die sich in der Umgebung von intraduktalen Tumorzellen befanden. Dagegen war die Expression in intraduktalen Tumorzellen gegenüber invasiven erhöht. Die mittleren Prozentsätze können Tabelle 3.4 entnommen werden. Die Expression aller MMPs war in der **Tumorperipherie** im Vergleich zum Zentrum in invasiven Tumorzellen wie in peritumoralen Stromazellen signifikant erhöht ($p < 0,05$).

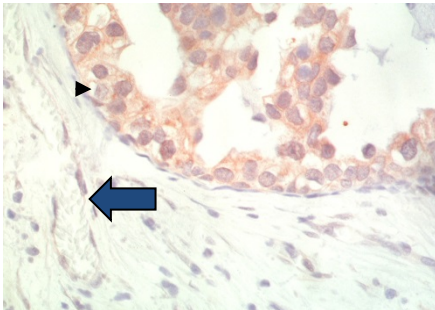
In Bezug auf den **histologischen Tumortyp** zeigten die invasiv lobulären Karzinome im Mittel die geringsten Prozentsätze MMP-9-positiver invasiver Karzinomzellen ($p=0,003$, vgl. Tabelle 3.5). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigte sich, dass in E-Cadherin-positiven Karzinomen signifikant mehr MMP-9-positive Tumorzellen nachweisbar waren als in E-Cadherin-negativen Karzinomen ($p = 0,002$). Bezogen auf den **Hormonrezeptorstatus** war der Anteil MMP-9-positiver Tumorzellen und peritumoraler Stromazellen in ER-positiven Karzinomen signifikant niedriger als in ER-negativen Karzinomen ($p = 0,016$ und $p = 0,007$). Korrelationen zwischen dem **PgR-Status**, dem **histologischen Grad**, der **Tumorgröße** oder dem **Lymphknotenbefall** und der Expression der analysierten MMPs bestanden nicht ($p > 0,05$). Es fand sich aber ein Zusammenhang zwischen der MMP-2-Expression in invasiven Karzinomzellen sowie peritumoralen Stromazellen und der Proliferationsaktivität ($p = 0,011$ und $p = 0,047$).

Zwischen Kollagen IV und den MMPs konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

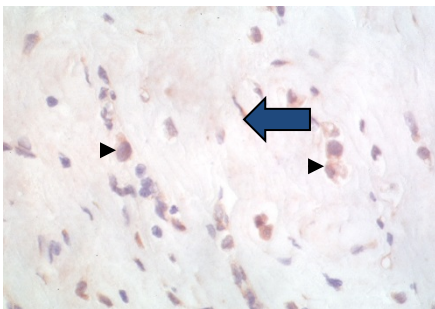
Abb. 3.3: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2, MMP-3 und MMP-9



MMP-2-Proteinexpression in der invasiven Komponente eines invasiv duktales Karzinoms mit LIC. MMP-2 war in nahezu allen Tumorzellen (Pfeilspitze) und dem Großteil der peritumoralen Stromazellen (Pfeil) nachweisbar.



MMP-3-Proteinexpression in der intraduktalen Komponente eines invasiv duktales Karzinoms mit EIC. MMP-3 war in nahezu allen intraduktalen Tumorzellen (Pfeilspitze), aber nur in einzelnen peritumoralen Stromazellen (Pfeil) nachweisbar.



MMP-9-Proteinexpression in einem invasiv lobulären Karzinom. MMP-9 ist nicht regelmäßig in den invasiven Tumorzellen (Pfeilspitzen) und nur in einem kleineren Teil der peritumoralen Stromazellen (Pfeil) nachweisbar.

Tabelle 3.3: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2, -3- und -9-Protein im Normalgewebe (Prozentsatz positiver Zellen Mittelwert [MW] ± Standardabweichung [SD]).

	MMP-2 Epithelzellen	MMP-2 Stromazellen	MMP-3 Epithelzellen	MMP-3 Stromazellen	MMP-9 Epithelzellen	MMP-9 Stromazellen
Gesamt	71,08 ± 21,57	34,03 ± 21,79	84,78 ± 9,47	55,63 ± 19,77	81,74 ± 14,66	49,92 ± 28,99

Tabelle 3.4: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2, -3- und -9-Protein in 66 invasiven Mammakarzinomen mit einer auswertbaren intraduktalen Tumorkomponente in 40 Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW ± SD).

Tumorzellen	MMP-2		MMP-3		MMP-9						
	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen					
	p-Wert*	p-Wert*	p-Wert*	p-Wert*	p-Wert*	p-Wert*					
Invasive Tumorkomponente											
peripher 88,22 ± 11,93	0,002	62,50 ± 27,50	0,024	91,68 ± 7,12	< 0,001	53,23 ± 28,41	< 0,001	83,24 ± 15,76	0,014	54,57 ± 29,63	< 0,001
zentral 84,07 ± 17,16		58,43 ± 30,38		85,54 ± 13,89		40,11 ± 29,58		74,81 ± 21,53		42,21 ± 31,21	
gesamt 86,88 ± 13,16	0,002	60,83 ± 27,22	0,005	88,68 ± 9,28	0,005	47,64 ± 26,70	0,005	80,50 ± 15,37	0,005	49,60 ± 26,25	0,005
intraduktale Tumorkomponente		52,73 ± 34,18		93,89 ± 8,75		54,48 ± 34,27		82,77 ± 17,72		45,20 ± 27,87	
Gesamt											

*p < 0,05

Tabelle 3.5: Korrelation zwischen der immunhistochemischen MMP-Expression in der invasiven Tumorkomponente und pathomorphologischen Parametern in 65 Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)

	MMP-2		MMP-3		MMP-9	p-Wert*
	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen
Histologischer Typ						
invasiv duktales Karzinom mit LIC (n = 41)	88,95 \pm 10,25	62,14 \pm 27,82	89,20 \pm 8,88	52,58 \pm 27,86	85,81 \pm 11,27	0,003
invasiv duktales Karzinom mit EIC (n = 9)	91,56 \pm 4,76	60,37 \pm 22,08	89,66 \pm 7,28	34,81 \pm 19,86	83,00 \pm 16,69	
invasiv duktales Karzinom mit DGP (n = 9)	81,34 \pm 18,92	54,80 \pm 29,90	90,36 \pm 11,19	39,87 \pm 26,87	73,89 \pm 14,01	
invasiv lobuläres Karzinom (n = 6)	74,54 \pm 21,25	62,39 \pm 31,00	81,22 \pm 10,40	45,60 \pm 23,23	56,30 \pm 11,83	
E-Cadherin						
negativ (n = 10)	77,31 \pm 20,22	50,19 \pm 29,62	83,86 \pm 12,29	40,26 \pm 22,61	65,96 \pm 15,58	0,002
positiv (n = 52)	88,38 \pm 11,03	62,58 \pm 27,12	89,87 \pm 8,45	49,37 \pm 27,71	83,50 \pm 13,64	

Grading

G1 (n = 3)	87,67 ± 13,20	39,85 ± 50,23	88,08 ± 10,59	39,14 ± 21,61	87,49 ± 5,64	56,65 ± 35,85
G2 (n = 30)	84,92 ± 15,12	58,94 ± 26,86	90,09 ± 8,25	43,00 ± 24,71	76,96 ± 16,13	42,43 ± 25,56
G3 (n = 32)	88,59 ± 11,35	63,93 ± 26,54	87,36 ± 10,18	52,95 ± 28,61	83,74 ± 15,54	56,79 ± 25,43

MMP-2**MMP-3****MMP-9**

pT	MMP-2		MMP-3		MMP-9	
	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen p-Wert*	Stromazellen p-Wert*
pT1 (n = 7)	84,90 ± 8,30	54,48 ± 40,81	88,38 ± 10,85	42,70 ± 22,76	85,38 ± 11,29	68,75 ± 25,47
pT2 (n = 36)	86,96 ± 15,05	63,29 ± 27,43	88,69 ± 9,23	50,62 ± 29,43	79,30 ± 16,80	48,29 ± 27,22
pT3 (n = 20)	87,86 ± 11,58	59,72 ± 23,84	89,11 ± 9,71	42,24 ± 23,12	81,19 ± 14,63	44,48 ± 24,28
pT4 (n = 2)	81,09 ± 2,03	46,74 ± 34,27	85,39 ± 3,55	24,60 ± 17,25	84,00 ± 8,13	66,87 ± 13,96

pN

pN0 (n = 26)	81,93 ± 18,31	57,19 ± 30,84	86,94 ± 10,59	51,50 ± 28,35	79,04 ± 16,78	49,22 ± 27,22
pN1 (n = 34)	89,84 ± 8,05	60,63 ± 25,35	89,99 ± 8,48	43,03 ± 26,05	81,15 ± 14,56	48,42 ± 25,48
pN2 (n = 5)	89,70 ± 4,98	82,55 ± 9,02	88,43 ± 7,48	59,64 ± 18,81	82,27 ± 17,42	57,34 ± 31,47

Hormonrezeptorstatus

ER-negativ (n = 20)	89,54 ± 7,62	61,54 ± 27,55	88,57 ± 8,88	49,98 ± 26,21	86,84 ± 8,61	64,49 ± 23,36
ER-positiv (n = 46)	85,80 ± 14,78	60,54 ± 27,41	88,72 ± 9,54	46,64 ± 27,14	77,79 ± 16,88	43,22 ± 25,08
PgR-negativ (n = 34)	87,26 ± 13,89	62,58 ± 27,40	88,72 ± 9,30	50,08 ± 26,41	83,96 ± 13,39	54,55 ± 26,69
PgR-positiv (n = 32)	86,46 ± 12,55	58,90 ± 27,39	88,63 ± 9,40	45,03 ± 27,20	76,75 ± 16,75	44,24 ± 25,22

Comparison between ER-negativ and ER-positiv: $p = 0,016$
 Comparison between ER-negativ and PgR-positiv: $p = 0,007$

- $p < 0,05$
- In einem Fall eines invasiv duktales Karzinoms mit EIC war die invasive Komponente nicht auswertbar, deswegen nur 65 Fälle

3.1.4 Vaskularisation (CD31)

Zum Nachweis der tumorassoziierten Angiogenese wurde die immunhistochemische Lokalisation von CD31 auf Gefäßendothelien durchgeführt (Abbildung 3.4). Die Auswertung erfolgte in Anlehnung an Fox et al. (1993).

Nach morphometrischer Auswertung der Gefäßdichte zeigte sich, dass im Tumorstroma deutlich mehr kapilläre Gefäße vorhanden waren als im Normalgewebe ($p < 0,05$). Die Gefäßdichte lag im Mittel bei $94,22/\text{mm}^2 \pm 27,87$.

Wurde die Gefäßdichte zwischen den einzelnen Tumortypen verglichen, so fanden sich einige Unterschiede. Die invasiv lobulären und die duktaalen Karzinome mit EIC zeigten die größte Gefäßdichte mit $110,34/\text{mm}^2 (\pm 20,65)$ und $101,00/\text{mm}^2 (\pm 21,61)$, gefolgt von den duktaalen Karzinomen mit LIC mit einer Gefäßdichte von $93,28/\text{mm}^2 (\pm 29,85)$. Die geringste Gefäßdichte mit $80,21 (\pm 24,21)$ kapillären Gefäßen pro mm^2 hatten die diffus wachsenden duktaalen Karzinome (DGP). G1-Tumoren wiesen eine höhere Gefäßdichte auf ($120,70/\text{mm}^2 \pm 22,60$) als G3-Tumoren ($91,97/\text{mm}^2 \pm 29,36$). Die Unterschiede waren aber nicht signifikant.

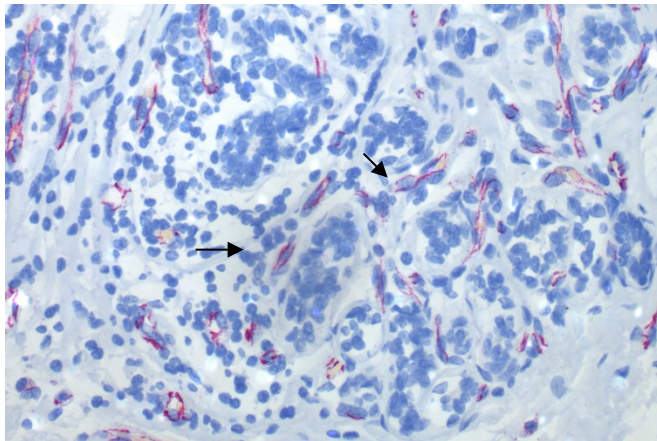


Abb.3.4:
CD31-
Immunhistochemie zur
Darstellung der
Tumorvaskularisation

3.2 TGF- β s

3.2.1 Lokalisation und morphometrische Analyse der TGF- β s in humanen

Mammakarzinomen

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der immunhistochemischen Untersuchung der TGF- β s.

Zur Frage, ob sich Tumor- und Normalgewebe hinsichtlich der TGF- β 1-, -2- und -3-Proteinexpression systematisch unterscheiden, wurde in 10 Fällen der Prozentsatz positiver Epithelzellen und umgebender Stromazellen im **Normalgewebe** quantifiziert (vgl. Tabelle 3.6; B) und mit dem Prozentsatz positiver Karzinomzellen und peritumorale Stromazellen verglichen.

Im Normalgewebe sind sowohl luminale (sekretorische Zellen) als auch basale myoepitheliale Zellen markiert. Ebenfalls positiv reagieren umliegende Stroma-Fibroblasten, zahlreiche Endothelzellen kleiner kapillärer Gefäße, gelegentlich eingestreute Histiozyten und Plasmazellen. Tendenziell exprimieren mehr normale Epithelzellen als invasive Karzinomzellen die TGF- β s, wobei aber intraduktale Karzinomzellen häufiger TGF- β -positiv sind. Im Gegensatz dazu sind mehr Tumorstromazellen der invasiven Komponente TGF- β -positiv als Stromazellen des Normalgewebes. Dagegen exprimieren weniger Stromazellen in der Umgebung der intraduktalen Tumorkomponente TGF- β s als im Normalgewebe. Dieser Unterschied ist aber nur für TGF- β 1 signifikant ($p = 0,018$) (siehe auch Tabelle 3.6 A+B).

Alle drei TGF- β s korrelieren in der invasiven und intraduktalen Tumorkomponente wie auch im peritumoralen Stromazellen untereinander ($p < 0,05$).

Zur Frage, ob der **Abstand** zwischen Tumor- und Normalgewebe Einfluss auf die TGF- β -Expression in Stroma- und Tumorzellen (invasiv und intraduktal) hat, wurden explorativ 10 Fälle untersucht. Es ergab sich eine durchschnittliche Entfernung von 4,19mm für invasive Tumoreareale und von 2,53mm für intraduktale Tumoreareale zum Normalgewebe. Eine Korrelation zwischen der TGF- β -Expression und dem ermittelten Abstand lag lediglich für TGF- β 1 und TGF- β 3 im DCIS-Anteil vor ($p = 0,018$ und $p = 0,043$).

Die Expression von TGF- β 1 und TGF β 2 war in der **Tumorperipherie** im Vergleich zum Tumorzentrum signifikant erhöht ($p < 0,05$). Dies galt sowohl für invasive Karzinomzellen als auch für peritumorale Stromazellen. Bei allen drei TGF- β s war die Expression in den **intraduktalen** Karzinomzellen signifikant höher als in den invasiven Karzinomzellen ($p < 0,001$; vgl. Tabelle 3.6). Die TGF- β -Expression der peritumoralen Stromazellen verhielt sich genau umgekehrt. Es fanden sich in der Umgebung der intraduktalen Tumorteilkomponente signifikant weniger TGF- β 1- und - β 3-positive Stromazellen als in

der Nachbarschaft invasiver Tumorzellen ($p < 0,001$; vgl. Tabelle 3.6). Die Korrelation der TGF- β -Expression mit dem **histologischen Tumortyp** zeigte, dass die invasiv lobulären Karzinome im Mittel die geringsten Prozentsätze TGF- β 3-positiver Tumorzellen aufwiesen ($p = 0,013$). Die anderen drei histologischen Tumortypen (invasiv duktaler Typ mit LIC, mit EIC und mit DGP) zeigten ähnlich hohe Expressionsraten. In allen vier histologischen Typen waren weniger Stromazellen als Tumorzellen TGF- β 1,- β 2 und - β 3-positiv.

Bezogen auf den **Hormonrezeptorstatus** war der Prozentsatz TGF- β 2-positiver peritumoraler Stromazellen in PgR-negativen Karzinomen signifikant höher als in PgR-positiven Karzinomen, $p = 0,012$ (vgl. Abbildung 3.5 und Tabelle 3.7). Im Trend verhält es sich für die ER-positiven und -negativen Karzinome ähnlich. Der Unterschied war aber nicht signifikant ($p > 0,05$).

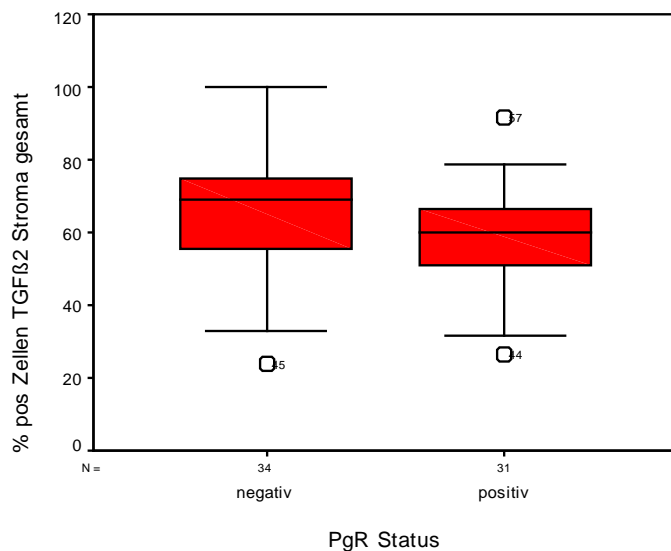
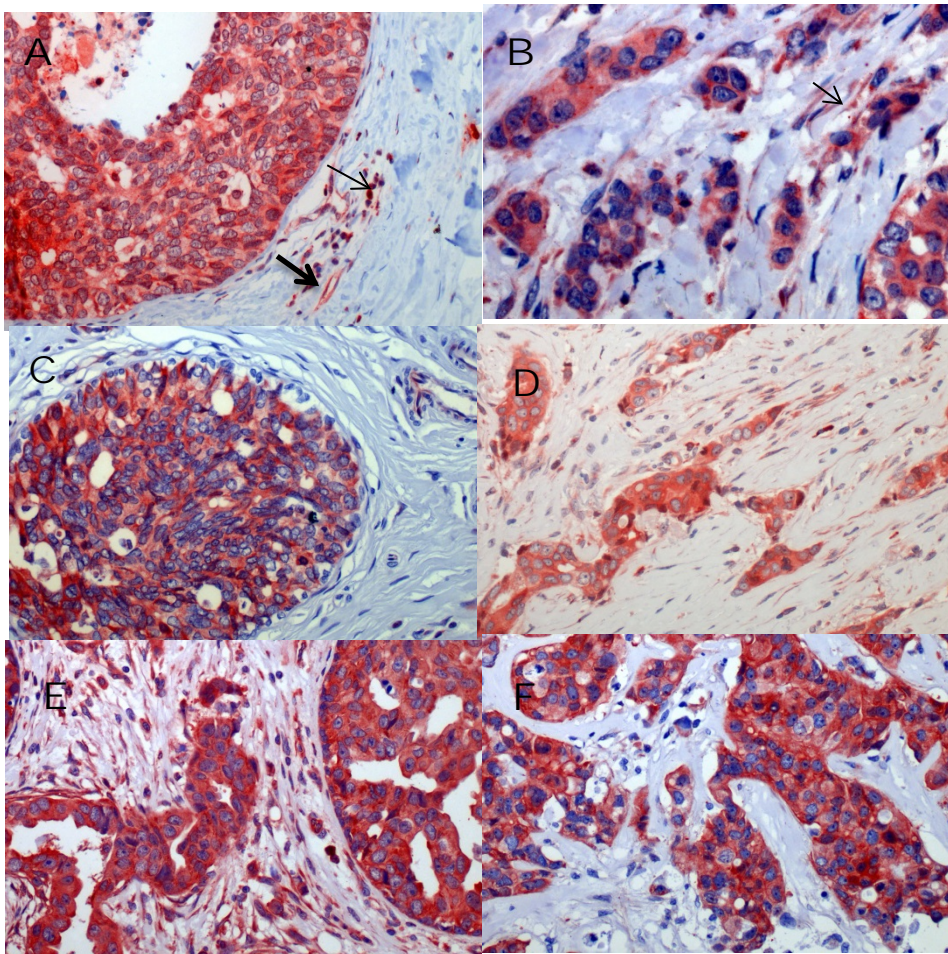


Abbildung 3.5: Immunhistochemische TGF- β 2-Expression in peritumoralen Stromazellen bezogen auf den PgR-Status.

Box and whisker plots: Die Box wird vom ersten und dritten Quartil begrenzt, das heißt, in der Box sind 50% der Werte erhalten. Die innere Linie einer Box repräsentiert den Median. Ferner werden kleinste und größte Werte markiert, sofern sie keine Ausreißer sind.

Es zeigte sich ein signifikant höherer Anteil TGF- β 2-positiver peritumoraler Stromazellen in PgR-negativen als in PgR-positiven Karzinomzellen ($p = 0,012$).

Weder der Prozentsatz positiver Tumorzellen noch der Prozentsatz positiver Stromazellen korrelierte für TGF- β 1, - β 2 oder - β 3 mit dem **histologischen Grading**, der **Tumorgröße** oder dem **Lymphknotenbefall** ($p > 0,05$).

Abbildung 3.6: Immunhistochemischer Nachweis von TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3

A: TGF- β 1-positive-intraduktale Tumorzellen mit positiven Endothelzellen (dicker Pfeil) und Stromazellen (dünner Pfeil)

B: TGF- β 1-positive invasive Tumorzellen mit überwiegend positiven Stromazellen (Pfeil)

C: TGF- β 2-positiver intraduktaler Tumorzellkomplex mit negativen Fibroblasten und positiven Endothelien

D: TGF- β 2-positive invasive Tumorzellkomplexe mit reichlich positiven peritumoralen Stromazellen

E: TGF- β 3-positive invasive und intraduktale Tumorzellen mit stark positiven peritumoralen Stromazellen.

F: TGF- β 3-positive invasive Tumorzellen mit nur wenigen positiven Stromazellen

Tabelle 3.6: Immunhistochemischer Nachweis von TGF-β1, -β2 und -β3 in 64* Fällen eines invasiven Mammakarzinoms mit Bewertung der intraduktalen Komponente in 36 Fällen und des Normalgewebes in 10 Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW ± SD)

Tumorzellen	TGF-β1		TGF-β2		TGF-β3				
	Stromazellen	p*	Tumorzellen	p*	Stromazellen	p*			
A. invasive Tumorkomponente									
peripher 90,93 ± 11,17	} 0,026	} < 0,001	} 88,06 ± 9,0	} 0,009	} 0,004	} 87,42 ± 13,96			
zentral 85,34 ± 21,95							57,89 ± 24,21	65,55 ± 17,95	70,88 ± 26,14
Gesamt 89,91 ± 12,20							46,39 ± 24,76	83,54 ± 13,13	86,95 ± 11,08
intraduktale Komponente	} 0,001	} < 0,001	} < 0,001	} 62,05 ± 15,83	} 87,05 ± 11,86	} 68,82 ± 25,21			
Gesamt 94,45 ± 8,09							57,35 ± 28,91	86,59 ± 9,15	51,65 ± 35,88
							37,20 ± 20,74	93,22 ± 10,81	93,47 ± 11,26
B. Normalgewebe									
TGF-β1			TGF-β2			TGF-β3			
Epithelzellen	Stromazellen		Epithelzellen	Stromazellen		Stromazellen			
Gesamt 91,80 ± 7,23	} 0,018		87,59 ± 13,03	} 0,043		57,55 ± 24,40			
	47,89 ± 12,54		53,12 ± 18,91	91,50 ± 7,76					

Tabelle 3.7: Korrelation zwischen der TGF- β -Expression in der invasiven Tumorkomponente und pathomorphologischen Parametern in 64* Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)

	TGF- β 1		TGF- β 2		TGF- β 3		
	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	
histologischer Typ						p-Wert**	
intraduktal mit LIC (n = 41)	91,64 \pm 8,32	55,46 \pm 23,84	87,95 \pm 6,68	60,55 \pm 15,04	87,84 \pm 11,22	0,013	71,84 \pm 22,24
invasiv duktal mit EIC (n = 10)	90,67 \pm 6,54	47,76 \pm 14,26	87,72 \pm 10,11	66,15 \pm 10,89	90,95 \pm 10,46		71,18 \pm 31,72
invasiv duktal mit DGP (n = 9)	91,17 \pm 7,29	61,38 \pm 24,91	87,67 \pm 9,02	64,75 \pm 20,88	88,70 \pm 10,24		62,08 \pm 28,21
invasiv lobulär (n = 6)	75,38 \pm 30,01	47,58 \pm 18,85	73,97 \pm 14,51	62,07 \pm 21,23	73,39 \pm 13,68		54,70 \pm 29,75
Grading							
G1 (n = 3)	98,34 \pm 0,47	73,63 \pm 29,88	88,83 \pm 6,90	64,89 \pm 18,03	94,99 \pm 3,47		73,18 \pm 29,52
G2 (n = 31)	88,29 \pm 15,21	53,46 \pm 20,24	83,93 \pm 11,11	60,61 \pm 17,12	84,96 \pm 12,11		67,11 \pm 25,72
G3 (n = 32)	90,90 \pm 8,83	54,22 \pm 24,20	88,87 \pm 6,46	63,13 \pm 14,78	88,27 \pm 11,85		70,00 \pm 25,11
pT							
pT1 (n = 8)	91,31 \pm 8,30	53,57 \pm 24,07	86,26 \pm 5,85	60,12 \pm 8,91	92,40 \pm 4,16		76,82 \pm 20,62
pT2 (n = 36)	89,82 \pm 14,71	58,63 \pm 20,00	86,98 \pm 9,69	64,51 \pm 14,58	86,14 \pm 12,35		68,47 \pm 26,30
pT3 (n = 20)	90,16 \pm 8,27	49,29 \pm 25,92	86,03 \pm 9,88	58,15 \pm 19,81	86,86 \pm 13,19		67,20 \pm 26,14
pT4 (n = 2)	84,85 \pm 9,08	34,14 \pm 5,22	86,26 \pm 2,16	63,52 \pm 11,15	86,45 \pm 3,95		63,28 \pm 18,92

pN						
pN0 (n = 27)	91,01 ± 8,20	53,80 ± 23,17	87,49 ± 7,99	65,05 ± 15,71	87,74 ± 12,80	73,09 ± 24,89
pN1 (n = 34)	89,13 ± 15,24	55,19 ± 22,92	86,40 ± 10,36	59,01 ± 16,33	86,91 ± 11,99	66,64 ± 26,45
pN2 (n = 5)	89,75 ± 3,51	52,95 ± 18,94	83,24 ± 6,02	67,04 ± 10,15	84,49 ± 3,50	61,41 ± 17,07

**p < 0,05

*In einem Fall eines invasiv duktales Karzinoms mit LIC und eines mit EIC war die invasive Komponente nicht auswertbar.

Tabelle 3.7, Fortsetzung

Tumorzellen	TGF-β1		TGF-β2		TGF-β3	
	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen
Hormonrezeptorstatus						
ER-negativ (n = 20)	89,74 ± 9,16	60,82 ± 40,61	89,50 ± 5,72	65,99 ± 13,02	88,82 ± 7,68	72,38 ± 18,48
ER-positiv (n = 45)	89,99 ± 13,45	55,78 ± 22,09	85,29 ± 10,11	60,30 ± 16,77	86,27 ± 13,30	67,23 ± 27,72
PgR-negativ (n = 34)	88,15 ± 15,88	57,78 ± 34,21	88,22 ± 8,44	66,01 ± 16,59	} 0,012	72,99 ± 22,32
PgR-positiv (n = 31)	91,91 ± 5,34	56,88 ± 22,00	84,80 ± 9,70	57,70 ± 13,96		85,56 ± 14,99

**p < 0,05

3.2.2 Zusammenhang von TGF- β -Proteinexpression, der Proliferationsaktivität (Ki-67) den regulatorischen Proteinen p53, p21 und Cyclin D1 und den Rezeptoren der HER-Familie

Ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Proliferationsaktivität (Ki-67) und der Proteinexpression der TGF- β s konnte nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

Die **p53-Akkumulation** war mit einer erhöhten TGF- β 1-Proteinexpression in den intraduktalen Tumorzellen ($p = 0,003$) sowie in den invasiven Tumorzellen ($p = 0,034$) assoziiert. Der Prozentsatz invasiver Karzinomzellen mit TGF- β 1- und TGF- β 3-Expression korrelierte mit einer **p21-Überexpression** ($p = 0,049$ und $p = 0,040$) (vgl. Tabelle 3.8 und Abbildung 3.7).

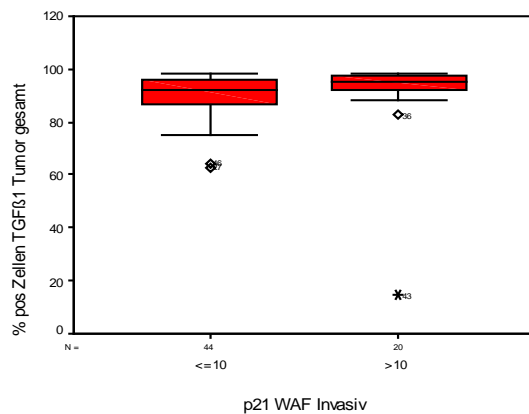


Abbildung 3.7: Zusammenhang zwischen der TGF- β 1-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente und der p21-Überexpression ($p = 0,049$).

Die Expression von TGF- β 2-positiven peritumoralen Stromazellen ($p = 0,010$) sowie von TGF- β 3 in invasiven Tumorzellen ($p = 0,007$) war invers mit einer **Cyclin D1-Überexpression** verbunden. Vergleiche Tabelle 3.8 und die Abbildungen 3.8 und 3.9.

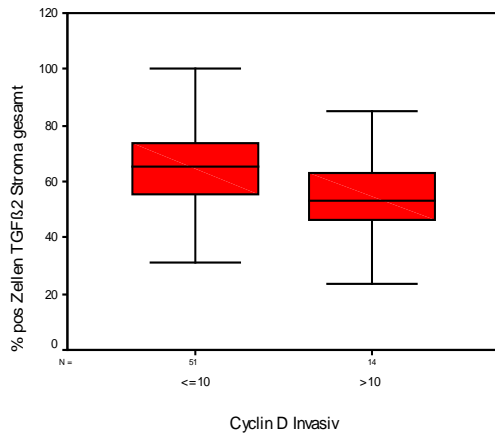


Abbildung 3.8: Inverser Zusammenhang der TGF-β2-Proteinexpression des invasiven peritumoralen Stromagewebes mit der Cyclin-D1-Überexpression (p = 0,01).

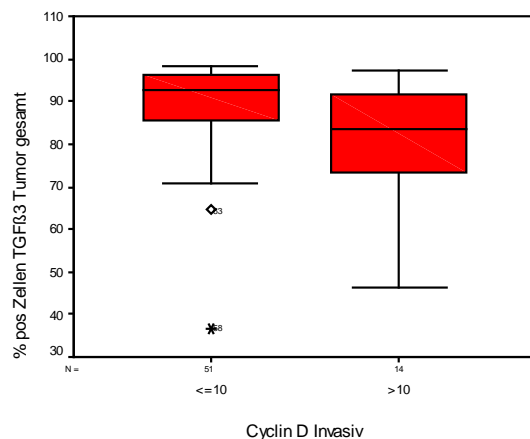


Abbildung 3.9: Inverser Zusammenhang von TGF-β3-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente und Cyclin-D1-Überexpression (p = 0,007).

Ein Zusammenhang zwischen einer EGFR-Expression und der Proteinexpression der TGF-βs wurde nicht nachgewiesen ($p > 0,05$).

Die **HER-2/neu-Überexpression** korrelierte signifikant mit dem Anteil an TGF-β1- und TGF-β2-positiver invasiver Tumorzellen ($p = 0,043$ und $p = 0,002$) sowie im Trend mit dem Prozentsatz TGF-β1-positiver peritumoraler Stromazellen ($p = 0,059$) (vgl. Tabelle 3.8 und die Abbildungen 3.10 und 3.11).

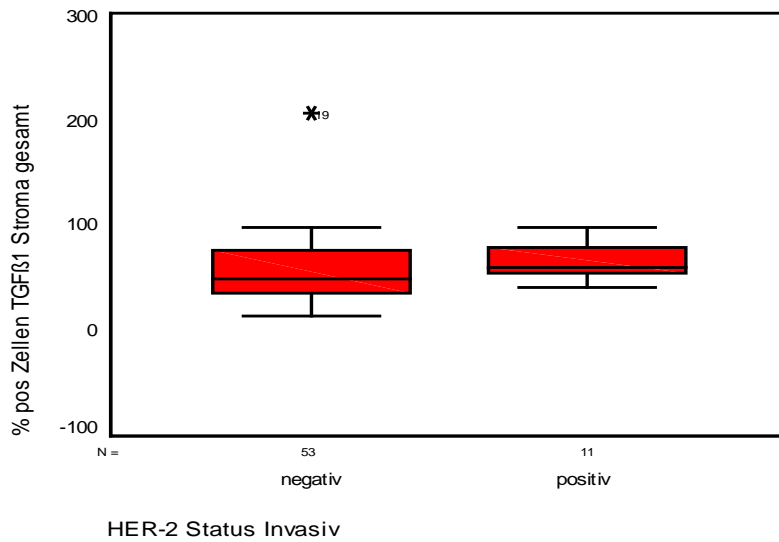


Abbildung 3.10: Zusammenhang von TGF- β 1-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente und HER-2/neu-Überexpression ($p = 0,043$)

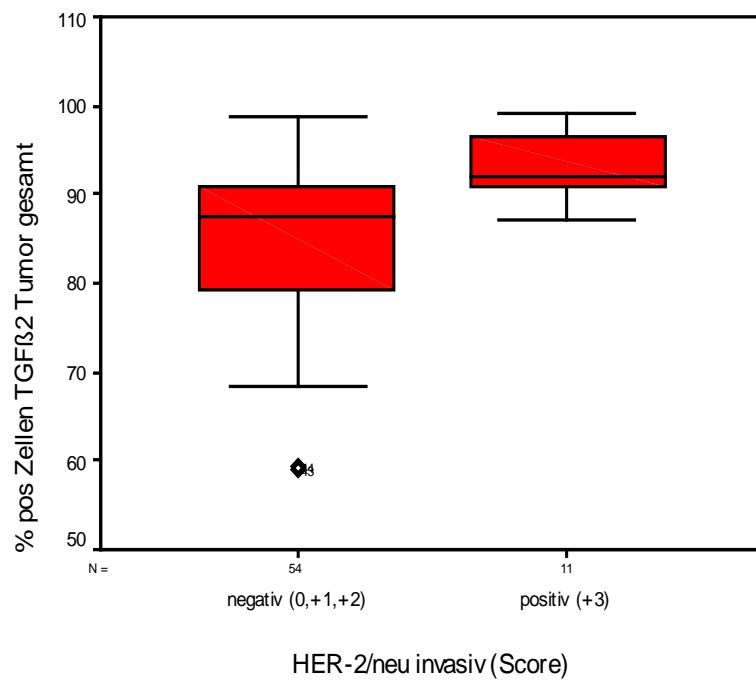


Abbildung 3.11: Zusammenhang der TGF- β 2-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente mit der HER-2/neu-Überexpression ($p = 0,002$)

Tabbelle 3.8: Korrelation zwischen TGF- β -Proteinexpression und Regulatoren der Zellproliferation sowie der Proliferationsaktivität (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)

	TGF- β 1		TGF- β 2		TGF- β 3	
	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen
	p*		p*		p*	
Ki-67 (n = 65)						
≤ 10 (n = 27)	91,66 \pm 6,55	56,24 \pm 21,35	86,28 \pm 10,23	61,19 \pm 18,89	88,23 \pm 11,85	64,04 \pm 30,63
> 10 (n = 38)	88,72 \pm 14,86	53,26 \pm 23,34	86,81 \pm 8,44	62,66 \pm 13,49	86,22 \pm 11,95	72,21 \pm 20,28
p53 (n = 66)						
≤ 40 (n = 50)	89,55 \pm 12,96	59,70 \pm 30,44	86,38 \pm 9,60	62,55 \pm 15,87	87,73 \pm 10,83	69,33 \pm 26,44
> 40 (n = 16)	91,19 \pm 9,28	48,97 \pm 21,48	87,36 \pm 7,58	60,23 \pm 16,17	84,59 \pm 15,27	66,96 \pm 20,83
p21 (n = 65)						
≤ 10 (n = 42)	89,69 \pm 8,36	56,39 \pm 31,75	86,09 \pm 8,80	63,28 \pm 16,90	85,50 \pm 13,46	68,24 \pm 25,74
> 10 (n = 23)	90,40 \pm 18,31	59,47 \pm 21,99	87,71 \pm 10,05	59,27 \pm 13,08	90,56 \pm 5,96	70,12 \pm 24,55

Cyclin D1 (n= 66)

≤ 10 (n = 51)	91,11 ± 8,28	56,47 ± 23,62	88,11 ± 7,35	64,50 ± 15,10	} 0,010	89,03 ± 10,56	} 0,007	70,69 ± 25,95
> 10 (n = 14)	85,65 ± 20,93	47,32 ± 16,27	81,04 ± 12,75	53,10 ± 15,75		79,80 ± 13,83		62,00 ± 23,78

EGFR (n = 65)

0 (n = 44)	89,17 ± 13,52	55,37 ± 21,96	84,95 ± 10,08	60,44 ± 15,56	86,25 ± 13,91	66,41 ± 26,95
> 0 (n = 21)	91,43 ± 9,01	52,63 ± 23,81	90,03 ± 5,59	65,42 ± 16,26	88,75 ± 8,44	73,87 ± 20,77

HER- 2/neu (n = 65)

negativ (Score 0, 1+ und 2+)	88,96 ± 13,04	} 0,043	55,51 ± 30,49	85,18 ± 9,31	} 0,002	61,14 ± 16,13	86,44 ± 12,40	67,77 ± 24,57
positiv (Score 3+)	94,51 ± 5,06		66,26 ± 18,10	93,49 ± 3,69		66,50 ± 14,11	90,07 ± 8,56	73,97 ± 28,83

*p < 0,05

Tabelle 3.9: Korrelation zwischen TGF- β -Proteinexpression und Faktoren der Zelladhäsion in der invasiven Tumorkomponente in 64* Fällen eines Mammakarzinoms (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)

	TGF- β 1		TGF- β 2		TGF- β 3		p**
	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	Tumorzellen	Stromazellen	
E-Cadherin							
negativ (n = 10)	82,39 \pm 24,81	58,93 \pm 24,18	82,25 \pm 15,44	70,66 \pm 20,89	80,86 \pm 15,07	54,81 \pm 32,02	
positiv (n = 53)	91,15 \pm 7,82	53,84 \pm 22,63	87,53 \pm 7,33	60,99 \pm 13,42	88,45 \pm 10,	71,44 \pm 22,87	
β1-Integrin							
negativ (n = 6)	93,36 \pm 6,49	65,13 \pm 18,32	88,29 \pm 7,82	59,89 \pm 7,23	92,75 \pm 3,48	87,92 \pm 12,22	} 0,03
positiv (n = 60)	89,56 \pm 12,63	53,37 \pm 22,66	86,42 \pm 9,32	62,27 \pm 16,48	86,48 \pm 12,26	66,87 \pm 25,43	
Kollagen IV							
< 10 (n = 48)	91,98 \pm 6,72	55,97 \pm 21,76	86,48 \pm 8,80	59,99 \pm 16,18	86,25 \pm 13,12	66,83 \pm 27,86	
10-50 (n = 12)	81,59 \pm 23,16	47,49 \pm 25,87	86,46 \pm 12,19	69,19 \pm 14,39	89,78 \pm 8,11	74,76 \pm 15,62	
50-80 (n = 3)	95,06 \pm 3,35	59,37 \pm 25,44	89,78 \pm 4,55	67,85 \pm 10,85	87,47 \pm 4,80	70,69 \pm 18,01	
> 80 (n = 0)	☼	☼	☼	☼	☼	☼	

**p < 0,05, ☼ keine Fälle; * In einem Fall eines invasiv duktales Karzinoms mit LIC und eines mit EIC war die invasive Komponente nicht auswertbar.

3.2.3 Zusammenhang von TGF- β -Proteinexpression und den Faktoren der Zelladhäsion E-Cadherin , β 1-Integrin und Kollagen IV

Ein Zusammenhang zwischen E-Cadherin- und TGF- β -Proteinexpression wurde nicht festgestellt ($p > 0,05$).

Der Prozentsatz TGF- β -positiver Tumor- wie Stromazellen war generell höher, wenn die Tumorzellen kein **β 1-Integrin** exprimierten (vgl. Tabelle 3.9 und Abbildung 3.12). Dieser Unterschied war aber nur für TGF- β 3 in peritumoralen Stromazellen statistisch signifikant ($p = 0,03$).

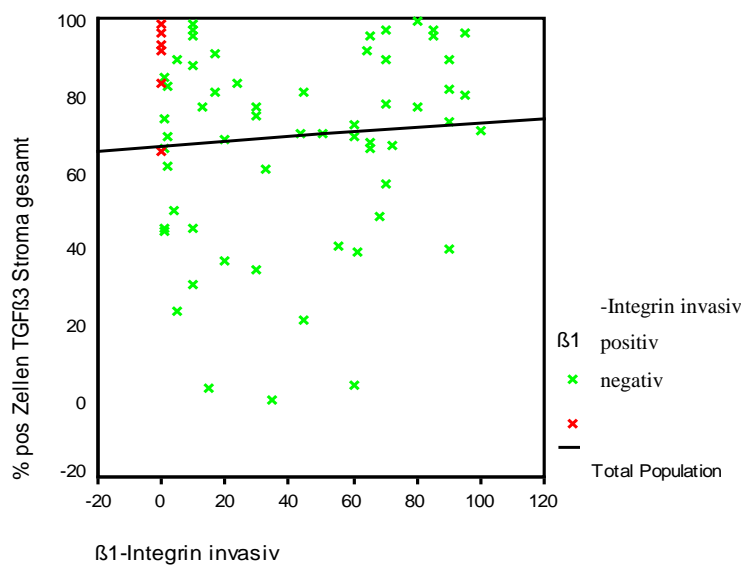


Abbildung 3.12: Zusammenhang zwischen der TGF- β 3-Expression in peritumoralen Stromazellen und der β 1-Integrin-Expression in den invasiven Tumorzellen ($p = 0,03$)

Die immunhistochemische Bestimmung der Basalmembran(BM)-Komponente **Kollagen IV** ergab in nahezu allen Karzinomen ein weitestgehendes Fehlen von BM-Material in der Umgebung der invasiven Tumorzellen der TGF- β s. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen der Kollagen-IV- und TGF- β -Expression in der invasiven Tumorkomponente ($p > 0,05$). In den intraduktalen Tumorkomponenten war die Basalmembran überwiegend erhalten. Hier korrelierte das Kollagen IV mit der intraduktalen Tumorkomponente des TGF- β 3 signifikant ($p = 0,014$). Die peritumoralen Stromazellen des TGF- β 1 um intraduktale Tumorkomponenten korrelierten ebenfalls signifikant mit dem Kollagen-IV ($p = 0,049$).

3.2.4 Zusammenhang von TGF- β -Proteinexpression und MMP-Proteinexpression

Die Auswertung der **MMPs (Matrix-Metalloproteinasen)** erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie bei den TGF- β s. Die Ergebnisse der MMP- und TGF- β -Immunhistologie wurden in den invasiven Karzinomen für die invasive und intraduktale Tumorkomponente getrennt ausgewertet und auf Zusammenhänge analysiert.

Eine signifikante Relation fand sich zwischen **TGF- β 1** und MMP-2 in den periduktalen Stromazellen der intraduktalen Tumorkomponente ($p = 0,026$) sowie MMP-3 in den invasiven wie auch in den intraduktalen Tumorzellen ($p = 0,012$ und $p = 0,028$). Außerdem korrelierte die TGF- β 1-Expression in den invasiven Tumorzellen mit der MMP-9- Expression in den umgebenen Stromazellen ($p = 0,043$).

TGF- β 2 in den invasiven Tumorzellen korrelierte mit der Expression des MMP-3 in den Tumorzellen ($p = 0,026$) und invers mit der Expression von MMP-2 in den peritumoralen Stromazellen ($p = -0,023$).

Die Expression von **TGF- β 3** in den intraduktalen Tumorzellen korrelierte mit der MMP-3-Expression in den umgebenen Stromazellen ($p = 0,043$). Außerdem war die Expression von TGF- β 3 in den peritumoralen Stromazellen mit der Expression von MMP-2 und MMP-9 in den intraduktalen und invasiven Tumorzellen ($p = 0,005$ und $p = 0,027$) assoziiert. Die invasiven Tumor- und Stromazellen von TGF- β 3 korrelierten mit der Expression von MMP-2 in den peritumoralen Stromazellen und Tumorzellen ($p = 0,042$ und $p = 0,00$). Vergleiche auch die Tabellen 3.10 A bis C.

Tabelle 3.10: Korrelation zwischen der TGF- β -Proteinexpression und der immunhistochemischen MMP-Expression in der invasiven wie intraduktalen Tumorkomponente sowie im peritumoralen Stromagewebe ($p < 0,05$)

Teil A

	MMP-2 Tumorzellen	MMP-2 Stromazellen
TGF-β1		
intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,403	0,112
Stromazellen	0,396	0,026
TGF-β1		
invasive Komponente		
Tumorzellen	0,098	0,292
Stromazellen	0,055	0,881
	MMP-2 Tumorzellen	MMP-2 Stromazellen
TGF-β2		
intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,811	0,571
Stromazellen	0,689	0,297
TGF-β2		
invasive Komponente		
Tumorzellen	0,779	-0,023
Stromazellen	0,172	0,274
TGF-β3		
intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,895	0,566
Stromazellen	0,005	0,156
TGF-β3		
invasive Komponente		
Tumorzellen	0,263	0,042
Stromazellen	0,000	0,076

Teil B

	MMP-3 Tumorzellen	MMP-3 Stromazellen
TGF-β1 intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,028	0,365
Stromazellen	0,994	0,488
TGF-β1 invasive Komponente		
Tumorzellen	0,012	0,144
Stromazellen	0,160	0,624
TGF-β2 intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,571	0,344
Stromazellen	0,799	0,690
TGF-β2 invasive Komponente		
Tumorzellen	0,026	0,456
Stromazellen	0,245	0,898
TGF-β3 intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,502	0,043
Stromazellen	0,794	0,258
TGF-β3 invasive Komponente		
Tumorzellen	0,143	0,116
Stromazellen	0,468	0,120

Teil C

	MMP-9 Tumorzellen	MMP-9 Stromazellen
TGF-β1 intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,797	0,160
Stromazellen	0,181	0,297
TGF-β1 invasive Komponente		
Tumorzellen	0,627	0,043
Stromazellen	0,369	0,960
TGF-β2 intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,176	0,252
Stromazellen	0,470	0,936
TGF-β2 invasive Komponente		
Tumorzellen	0,064	0,902
Stromazellen	0,987	0,654
TGF-β3 intraduktale Komponente		
Tumorzellen	0,1	0,393
Stromazellen	0,027	0,408
TGF-β3 invasive Komponente		
Tumorzellen	0,375	0,160
Stromazellen	0,002	0,531

3.2.5 Zusammenhang von TGF-β-Proteinexpression und Angiogenese

Ein Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der TGF-β-Proteinexpression und den invasiven Tumoranteilen fand sich nur für die Expression von TGF-β1 in den peritumoralen Stromazellen ($p = 0,003$).

4 Diskussion

TGF- β ist ein ubiquitäres Zytokin, welches eine essenzielle Rolle in der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Invasion sowie in der zellulären Mikroumgebung spielt. In malignen Erkrankungen vermitteln TGF- β -Signale in frühen Stadien einen wachstumshemmenden Effekt. Allerdings agiert TGF- β in fortgeschrittenen Stadien oft als Tumorpromotor (Zu et al., 2012; Drabsch und ten Dijke, 2012).

Die Rolle von TGF- β ist somit komplex und insbesondere beim Mammakarzinom nicht geklärt. Die meisten Erkenntnisse zu Wirkung von TGF- β stammen aus *In-vitro*-Untersuchungen. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, potenzielle Effekte von TGF- β auf die Zellzyklussteuerung und die Zellinvasion im tatsächlichen Mikroumfeld der Tumorzellen zu analysieren. Hierzu wurde an Gewebeproben von 66 invasiven Mammakarzinomen immunhistochemisch die Expression von TGF- β 1,- β 2 und - β 3 analysiert und die Zusammenhänge mit verschiedenen ausgewählten potenziellen Zielmolekülen untersucht, die Einfluss auf die Proliferationsaktivität und Invasivität nehmen.

Neben der Proteinexpression der genannten TGF- β s wurde in umfangreichen immunhistochemischen Untersuchungen zur Beantwortung der Ausgangsfragestellung die Expression von Ki-67 zur Quantifizierung der Proliferationsaktivität analysiert. Untersucht wurde darüber hinaus die Expression der potenziellen Zellzyklusregulatoren p53, p21 und Cyclin D1. Außerdem wurden die Wachstumsfaktor-Rezeptoren EGFR und HER-2/neu berücksichtigt sowie der Östrogen- und der Progesteronrezeptor. In Hinblick auf die Tumorprogression standen die Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin und β 1-Integrin im Fokus. Zusätzlich wurde Kollagen-Typ IV als essenzieller Bestandteil der Basalmembran untersucht sowie die Matrixmetalloproteinasen MMP-2, MMP-3 und MMP-9, welche die Fähigkeit haben, Komponenten der extrazellulären Matrix zu spalten, insbesondere Kollagen-Typ IV. Schließlich wurde die Gefäßdichte der Karzinome als Maß für die Angiogenese an Hand des Endothelmarkers CD31 bestimmt.

Um der Komplexität des Themas und dem Untersuchungsaufwand gerecht zu werden, sollen zunächst die Ergebnisse betreffend der potenziellen Zielmoleküle dargelegt und schließlich in den Kontext zu der TGF- β -Expression gestellt werden.

Meiner Kenntnis nach ist dies die erste Arbeit, in der die TGF- β -Expression am menschlichen Mammakarzinom in dieser Komplexität analysiert wurde.

4.1 Zellzyklusregulatoren

Die Bestimmung der Proliferationsaktivität erfolgte durch Quantifizierung der **Ki-67**-Expression in den Tumorzellen. Eine erhöhte Proliferationsaktivität wurde in 58,5% der invasiven Karzinome nachgewiesen.

P53 nimmt als sogenannter „Wächter des Genoms“ eine Schlüsselposition in der Regulation von Zellzyklusprogression und Apoptose ein. Die Inaktivierung von p53 durch Genmutation oder andere Mechanismen gilt dementsprechend als einer der wichtigsten Schrittmacher der malignen Transformation (Gasco et al., 2002). Während p53-Mutationen bei manchen Krebsarten in ca. 50% der Tumoren registriert werden, liegt die Aberrationsrate beim Mammakarzinom offenbar niedriger. In einer Metaanalyse wurde eine Mutationshäufigkeit von 18% ermittelt (Pharoah et al., 1999). Eine immunhistochemische p53-Akkumulation wurde in der eigenen Arbeit in 21,2% der invasiven Karzinome beobachtet. Die Akkumulationsraten in der Literatur schwanken zwischen 23% und 52% (Charpin et al., 1995; Bässler, 1997; Domagala et al., 2001). In Übereinstimmung mit der Literatur trat die Akkumulation von p53 in der eigenen Arbeit bevorzugt in gering differenzierten Karzinomen vom invasiv duktalem Typ mit LIC auf und war mit einer hohen Proliferationsaktivität assoziiert (Keen und Davidson, 2003). Dabei waren in der vorliegenden Untersuchung ausnahmslos alle Fälle mit einer p53-Akkumulation proliferativ hoch aktiv – unabhängig von der Expression der übrigen Marker.

Dies spricht dafür, dass in diesen Fällen tatsächlich ein inaktives und stabilisiertes Protein akkumuliert wird, dem eine Missense-Mutation zu Grunde liegt. Die von mir beobachtete Akkumulationsrate stimmt mit der in der genannten Metaanalyse berichteten durchschnittlichen Mutationsfrequenz überein. Allerdings schwanken die Angaben zur Konkordanz zwischen immunhistochemisch nachgewiesener p53-Akkumulation und molekularbiologisch belegter TP53-Mutation im invasiven Mammakarzinom. Ein wesentlicher Grund hierfür dürften die unterschiedlich hoch gewählten immunhistochemischen Grenzwerte für eine p53-Akkumulation sein (Blaszyk et al., 2000; Bukholm et al., 1997; Pharoah et al., 1999; Takahashi et al., 2000). Insgesamt liegen die gewählten Grenzwerte in der Literatur zumeist deutlich niedriger als in meiner Studie. Hier erforderte die Feststellung einer p53-Akkumulation eine Immunreaktion in mehr als 40% der Tumorzellkerne, um die basale Expression im Normalgewebe eindeutig abzugrenzen. Der gewählte Grenzwert lag damit nahe an jenem von Takahashi et al. (2000), die in ihrer Studie an 76 primären Mammakarzinomen eine Immunreaktion in mehr als 50% der Tumorzellkerne nur in den Fällen mit p53-Mutation beobachteten.

Das Protein **p21** ist multifunktional: es kann sowohl als CDK-Inhibitor als auch als positiver Modulator der Cyclin-CDK-Komplex-Bildung (Übersicht bei: Landberg, 2002) agieren. Eine Überexpression von p21 lag in der eigenen Arbeit in 30,8% der analysierten invasiven Karzinome vor. In der verfügbaren Literatur werden, abhängig vom verwendeten Grenzwert, Raten zwischen 26% und 68% berichtet (Übersicht bei: Domagala et al., 2001). Eine Beziehung zur Proliferationsrate wurde von den meisten Autoren in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht beobachtet (Barbareschi et al., 1996; Caffo et al., 1996; Diab et al., 1997).

Analog zur Arbeitsgruppe von Rey et al. (1998) wurde in der eigenen Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen der p21- und der Cyclin-D1-Überexpression beobachtet. Bei normaler Zellfunktion vermittelt p21 den p53-induzierten Zellzyklusarrest. Experimentell ist die wt-p53 vermittelte Induktion von Cyclin D1 via p21 gezeigt worden (Chen et al., 1995). Die Autoren dieser Arbeit gehen davon aus, dass diese Induktion das Resultat der Phosphorylierung von Rb-Protein infolge der CDK-Hemmung durch p21 darstellt. In der eigenen Arbeit wurde keinerlei Beziehung zwischen dem p53- Status und p21 beziehungsweise Cyclin D1 festgestellt. Somit erfüllt p21 im invasiven Mammakarzinom offenbar auch p53-unabhängige Funktionen. Unklar ist, ob es sich bei der beobachteten Korrelation zwischen p21 und einer Cyclin-D1-Überexpression lediglich um eine Feedbackschleife handelt, bei der in Folge der Cyclin-D1-Überexpression auch der zugehörige Inhibitor hochreguliert wird, oder ob p21 seinerseits zu der Cyclin-D1-Überexpression beiträgt.

Bislang ist auch die Ursache der von mir und von anderen Arbeitsgruppen registrierten Assoziation zwischen ER-Status und p21-Überexpression noch unklar (Reed et al., 1999; Thor et al., 2000; Wakasugi et al., 1997). Experimentellen Daten zufolge wurde bislang der wachstumsstimulierende Effekt von Östrogenen mit einer p21-Umverteilung bzw. Downregulation in Verbindung gebracht (Übersicht bei: Landberg, 2002). Im Gegenzug lässt sich der therapeutische Effekt von Anti-Östrogenen zumindest teilweise über die Induktion von p21 erklären. Somit ist unklar, ob Östrogene *in vivo* anders als *in vitro* auch direkt zu einer Induktion von p21 führen können oder ob die von mir und anderen Autoren beobachtete Beziehung nur als indirekte Folge des Zusammenhangs zwischen p21 und Cyclin D1 zu werten ist. In nodal-positiven Mammakarzinomen wurde in der eigenen Arbeit eine p21-Überexpression signifikant häufiger beobachtet als in nodal-negativen.

Die Ergebnisse in der Literatur sind diesbezüglich ebenso wie im Hinblick auf einen Zusammenhang zwischen p21-Überexpression und histologischem Grading uneinheitlich (Bankfalvi et al., 2000b; Barbareschi et al., 1996; Ceccarelli et al., 2001; Dogmala et al.,

2001; Thor et al., 2000; Wakasugi et al., 1997). Die Ursachen hierfür liegen vermutlich in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Untersuchungskollektive und der gewählten Grenzwerten.

Somit konnte auch in der eigenen Arbeit nicht geklärt werden, welche wesentliche Funktion p21 beim invasiven Tumorwachstum des Mammakarzinoms im Tumorwachstum hat, da eine Assoziation mit der Zellproliferation als potenzieller Signalantwort nicht gefunden wurde. Dies lässt vermuten, dass für den Effekt einer p21-Überexpression eher das stöchiometrische Verhältnis zwischen p21, Cyclin-CDK-Komplexen und zusätzlichen CDK-Inhibitoren (p27) als die p21-Konzentration alleine ausschlaggebend ist.

Cyclin D1 ist durch seine Bindung an die zyklinabhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 ein wesentlicher Schrittmacher in der Zellzyklusprogression. In der eigenen Arbeit wurde es in 21,5% der invasiven Mammakarzinome überexprimiert. Alle Fälle mit Cyclin-D1-Überexpression waren auch ER-positiv. Dies passt zu experimentellen Daten, die gezeigt haben, dass Östrogene die Cyclin-D1-Expression in ER-positiven menschlichen Mammakarzinomzelllinien induzieren können (Castro-Rivera et al., 2001). Die signifikante Korrelation von Cyclin-D1-Überexpression und ER-Status wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Barbareschi et al., 2000; Pelosio et al., 1996; Reed et al., 1999; Rey et al., 1998; Takano et al., 1999; Umekita et al., 2002), wobei die Spannweite der berichteten Überexpressionsraten in Abhängigkeit vom gewählten Grenzwert zwischen 23% und 70% liegt. Die Cyclin-D1-Überexpression war nicht mit einer erhöhten Proliferationsaktivität assoziiert. In der verfügbaren Literatur wird der Zusammenhang zwischen Cyclin D1 und Zellproliferation beim invasiven Mammakarzinom bezweifelt. Einige Autoren berichten eine geringere oder zumindest unveränderte Proliferationsrate in Cyclin-D1-überexprimierenden Tumoren (Übersicht bei: Landberg 2002). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass Cyclin D1 – unabhängig von seiner Rolle bei der Aktivierung von CDKs am G1/S-Übergang – noch durch Aktivierung des ER funktionell wirksam sein kann. Diese Aktivierung ist unabhängig von der Anwesenheit von Östrogenen (Übersicht bei: Landberg, 2002).

Anhand der vorgelegten Ergebnisse ist anzunehmen, dass die ER-vermittelte Überexpression von Cyclin D1 in invasiven Mammakarzinomen in der Zellzyklusregulation nicht von entscheidender Bedeutung ist. Entweder findet eine adäquate Gegenregulation statt oder die dauerhafte Überexpression verliert ihre Wirksamkeit durch Entkoppelung des Signalweges.

EGFR und HER-2/neu gehören zu Typ I der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, deren Aktivierung über verschiedene Signalwege Einfluss auf die Zellproliferationsregulation nimmt, wobei wachstumsfördernde Effekte im Vordergrund stehen. In der eigenen Arbeit wurde in 32,3% der invasiven Karzinome eine EGFR-Expression registriert. Sie war signifikant mit einer erhöhten Proliferationsaktivität assoziiert. Dies steht ebenso wie die

beobachtete Korrelation zwischen EGFR-Expression und negativem Hormonrezeptorstatus bzw. p53-Akkumulation im Einklang mit der Literatur (de Jong et al., 2001; Gasparini et al., 1992; Harari und Yarden, 2000; Prenzel et al., 2001; Umekita et al., 1992). Somit stellt der EGFR ein wichtiges Signalmolekül der Zellproliferationsregulation im menschlichen Mammakarzinom dar.

Für das **HER-2/neu-Onkoprotein** ergaben die eigenen Untersuchungen ein hiervon abweichendes Bild. Eine starke HER-2/neu-Überexpression (Score 3+) fand sich in Übereinstimmung mit der Literatur in 17% der invasiven Karzinome (Révillion et al., 1998; Ross und Fletcher, 1999; Wedad et al. 1999; Rakha et al.; 2010). Eine Häufung HER-2 positiver Karzinome wurde in der Gruppe von invasiv duktalem Karzinomen mit extensiver intraduktaler Komponente (EIC) beobachtet (30%). Der HER-2-Status von intraduktaler und invasiver Komponente stimmte dabei überein (Ergebnisse nicht dargestellt). Dabei ist anzumerken, dass die in der Literatur berichtete HER-2-Überexpressionsrate in reinen DCIS meistens höher ist als in invasiven Karzinomen (Burkhard et al., 2010).

In der vorgelegten Arbeit fand sich zwar eine Häufung HER-2/neu positiver Fälle bei den Mammakarzinomen mit hoher Proliferationsaktivität, die Beziehung war aber statistisch nicht signifikant. Daraus lässt sich ableiten, dass HER-2/neu zwar in einzelnen Fällen ein Schrittmacher der Zellproliferation sein kann, jedoch nicht in der Mehrzahl der invasiven Karzinome. In der verfügbaren Literatur wurde dementsprechend zumindest in einem Teil der Studien, wie auch bei mir, keine signifikante Beziehung zwischen positivem HER-2/neu-Status und Proliferationsrate beobachtet (Übersicht bei Révillion et al., 1998; Yamamoto et al. 2013).

Die derzeit vorliegenden Daten sprechen dafür, dass eine inverse Korrelation zwischen **HER-2/neu-Status und ER-Status** besteht (Konecny et al., 2003; Révillion et al., 1998; Cho et al., 2008; Rakha et al., 2010). Auch in der eigenen Arbeit war eine HER-2/neu-Überexpression im Trend mit einem negativen ER-Status verknüpft. Dies entspricht experimentellen Studien, die einen negativen Feedbackmechanismus zwischen HER-2/neu und dem ER gezeigt haben (Übersicht bei: Harari und Yarden, 2000). Analog wird dieses Wechselspiel auch zwischen EGFR und PgR beobachtet. Dies bestätigend stellte sich in der eigenen Arbeit eine negative Korrelation zwischen EGFR und der ER- sowie der PgR-Expression fest. Insgesamt ist das ein Hinweis darauf, dass zwischen den ErbB- und den Steroidhormonrezeptor-vermittelten Signalwegen eine negative funktionelle Wechselbeziehung besteht, die alternative Programme in der Kanzerogenese und Tumorprogression widerspiegeln.

Einen positiven **ER-Status** wiesen 16 von 17 ErbB-negativen Karzinomen mit erhöhter Proliferationsaktivität auf sowie alle 13 Fälle, die sowohl ErbB- als auch p53-negativ waren. Dies legt nahe, dass der ER in diesen Fällen Mechanismen vermittelt, die eine Steigerung der Zellproliferation induzieren. Die endokrine Therapie ER-positiver Karzinome basiert auf der Tatsache, dass das Zellwachstum Steroidhormonrezeptor-positiver Karzinome durch eine Blockade der Hormonentstehung oder Wirkung gehemmt werden kann. Der aktivierte ER

kann via Bindung an sogenannte „estrogen response elements“ (ERE) oder durch Aktivierung des MAPK-Signalweges die Transkription von Zellzyklusproteinen induzieren. Selektive ER-Modulatoren (SERM) wie Tamoxifen oder Raloxifen hemmen die Expression dieser potenziellen Zielgene des ER (Übersicht bei Keen und Davidson, 2003). Zu diesen Zielgenen zählt auch **Cyclin D1**, welches bereits oben besprochen wurde. Bemerkenswert erscheinen in diesem Zusammenhang außerdem die entdeckten Zusammenhänge zwischen ER und p53-Aktivität. Physiologische Spiegel des ER können in einer Hochregulation von p53 und dessen stabiler Expression münden. Die Folge ist ein Zellzyklusarrest im G1. Demgegenüber vermittelt die Überexpression des ER offenbar eine Überexpression von MDM2 sowie eine verminderte Transkriptionsaktivität von p53. MDM2 ist für die Ubiquitinierung von p53 und die anschließende Degradation verantwortlich. In der Konsequenz bewirkt dies einen entscheidenden Kontrollverlust am G1/S-Übergang durch p53-Abfall (Übersicht bei Keen und Davidson, 2003). Zudem werden in Mammakarzinomen die Methylierung des p53-Promotors sowie die MDM2-Überexpression als alternative Wege beschrieben, über welche die zelluläre Wächterfunktion von p53 aufgehoben werden kann, ohne dass eine Mutation vorliegt (Gasco et al., 2002; Kang et al., 2001).

Hinweise für eine β 1-Integrin- oder E-Cadherin-vermittelte Proliferationssteigerung oder -verminderung beim invasiven Mammakarzinom ergab sich in der eigenen Arbeit nicht. Ein Zusammenhang zwischen β 1-Integrin und dem ErbB-Signalweg wurde nicht gefunden.

Zusammenfassend sprechen die eigenen Ergebnisse bezüglich der bekannten Zellzyklusregulatoren dafür, dass der EGFR auch im invasiven Mammakarzinom eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle spielt. Bei invasiven Karzinomen scheint eine Überexpression von HER-2/neu eher eine untergeordnete Funktion zu haben. Die p53-Akkumulation ist in invasiven Karzinomen regelmäßig mit einer gesteigerten Zellproliferation verbunden. Dies legt nahe, dass ein funktionell inaktives, mutiertes p53 angehäuft wird. Vorläufig ist unklar, welche genauen Mechanismen eine Steigerung der Zellproliferation in jenen Fällen induzieren, die ErbB- und p53-negativ sind. Möglicherweise spielt dabei auch eine Inaktivierung von p53 eine Rolle, die nicht Folge einer Mutation ist. Es könnte hier der ER beteiligt sein.

4.2 Invasionsfaktoren

Voraussetzungen für Tumorinvasion und -metastasierung ist die Degradation der Basalmembran und der Umbau der angrenzenden extrazellulären Matrix. Von bestimmten MMPs wird angenommen, dass sie eine Schlüsselrolle im Übergang zum invasiven Wachstum spielen, weil sie Kollagen-Typ-IV, einen Hauptbestandteil der Basalmembran, abbauen können. Insbesondere MMP-2, -3 und -9 besitzen **Kollagenase-IV-Aktivität**. *In vitro* zeigen Tumorzelllinien nach Induktion der Kollagenase-IV-Aktivität einen

metastatischen Phänotyp (Garbisa et al., 1987). Eine Korrelation zwischen der Kollagenase-IV-Aktivität und der Fähigkeit, Metastasen auszubilden wurde in Mammakarzinomen von Nagetieren beobachtet (Nakajima, et al., 1987).

Die Menge an aktiver MMP-2 scheint dabei stärker mit dem invasiven Phänotyp verbunden zu sein als die Gesamtmenge an MMP-2 (Alvarez et al., 1990; Brown, 1999; Davies et al., 1993; Garbisa et al., 1987, Nelson et al., 2000). Allerdings erlauben Techniken wie die konventionelle Gelatine-Zymographie, die eingesetzt werden, um aktive und latente Formen der Gelatineasen (MMP-2 und -9) getrennt zu analysieren, keine Zuordnung der Lokalisation der Enzymaktivität. Die Immunhistochemie ist dagegen gut geeignet, ein Protein einem Zelltyp zuzuordnen und damit der Frage nachzugehen, welche Zellart zum invasiven oder metastatischen Tumorwachstum beiträgt: Ist die Tumorzelle dafür verantwortlich oder die peritumorale Stromazelle? Gleichzeitig kann die Frage nach der Lokalisation regulatorischer Proteine beantwortet werden. Aber im Gegensatz zu Studien, welche die Enzymaktivität gemessen haben, hat die **Immunhistochemie** zu abweichenden Ergebnissen in der Vorhersage des Krankheitsverlaufes (Rezidiv- und Überlebensanalyse) geführt (Daidone et al., 1991; Pacheco et al., 1998; Remacle et al., 1998; Scorilas et al., 2001; Sternlicht et al., 1999; Talvensaaari-Mattila et al., 1999 und 2001; Visscher et al., 1994). Mutmaßlich sind die Diskrepanzen bezüglich der prognostischen Bedeutung zumindest zum Teil methodisch bedingt. Die publizierten immunhistochemischen Studien unterscheiden sich insbesondere in der Auswahl der eingesetzten **Antikörper und der Detektionstechniken**. Detaillierte Angaben zur Kontrolle der Reaktionsspezifität der Antikörper liegen nicht immer vor. Scorilas et al. (2001) verwendeten einen Antikörper, der nur die latente Form von MMP-9 bindet. Es könnte sein, dass die von den Autoren beobachtete paradox erscheinende Assoziation zwischen MMP-9-Expression und einem besseren klinischen Verlauf dadurch verursacht wurde, dass MMP-9 in aggressiveren Tumoren in der aktiven Form vorliegt und von dem Antikörper, den sie einsetzen, nicht markiert wurden. Ein Beleg dafür fehlt bislang allerdings. Zu Beginn der eigenen Arbeit waren keine Antikörper verfügbar, die ausschließlich die aktiven Enzymformen detektierten.

Bevor die hier vorliegende Untersuchung begonnen werden konnte, wurde eine umfangreiche **Testung** verschiedener kommerziell und nicht-kommerziell verfügbarer Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis der analysierten MMPs am Paraffinmaterial vorgenommen. Die Ergebnisse der Testung für MMP-2, -3 und -9 an Gefrier- und Paraffinschnitten wurden veröffentlicht (Lebeau et al., 1999). Nur 4 der insgesamt 17 getesteten Antikörper waren im Hinblick auf Reaktivität und Spezifität für Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes

Material geeignet.

Methodische Unterschiede könnten auch dafür verantwortlich sein, dass die verfügbare Literatur zur **Lokalisation** der MMP-Proteine in menschlichem Gewebe keine einheitlichen Ergebnisse liefern. Die meisten Studien sprechen zwar dafür, dass MMP-2, -3 und -9 sowohl im Normalgewebe als auch im Mammakarzinom exprimiert werden, allerdings sind die Ergebnisse widersprüchlich, wenn es um die exakte zelluläre Zuordnung der Enzyme geht (Clavel et al., 1992; Jones et al., 1999; Visscher et al., 1994).

Einige Autoren berichteten, dass MMP-9 immunhistochemisch in einem Großteil der Karzinome in den Tumorzellen nachweisbar war (Jones et al., 1999; Visscher et al., 1994), andere beobachteten MMP-9 alleine in Neutrophilen, Makrophagen und vaskulären Perizyten, aber nicht in den Tumorzellen der Karzinome (Nielsen et al., 1997). MMP-3 ist sowohl in Tumorzellen (Clavel et al., 1992) als auch in Fibroblasten (Heppner et al., 1996) beschrieben worden. Das MMP-2-Protein wurde vorwiegend in Tumorzellen beobachtet (Clavel et al., 1992; Garbett et al., 2000).

Wegen der Diskrepanzen in der Literatur dienten die in der eigenen Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zur MMP-2, -3- und -9-Expression auch zur Klärung ihrer Lokalisation und ihrer tumorbiologischen Bedeutung im invasiven Mammakarzinom. Hierzu wurde die Expression in Tumorzellen und peritumoralen Stromazellen ebenso wie für TGF- β getrennt analysiert. Experimentelle Daten geben einen Hinweis auf die zunehmende Bedeutung der Interaktion zwischen Tumorzellen und umgebenen Stromazellen in der Karzinogenese (Shekhar et al., 2001; Tisty und Hein, 2001). In der eigenen Arbeit sollte geklärt werden, ob die Lokalisation und die Quantifizierung der analysierten Proteinasen nützliche Informationen ergeben, bei welchen Mechanismen die MMPs insbesondere im Zusammenhang mit TGF- β im menschlichen Mammakarzinom eine Rolle spielen.

Ein **Vergleich zwischen Normal- und Tumorgewebe** ergab (an 10 zufällig ausgewählten Fällen), dass signifikant mehr Karzinomzellen MMP-2 exprimierten als normale Epithelien. MMP-3 wurde erstaunlicherweise in signifikant mehr Stromazellen des Normalgewebes als peritumoral nachgewiesen. Immunhistochemisch gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede. Von einzelnen Arbeitsgruppen wurde demgegenüber beschrieben, dass MMP-2, -3- und -9-Protein – anders als im Karzinom – nur in sehr geringem Umfang oder gar nicht im Normalgewebe gefunden wurde (Ioachim et al., 1998; Jones et al., 1999; Nakopoulou et al., 1999). Der quantitative Beleg für diese Beobachtungen steht allerdings aus.

Fehlende Unterschiede zwischen Normalgewebe und Karzinomen belegen nicht, dass MMPs

für die Genese und Progression des Mammakarzinoms bedeutungslos sind. Das Verhältnis zwischen inaktivem Zymogen und aktivem Enzym könnte in Karzinomen gegenüber dem Normalgewebe zugunsten der aktivierten Form verschoben sein, ohne dass sich dies in den Ergebnissen der Immunhistochemie niederschlägt.

Immunhistochemisch lässt sich ebenfalls nicht nachweisen, wann ein erhöhter Umsatz an MMPs in Karzinomzellen stattfindet und wann eine vermehrte Synthese der MMPs mit einem gesteigerten Verbrauch bzw. Abbau der Enzyme einhergeht. In einer parallel durchgeführten Analyse der Synthese der genannten MMPs mittels Nicht-radioaktiver-in-situ-Hybridisierung (NISH) wurde in der eigenen Arbeitsgruppe eine gesteigerte MMP-2-Synthese im Karzinomgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen (Lebeau et al., 2004). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Dalberg et al., 2000; Pacheco et al., 1998). Zusätzlich wurde auch MMP-3-mRNA und -9-mRNA in einem höheren Prozentsatz von Stromazellen in der Umgebung invasiver Karzinomzellen als im Normalgewebe gefunden. Dieser Unterschied war allerdings nur für MMP-9 statistisch signifikant. Dies spricht unter Berücksichtigung der immunhistochemischen Daten für einen gesteigerten Umsatz bzw. Verbrauch der Enzyme im Tumorgewebe.

Dass alle analysierten MMPs immunhistochemisch in einem höheren Anteil der Zellen in der **Tumorperipherie** als im -zentrum nachweisbar waren, spricht für die Beteiligung der MMPs am Tumorwachstum. Der Vergleich zwischen intraduktalen und invasiven Tumorzellen ergab überraschenderweise, dass MMP-2 und MMP-3 in signifikant mehr intraduktalen als invasiven Tumorzellen nachweisbar waren. Diese zunächst paradox erscheinende Korrelation könnte allerdings Ausdruck einer Beteiligung an dem bereits beginnenden Abbau der duktalem Basalmembran sein, der die Voraussetzung für ein invasives Wachstum ist.

Über einen Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen MMP-9-Reaktivität in Karzinomzellen und dem invasiven lobulären Phänotyp berichteten andere Arbeitsgruppen (Jones et al., 1999; Scorilas et al., 2001). Der erhöhte Proteinnachweis in den invasiven lobulären Karzinomen wurde dem für diesen histologischen Typ charakteristischen Verlust von E-Cadherin zugeschrieben. Die Herunterregulation von **E-Cadherin** führt *in vitro* zu einer Erhöhung des MMP-9-Spiegels (Llorens et al., 1998). Unerwartet waren deshalb die Ergebnisse der eigenen Untersuchung: Karzinome vom lobulären Typ, die alle E-Cadherin-negativ waren, zeigten immunhistochemisch signifikant weniger MMP-9-positive Tumorzellen als die übrigen Tumore. Beim Vergleich von E-Cadherin-negativen und -positiven Karzinomen zeigte sich, dass der Verlust von E-Cadherin mit einem signifikant geringeren MMP-9-Proteinexpressionslevel verbunden war. Diese Ergebnisse lassen sich

schwer erklären, wenn von dem gegenwärtigen Konzept ausgegangen wird, dass die MMP-9-Expression von E-Cadherin herunterreguliert wird (Llorens et al., 1998). Neben methodischen Gründen kommt als Erklärung in Betracht, dass nur eine relativ kleine Anzahl von invasiv lobulären Karzinomen in der eigenen Arbeit analysiert wurde, wodurch die Signifikanzberechnungen in diesem Punkt eingeschränkt waren. Abgesehen davon ist auch in Erwägung zu ziehen, dass die MMP-9-Expression *in vivo* komplexer reguliert wird, als dies in den *in vitro*-Experiment dargestellt wurde.

In vitro können auch **Integrine** die MMP-Expression regulieren und die Enzyme aktivieren. Durch Bindung der MMPs und ihre Substrate können diese Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle die Proteinase zu ihren Zielmolekülen lenken (Brakebusch et al., 2002). In der eigenen Arbeit konnte keine Assoziation zwischen der MMP-Proteinexpression und der β 1-Integrin nachgewiesen werden.

Die **Steroidhormonrezeptor**-vermittelte Transkriptionssteuerung ist ein wichtiger Regulationsmechanismus verschiedener Gene in menschlichen Mammakarzinomen. In der eigenen Arbeit war der Anteil MMP-9-positiver Tumorzellen und peritumorale Stromazellen in ER-positiven Karzinomen signifikant niedriger als in ER-negativen Karzinomen. Ob dies ein Hinweis auf eine Hormonrezeptor-vermittelte Regulation ist, kann allein anhand der eigenen Daten nicht belegt werden. In den parallel durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis der MMP-mRNA-Expression (NISH) fand sich lediglich eine signifikante Korrelation zwischen dem ER- und PgR-Status sowie der MMP-2-mRNA-Expression in peritumoralen Stromazellen (Lebeau et al., 2004).

Die in der eigenen Arbeit nachgewiesene signifikante Beziehung zwischen der **Proliferationsaktivität** und dem Nachweis von MMP-2 in Tumor- und peritumoralen Stromazellen sind bemerkenswert. Außerdem war auch die MMP-3-Proteinexpression in den Stromazellen im Trend mit der Proliferationsaktivität assoziiert. Dieser Zusammenhang lässt sich durch die experimentell gezeigte MMP-vermittelte Aktivierung von Wachstumsfaktoren erklären (Arribas et al., 1996; Brown et al., 1998; Dempsey et al., 1997). Zudem ist bekannt, dass BB-94 (Batimastat[®]), ein synthetischer Breitspektrum-Metalloproteinase-Inhibitor, in der Lage ist, in Mammaepithelien nicht nur die Migration sondern auch die Proliferation zu hemmen (Dong et al., 1999).

In Übereinstimmung mit dem Großteil der hierzu verfügbaren Literatur wurde keine Assoziation zwischen der MMP-2, -3- und -9-Proteinexpression und dem Grading, der Tumorgöße oder dem Lymphknotenstatus beobachtet (Davies et al., 1993; Ioachim et al., 1998; Iwata et al., 1996; Jones et al., 1999; Nakopoulou et al., 1999; Scorilas et al., 2001).

Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Ergebnisse dafür, dass Expression und zelluläre Lokalisation der analysierten MMPs für das Wachstumsverhalten menschlicher Mammakarzinome von Bedeutung sind. Das invasive Karzinomwachstum und die Proliferationsaktivität korrelieren mit Expressionsmustern bestimmter MMPs in den Tumorzellen und peritumoralen Stromazellen. Allerdings lassen sich die Aggressivität und die Metastasierungsneigung der Tumoren nicht allein anhand der MMP-Expression erklären.

4.3 TGF- β s

Das Ziel der eigenen Arbeit war, die Rolle der TGF- β s im Mammakarzinom besser zu verstehen. Hierzu sollte zunächst die Lokalisation der drei TGF- β s in der intraduktalen und invasiven Tumorkomponente geklärt werden. Zudem sollte analysiert werden, ob Verbindungen zu etablierten Prognosefaktoren wie dem Grading, dem histologischen Typ und dem Hormonrezeptorstatus bestehen und ob die drei TGF- β s mittels potenzieller Zielmoleküle in den Zellzyklus und die Invasivität der Tumoren eingreifen.

4.3.1 Lokalisation der TGF- β -Expression und Zusammenhang mit konventionellen pathomorphologischen Faktoren

Die Proteinexpression von TGF- β 1, - β 2 und - β 3 war sowohl in Tumorzellen als auch in peritumoralen Stromazellen nachweisbar. Dabei waren sowohl im **Normalgewebe** als auch im Tumorgewebe mehr epitheliale Zellen TGF- β -positiv als peritumorale Stromazellen. Die höchsten Expressionsraten für die TGF- β s wurden tendenziell in den **intraduktalen Tumorzellen** registriert. Betrachtet man nur die Stromazellen, so waren die höchsten Expressionsraten in den peritumoralen Stromazellen der **invasiven Tumorkomponente** und die niedrigsten Expressionsraten in den peritumoralen Stromazellen der intraduktalen Tumorkomponente zu verzeichnen. McCune et al. (1991) beobachteten, dass normale Stromazellen und Stromazellen in fibrozystisch verändertem Mammagewebe negativ oder sehr schwach gefärbt waren, während die Stromazellen in intraduktalen und invasiven Tumoren in ihren immunhistochemischen Untersuchungen eine stark positive Markierung aufwiesen. Dass die beobachtete Expressionsintensität von den eigenen Ergebnissen abweichen, könnte methodische Ursachen haben, wie dies bereits für die MMPs erläutert wurde.

Betrachtet man die verschiedenen **Tumorkomponenten (intraduktal und invasiv)** als unterschiedliche Phasen der Tumorentwicklung, so liefern die eigenen Ergebnisse Hinweise darauf, dass eine erhöhte TGF- β -Proteinexpression in den verschiedenen Phasen der Tumorprogression in Tumorzellen und Stromazellen unterschiedliche Funktionen ausüben

kann. In frühen Stadien der Tumorgenese werden TGF- β s in der aktuellen Literatur eher inhibitorische Effekte zugeordnet, wohingegen sie in fortgeschrittenen Stadien eher eine wachstumsfördernde Rolle spielen sollen (Übersicht bei Zu et al., 2012, Moustakas et al., 2002, Dennler et al., 2002). Hierzu passt, dass in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, dass insbesondere TGF- β 1 und - β 2 in der **Tumorperipherie** stärker exprimiert wurden als im **Tumorzentrum**. Dies gilt sowohl für die Tumorzellen als auch die peritumoralen Stromazellen der invasiven Tumorkomponente. Die offenbar Stadien-abhängige und differenzierte Expression der TGF- β s in Tumorzellen und peritumoralen Stromazellen spricht für eine regulierte Interaktion zwischen Epithel und Stromazellen.

Als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen TGF- β und dem Wachstumsverhalten der Karzinome fand sich eine Assoziation zwischen der TGF- β -Expression und dem histologischen Typ. Der invasiv lobuläre Typ, der mit einem diskohäsiven Tumorwachstum verbunden ist, zeigte die geringste, der invasiv duktales Typ mit extensiver intraduktaler Tumorkomponente (EIC) die höchste Expression von TGF- β . Der Unterschied war für die TGF- β -Expression in Tumorzellen statistisch signifikant. Die Proteinexpression von TGF- β 1, - β 2 und - β 3 korrelierten untereinander. Dies legt nahe, dass die verschiedenen TGF- β s den gleichen regulierenden Mechanismen unterliegen. In den meisten Zelltypen binden alle TGF- β s zuerst an den TGF- β -Rezeptor Typ II und aktivieren in erster Linie den SMAD-Signalweg (Lawrence, 1996; Dennler et al., 2002). Ein signifikanter Zusammenhang der TGF- β -Expression zum Grading oder zum TNM-Status wurde in der eigenen Arbeit nicht nachgewiesen. Es fand sich lediglich im Trend eine Beziehung zwischen der TGF- β 1-Expression in den Tumorzellen und dem Grading ($p = 0,056$). Murray et al. (1993) stellten eine inverse Korrelation von TGF- β 1 mit dem Lymphknotenstatus fest. Im untersuchten Kollektiv war tendenziell das Gleiche zu erkennen, allerdings war auch diese Assoziation nicht statistisch signifikant.

4.3.2 Zusammenhang mit der Zellproliferation und bekannten Regulatoren

In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression der TGF- β - und der Proliferationsaktivität (Ki-67). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung von Kesari et al. (1999). Das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen der TGF- β - und Ki-67-Proteinexpression bedeutet aber nicht, dass TGF- β keine Rolle bei der Zellproliferationsregulation im menschlichen Mammakarzinom spielt. Bekanntermaßen ist der immunhistochemische Nachweis eines Proteins nicht gleichzusetzen mit dessen Funktionalität. Auch ohne geändertes Expressionsniveau können Interaktionen mit

Wachstumsfaktoren, ihren Rezeptoren und weiteren Aktivatoren und Repressoren die Proliferation beeinflussen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass der gewählte Grenzwert für die Erkennung proliferationsaktiver Tumoren nicht optimal gewählt wurde. Für eine Beteiligung von TGF- β an der Zellproliferation des Mammakarzinoms spricht, dass interessante Zusammenhänge zwischen der TGF- β -Expression und der Expression bekannter regulatorischer Proteine gefunden werden konnten. So war die TGF- β 1-Expression in intraduktalen und invasiven Tumorzellen statistisch signifikant mit einer **p53-Akkumulation** verknüpft. Dass die mutierte Form des p53 den antiproliferativen Effekt des TGF- β inhibiert, indem es mit dem Signalweg des TGF- β interferiert, wurde von Reiss et al. (1993) auf dem Boden experimenteller Untersuchungen an Zellkulturen dargelegt.

Ein weiterer interessanter Trigger der Zellproliferation ist **p21**. Ein Zusammenhang zwischen TGF- β und p21 wurde in verschiedenen *In-vitro*-Studien gezeigt. TGF- β bewirkt eine vermehrte Synthese des p21-Proteins, welches den Cyclin-CDK-Komplex blockiert und somit einen Zellzyklusstopp in der G1-Phase bewirkt (Lawrence, 1996; Ravitz et al., 1997; Taipale et al., 1998; Hanahan und Weinberg, 2000; Dennler et al., 2002; Moustakas et al., 2002; Bieri und Moses, 2009; Wagener und Müller, 2010). In der vorliegenden Arbeit fanden sich Hinweise, dass dieser Mechanismus auch im menschlichen Mammakarzinom eine Rolle spielt. Es wurde eine Korrelation zwischen der Expression von TGF- β 1 und - β 3 und p21 in Tumorzellen nachgewiesen.

Dagegen war der Prozentsatz peritumoraler Stromazellen sowie TGF- β 3-positiver Tumorzellen mit TGF- β 2 in den Tumoren mit **Cyclin-D1-Überexpression** signifikant niedriger als in jenen ohne. Cyclin D1 gehört ebenso wie p21 zu den Zielgenen des TGF- β /SMAD-Signalweges. Dabei wurde in der Literatur sowohl eine Induktion als auch eine Repression der Cyclin-D1-Expression durch TGF- β berichtet (de Caestecker et al., 2000). Die eigenen Ergebnisse wären somit mit einer Repression der Cyclin D1-Expression durch TGF- β 2 und - β 3 vereinbar.

Die Signalwege der **ErbB-Rezeptorfamilie** und der TGF- β s beeinflussen sich gegenseitig, wobei FAK, eine Proteintyrosinkinase, eine synergistische Rolle spielt (Wang et al., 2008, 2009; Wendt und Schiemann 2009; Wendt et al., 2010). In der eigenen Arbeit wurde keine Korrelation zwischen der Expression von TGF- β s und EGFR nachgewiesen. Allerdings ergab sich eine signifikante Assoziation zwischen der HER-2/neu-Überexpression und der TGF- β 1- und - β 2-Expression in den Tumorzellen. Dabei deuten experimentelle Daten darauf hin, dass dieser synergistische Effekt in erster Linie der Tumorzellinvasion über eine verbesserte Tumorzellmigration dient (Tan et al., 2009).

Östrogene sollen über die Herunterregulierung von TGF- β 2 und - β 3 in verschiedenen Zellkulturlinien einen wachstumsfördernden Effekt ausüben (Zu et al., 2012, Bierie and Moses, 2009, Mizukami et al., 1990). Hingegen fördern Antiöstrogene (Tamoxifen, Toremifen) die Expression von TGF- β 1 (Koli and Keski-Oja, 1996, Tan et al., 2009). In immunhistologischen Arbeit von Butta et al (1992) und Osin et al. (1998) wurden diese Beobachtungen anhand von Zellkulturen bestätigt. Hierzu passend fand sich in der eigenen Arbeit mit Ausnahme von TGF- β 1 in den Tumorzellen im Trend ein höherer Prozentsatz TGF- β -positiver Tumor- und Stromazellen in ER-/PgR-negativen Tumoren als in Hormonrezeptor-positiven Tumoren. Dieser Zusammenhang war aber nur für die Assoziation des PgR mit der Expression von TGF- β 2 in peritumoralen Stromazellen signifikant.

Zusammenfassend sprechen die eigenen Daten dafür, dass TGF- β 1, - β 2 und - β 3 in die Regulation der Tumorzellproliferation bei menschlichen Mammakarzinomen involviert sind. Dabei bestehen sowohl Assoziationen mit wachstumsfördernden Faktoren (akkumuliertes p53) als auch mit primär zu hemmenden Faktoren (p21). Außerdem bestehen Korrelationen mit Cyclin D1 und HER-2/neu sowie dem PgR. Dies veranschaulicht erneut die komplexe Rolle von TGF- β im Tumorwachstum.

4.3.3 Zusammenhang mit Invasionsfaktoren

Das Phänomen der **epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)** ist nach heutigem Verständnis Voraussetzung für Gewebeumbau und Wundheilung im Normalgewebe. In Karzinomzellen wird durch den Verlust der Zellpolarität und der Zell-Zellkontakte die Invasion und Metastasierung ermöglicht. Es handelt sich um einen komplexen Prozess, an dem die TGF- β s via SMAD-Proteine wesentlich beteiligt sind. Erstmals demonstrierten Miittinen et al. (1994) dieses Phänomen an einer Brustdrüsen-Zellkulturlinie. Sie fanden heraus, dass TGF- β die Fähigkeit besitzt, die Expression von **E-Cadherin** so zu beeinflussen, dass es zu einer reversiblen EMT kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen der -Expression von TGF- β und E-Cadherin nachgewiesen werden. Allerdings wurde E-Cadherin in der eigenen Arbeit nicht als kontinuierliche Variable gemessen, das heißt, es wurde nicht jeweils der Prozentsatz positiver Tumorzellen registriert, sondern lediglich zwischen E-Cadherin-negativen und -positiven Tumoren unterschieden. Dies könnte erklären, warum in der eigenen Arbeit der geschilderte Zusammenhang zwischen TGF- β und E-Cadherin nicht nachvollzogen werden konnte.

Als wichtiges Bindeglied zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix wurde **β 1-Integrin** analysiert. Die β 1-Integrin-Expression in peritumoralen Stromazellen korrelierte invers mit

der TGF- β 3-Expression; das heißt, in den Karzinomen, die β 1-Integrin-negativ waren, exprimierten mehr Stromazellen TGF- β 3 als in den Karzinomen, die β 1-Integrin-positiv waren. Dies könnte durch einen möglichen regulatorischen Effekt der TGF- β s auf die Integrin-Expression erklärt werden und stellt einen weiteren Hinweis für die Interaktion zwischen Stromazellen und Tumorzellen im Rahmen der Tumorprogression dar.

Die Degradation der Basalmembran, die intraduktale Tumorzellen und extrazelluläre Matrix voneinander trennt, ist eine wichtige Voraussetzung für die Tumorzellinvasion und Metastasierung. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den TGF- β s und der Expression von **Kollagen IV**, einem wichtigen Bestandteil der Basalmembran, wurde für die Expression von TGF- β 3 in intraduktalen Tumorzellen und für TGF- β 1 in den periduktalen Stromazellen nachgewiesen. Die jeweilige Expression korrelierte mit dem Ausmaß der Kollagen-IV-Expression als Maß für die (noch) Basalmembran. Dies spricht für den invasionshemmenden Effekt von TGF- β 1 und - β 3 in der intraduktalen Wachstumsphase der Karzinome.

Allerdings weisen die experimentellen Daten darauf hin, dass die regulatorischen Mechanismen der TGF- β s im Rahmen der mit EMT verbundenen Tumorprogression komplex sind. So können TGF- β s in fortgeschrittenen Stadien Tumorinvasion und Metastasierung fördern.

Mögliche Kooperationspartner sind hierbei **MMPs**, deren Expression und Aktivierung durch TGF- β zumindest *in vitro* in beide Richtungen gesteuert werden können (Übersicht bei Zu et al., 2012). In der eigenen Arbeit war festzustellen, dass die MMPs in weniger Tumor- und Stromazellen exprimiert werden als die TGF- β . Dies könnte im Einklang mit der Beobachtung stehen, dass TGF- β s eine Herunterregulation der Expression von MMPs und ihren Inhibitoren induzieren (Benaud et al., 1998; Duivenvoorden et al., 1999; Overall et al., 2002). TGF- β agiert dabei als Repressor der Metalloproteinasen über so genannte TGF- β Inhibitorelemente (TIE) am 5' Ende der Promotorregion von verschiedenen Genen der MMP-Familie, mit Ausnahme von MMP-2 (Benaud et al., 1998; Duivenvoorden et al., 1999; Overall et al., 2002). Andererseits wurde mittlerweile in einem Spheroid-Invasionsmodell berichtet, dass der TGF- β - SMAD-Signalweg die Invasion von Mammakarzinomzellen durch die Hochregulierung von MMP-2 und 9 induzieren kann (Wiercinska et al., 2010). Hierzu passt der in der eigenen Arbeit nachgewiesene signifikante Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter TGF β s und MMPs in den Tumor- und Stromazellen der invasiven Tumorkomponente (Tabelle 3.10). Bemerkenswert ist, dass bereits in der intraduktalen Tumorkomponente ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression bestimmter TGF- β s und MMPs nachgewiesen werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass die TGF- β s

bereits in der *in situ* Phase via Expressionsteigerung der MMPs invasionsfördernde Effekte ausüben können. Dass andererseits die Expression von TGF- β 2 in den invasiven Tumorzellen invers mit der Expression von MMP-2 in den peritumoralen Stromazellen korrelierte, unterstreicht ein weiteres Mal die vielschichtigen regulatorischen Mechanismen der TGF- β -Signalwege im Rahmen der EMT. Diese haben auch Auswirkungen auf die Zellproliferation haben.

In normalen Epithelzellen kommt es zu einer streng kontrollierten Degradation der extrazellulären Matrix (z. B. Involution). In malignen Zellen ist dieser Umbau im Sinne eines Abbaus dysreguliert. Die ECM einschließlich der Basalmembran ist ein Reservoir für eine Fülle von Wachstumsfaktoren und –inhibitoren, wie FGFs, VEGFs, PDGFs, HGFs, IGFs und auch der TGF- β s. Durch die Proteolyse der ECM kommt es zur vermehrten Freisetzung dieser Faktoren. In normalen Zellen würde die verstärkte Proteolyse zur Apoptose führen, in malignen Zellen resultiert eine gesteigerte Proliferation (Benaud et al., 1998).

De Jong et al. (1998, Teil I) vermuteten, dass die TGF- β s außerdem ein Promotor der **Angiogenese** sind. Sie fanden heraus, dass es dort, wo eine Koexpression von TGF- β s und den Rezeptoren stattfindet, möglich ist, über auto- und parakrine Mechanismen eine Stimulation von Endothelien zu bewirken. In einer weiteren Arbeit von De Jong et al. (1998, Teil II) wurde der direkte Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und den TGF- β s untersucht. Sie stellten fest, dass eine Koexpression von TGF- β 2 und dem TGF- β II- Rezeptor zusammen eine stärkere Korrelation zur MVD (microvessel density) ergab, als TGF- β 2 allein und dass es sich auch hier um einen auto- oder parakrinen Mechanismus zur Stimulation des Endothels handeln muss. In der eigenen Arbeit korrelierte die Expression von TGF- β 1 in den peritumoralen Stromazellen mit der Gefäßdichte. Dies passt zu den Ergebnissen verschiedener Studien, die berichteten, dass die Behandlung mit Antagonisten des TGF- β -Signalweges zu einer Inhibierung der Tumorangiogenese führt (Tan et al., 2009). Daraus kann abgeleitet werden, dass TGF- β eine sehr wichtige Rolle bei der Gefäßentwicklung spielt.

Zusammenfassend untermauern die eigenen Ergebnisse am menschlichen Mammakarzinom *In-vitro*-Daten, die darauf hinweisen, dass die regulatorische Funktion der TGF- β s im Rahmen der Tumorprogression komplex ist. Es fanden sich einerseits Hinweise für einen invasionshemmenden Effekt von TGF- β 1 und - β 3 in der intraduktalen Tumorkomponente. Andererseits spricht die zumindest partielle Korrelation zwischen den TGF- β s und MMPs für einen invasionsfördernden Effekt der TGF- β s. Die nachgewiesene Relation zwischen TGF- β 1 und der Gefäßdichte legt außerdem nahe, dass durch bestimmte TGF- β s die Angiogenese und damit die Tumorprogression gefördert wird.

4.4 Synoptische Diskussion

Im Normalgewebe steuern komplexe, interagierende Signalwege das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod sowie den Erhalt der Gewebsintegrität. In Karzinomen ist dieses Gleichgewicht gestört. Es kommt zur ungehemmten Zellvermehrung und Invasion des Stroma. Grundsätzlich stellt sich die Frage, welche Mechanismen Zellproliferation und -invasion beim Mammakarzinom steuern. Genauere Erkenntnisse hierzu könnten hilfreiche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer bzw. präventiver Strategien liefern. Die phänotypische Vielfalt des Mammakarzinoms spiegelt sich auch in unterschiedlichen Genexpressionsmustern wieder, von denen einige in der Zwischenzeit durch moderne molekularpathologische Methoden identifiziert worden sind. In Hinblick auf zielgerichtete Therapieoptionen entsteht das grundsätzliche Problem, jene Expressionsverschiebungen zu erkennen, die biologisch bzw. funktionell für Tumorwachstum und Metastasierung entscheidend sind. Für solche Analysen sind Tumorzelllinien oder Tiermodelle nur begrenzt geeignet, da komplexe Tumor-, Stroma-Interaktionen oder andere im menschlichen Organismus konstant oder sporadisch auftretende Faktoren und ihre möglichen Effekte unberücksichtigt bleiben. Als Beispiel für die Folge solcher Diskrepanzen sind die fehlgeschlagenen Therapiestudien mit einzelnen synthetischen MMP-Inhibitoren beim Menschen zu werten, die – entgegen den Hypothesen aus Tiermodellen – zum Teil sogar zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes führten (Coussens et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher in menschlichen Gewebeproben invasiver Mammakarzinome von insgesamt 66 Patientinnen neben der TGF- β -Expression auch die Expression ausgewählter Proteine, die *in vitro* an der Regulation des Zellzyklus und der Zellinvasion beteiligt sind, mittels Immunhistochemie analysiert. Ziel der Untersuchung war es, zu einem besseren Verständnis der multifunktionellen TGF- β s im Rahmen der Zellproliferation und Invasion beim Mammakarzinom beizutragen.

In Ergebnis wurde gezeigt, das sowohl im Normalgewebe als auch im Tumorgewebe TGF- β 1, - β 2 und - β 3-Protein in epithelialen Zellen und auch in umgebenen Stromazellen nachweisbar ist. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression und der Progressionsphase des Karzinoms sowie dem Wachstums- bzw. dem Differenzierungsmuster festgestellt werden. Dies lässt sich gut mit der heutigen Einschätzung in Einklang bringen, dass TGF- β in frühen Stadien der Tumorgenese einen eher inhibitorischen Effekt ausübt, während es in fortgeschrittenen Tumorstadien offenbar einen Progress fördert. Hierzu passt auch, dass in der eigenen Arbeit komplexe Zusammenhänge zwischen bekannten Regulatoren der Zellproliferation und Invasionsfaktoren sowie den TGF- β s gefunden wurden. So ergaben sich

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen p53 und TGF- β 1 sowie zwischen dem Progesteronrezeptor und TGF- β 2. Außerdem bestand eine Relation zwischen der HER-2-Überexpression und dem Nachweis von TGF- β 1 und - β 2 in den Tumorzellen, was für die synergistischen Effekte des TGF- β /SMAD- sowie des ErbB/MAPK-Signalweges spricht.

Als Zeichen für einen vielschichtigen Effekt der TGF- β s auf die Invasivität der Tumorzellen konnte einerseits ein Zusammenhang zwischen der TGF- β -Expression in der intraduktalen Tumorkomponente und der Integrität der Basalmembran festgestellt werden. Andererseits fand sich bereits in der intraduktalen Tumorkomponente eine gesteigerte MMP-Expression, die zum Teil mit der TGF- β Expression korrelierte. Dies legt nahe, dass TGF- β s bereits intraduktal eine invasionsfördernde Funktion ausüben, die über MMPs vermittelt wird. Zusätzlich zeigte sich ein Angiogenese fördernder Effekt von TGF- β .

Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstreichen somit die komplexe Rolle des TGF- β in der Tumorprogression beim menschlichen Mammakarzinom. Dabei wurden Stadien- und Tumortyp-abhängige fördernde und hemmende Effekte beobachtet. Die Resultate verdeutlichen somit, dass sich TGF- β im klinischen Alltag nur eingeschränkt und Stadien-abhängig als Prognosefaktor oder Therapieziel eignen dürfte. Tatsächlich zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem TGF- β -Plasmaspiegel und dem Tumorstadium (Ivanović et al., 2003). Mittlerweile wurden spezifische Antagonisten entwickelt, die auf verschiedene Stufen der TGF- β /SMAD-Signalwege zielen. Diese können insbesondere Invasivität und Neoangiogenese inhibieren.

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist der häufigste Tumor der Frau in den westlichen Industrieländern. Mammakarzinome stellen kein einheitliches Krankheitsbild dar, vielmehr unterscheiden sie sich hinsichtlich ihres Phänotyps, des Verlaufs und des Ansprechens auf eine Therapie. Um die Prognose der Erkrankung besser abschätzen und eine zielgerichtete und individuell abgestimmte Therapie festlegen zu können, werden heutzutage verschiedene prognostische und prädiktive Faktoren herangezogen. Zu den Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz zählen die TNM-Klassifikation, der histologische Tumortyp, das histologische Grading, die peritumorale Gefäßinvasion, die Steroidhormonrezeptorexpression sowie der HER-2/neu-Status. Potenzielle neue Prognosefaktoren sind molekularbiologische Marker, welche das tumorbiologische Verhalten näher charakterisieren und damit möglicherweise prognostisch und therapeutisch relevant sein könnten.

TGF- β s sind ubiquitäre Zytokine, die eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Invasion sowie in der Regulation der zellulären Mikroumgebung spielen. Sie sind an der Aktivierung verschiedener Zelltypen, u. a. von Immunzellen, und an der Modulation der extrazellulären Matrix beteiligt. Die Rolle von TGF- β s in malignen Erkrankungen ist komplex und insbesondere beim Mammakarzinom nicht vollständig geklärt. Die meisten Erkenntnisse zu Wirkung von TGF- β stammen aus *In vitro*-Studien. In den eigenen Untersuchungen, die 1998 begonnen wurden, wurde daher in menschlichen Gewebeproben invasiver Mammakarzinome von insgesamt 66 Patientinnen neben der TGF- β -Expression auch die Expression ausgewählter Proteine, die *in vitro* an der Regulation des Zellzyklus und der Zellinvasion beteiligt sind, mittels Immunhistochemie analysiert. Ziel dieser Studie war es, zu einem besseren Verständnis der multifunktionellen Rolle der TGF- β s im Rahmen der Zellproliferation und Invasion des Mammakarzinoms beizutragen.

Es wurde festgestellt, dass sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe TGF- β 1, - β 2 und - β 3-Protein in epithelialen Zellen und in umgebenden Stromazellen nachweisbar ist. Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression und der Progressionsphase des Karzinoms sowie dem Wachstums- bzw. dem Differenzierungsmuster festgestellt werden. Dies lässt sich gut mit der heutigen Einschätzung in Einklang bringen, dass TGF- β in frühen Stadien der Tumorgenese einen eher inhibitorischen Effekt ausübt, während es offenbar in fortgeschrittenen Tumorstadien die Tumorprogression fördert. Hierfür spricht auch, dass in der eigenen Arbeit komplexe Zusammenhänge zwischen bekannten Regulatoren der Zellproliferation und Invasionsfaktoren sowie den TGF- β s gefunden wurden. So zeigten sich

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen p53 und TGF- β 1 sowie zwischen dem Progesteronrezeptor und TGF- β 2. Außerdem bestand ein Zusammenhang zwischen der HER-2/neu-Überexpression und dem Nachweis von TGF- β 1 und - β 2 in den Tumorzellen, was für die synergistischen Effekte des TGF- β /SMAD- sowie des ErbB/MAPK-Signalweges spricht.

Als Zeichen für einen vielschichtigen Effekt der TGF- β s auf die Invasivität der Tumorzellen stellte sich einerseits ein Zusammenhang zwischen der TGF- β -Expression in der intraduktalen Tumorkomponente und der Integrität der Basalmembran heraus. Andererseits war bereits in der intraduktalen Tumorkomponente eine gesteigerte MMP-Expression feststellbar, die zum Teil mit der TGF- β -Expression korrelierte. Dies legt nahe, dass TGF- β s bereits intraduktal eine invasionsfördernde Wirkung ausüben, die über MMPs vermittelt wird.

Zusätzlich konnte ein Angiogenese fördernder Effekt von TGF- β nachgewiesen werden. Die hier vorgelegten Ergebnisse unterstreichen somit die komplexe Rolle der TGF- β s in der Tumorprogression beim menschlichen Mammakarzinom. Dabei wurden Stadien- und Tumortyp-abhängige fördernde und hemmende Effekte beobachtet.

Überträgt man die Ergebnisse in den klinischen Alltag, so könnte TGF- β in bestimmten Tumorstadien als Prognosefaktor oder Therapieziel eingesetzt werden. Es empfiehlt sich, in zukünftigen Studien das Wirkungsprofil von TGF- β und den mittlerweile entwickelten TGF- β -Inhibitoren noch umfassender zu analysieren, um jene Patientinnen identifizieren zu können, die am ehesten von einer Therapie profitieren, die auf den TGF- β /SMAD- Signalweg abzielt.

6 Literaturverzeichnis

1. Akhurst RJ and Balmain A (1999). Genetic events and the role of TGF- β in epithelial tumor progression. *J Pathol* 187: 82-90
2. Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerk YA (1990). Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Inst* 82: 589-59
3. Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massague J (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem* 271: 11376-11382
4. Bacus SS, Goldschmidt R, Chin D, Moran G, Weinberg D and Bacus JW (1989). Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. *Am J Pathol* 135: 783-792
5. Bankfalvi A, Tory K, Kemper M, Breukelmann D, Cubick C, Poremba C, Fuzesi L, Lelle RJ, Bocker W (2000b). Clinical relevance of immunohistochemical expression of p53-targeted gene products mdm-2, p21 and bcl-2 in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 196: 489-501
6. Barbareschi M, Caffo O, Doglioni C, Fina P, Marchetti A, Buttitta F, Leek R, Morelli L, Leonardi E, Bevilacqua G, Dalla PP, Harris AL (1996). p21WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alterations and relapse-free survival. *Br J Cancer* 74: 208-215
7. Barbareschi M, van Tinteren H, Mauri FA, Veronese S, Peterse H, Maisonneuve P, Caffo O, Scaioli M, Doglioni C, Galligioni E, Dalla PP, Michalides R (2000). p27(kip1) expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study on 512 patients with long-term follow-up. *Cancer* 89: 236-241
8. Bässler R (1997). Mamma. In: *Pathologie Band 4*, Remmele W (Hrsg.) Springer Verlag Berlin, Heidelberg: 237-368
9. Benaud C, Dickson RB and Thompson EW (1998). Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast cancer Res* 50: 97-116
10. Bierie B, Moses HL (2009). Gain or loss of TGF β signaling in mammary carcinoma cells can promote metastasis. *Cell Cycle* October; 8:20, 3319-3327
11. Blaszyk H, Hartmann A, Cunningham JM, Schaid D, Wold LE, Kovach JS, Sommer SS (2000). A prospective trial of Midwest breast cancer patients. A p53 gene mutation is the most important predictor of adverse outcome. *Int J Cancer* 89: 32-38

12. Böcker W, Denk H, Heitz Ph U (1997). Pathologie, Urban und Schwarzenberg-Verlag München, Wien, Baltimore
13. Bose S, Lesser ML, Norton L, Rosen PP (1996). Immunotype of intraductal carcinoma. Arch Pathol Lab Med 120: 81-85
14. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fäxssler R (2002). Integrins in invasive growth: J Clin Invest 109 (8); 999-1006
15. Brown CL, Meise KS, Plowman GD, Coffey RJ, Dempsey PJ (1998). Cell surface ectodomain cleavage of human amphiregulin precursor is sensitive to a metalloprotease inhibitor. Release of a predominant N-glycosylated 43-kDa soluble form. J Biol Chem 273: 17258-17268
16. Brown PD (1999). Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors. APMIS 107: 174-180
17. Bukholm K, Nesland JM, Kåresen R, Jacobsen U, Børresen AL (1997). relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinomas. J Pathol 181: 140-145
18. Bukholm K, Nesland JM, Kåresen R, Jacobsen U and Børresen-Dale A-L (1998). E-Cadherin and alpha-, beta-, and gamma- Catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. J Pathol 185: 262-266
19. Burkhardt L, Gropb T, Hermann I, Burandt E, Choschzick M, Jänicke F, Müller V, Bokemeyer C, Simon R, Sauter G, Wilczak W, Lebeau A (2010). Gene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. Breast Cancer Res and Treat 123/3: 757-765 (9)
20. Busam KJ, Tan LK, Granter SR, Kohler S, Junkins-Hopkins J, Berwick M, Rosen PP (1999). Epidermal growth factor, estrogen, and progesterone receptor expression in primary sweat gland carcinomas and primary and metastatic mammary carcinomas. Mod Pathol 12: 786-793
21. Butta A, MacLennan K, Flanders KC, Sacks NPM, Smith L, MacKinna A, Dowsett M, Wakefield LM, Sporn MB, Baum M, Coletta AA (1992). Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. Cancer Res., 52: 4261-4264
22. de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB (2000). Role of transforming growth factor- β signaling in cancer, Review. Journal of the National Cancer Institute 92: 1388-1402
23. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Buttitta F, Fina P, Leek R, Morelli L, Palma PD, Harris AL, Barbareschi M (1996). Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinomas. An immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. Clin Cancer Res 2: 1591-1599

24. Castro-Rivera E, Samudio I, Safe S (2001). Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J Biol Chem* 276: 30853-30861
25. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Lanciotti C, Taffurelli M, Paladini G, Marrano D (2001). Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines group of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer* 95: 128-134
26. Charpin C, DeVictor B, Andrac L, Amabile J, Bergeret D, LaVaut MN, Allasia C, Piana L (1995). p53 quantitative immunocytochemical analysis in breast carcinomas. *Hum Pathol* 26(2): 159-166
27. Charpin C, Garcia S, Bouvier C, Devictor B, Andrac L, Choux R and Lavaut M (1997). E-Cadherin quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. *J Pathol* 181: 294-300
28. Chen X, Bargonetti J, Prives C (1995). p53, through p21 (WAF1/CIP1), induces cyclin D1 synthesis. *Cancer Res* 55: 4257-4263
29. Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL (2008). Expression and amplifikation of Her2, EGFR and Cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int. Jan*; 58(1): 17-25
30. Clavel C, Polette M, Doco M, Binniger I, Birembaut P (1992). Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer* 79: 261-270
31. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter J, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER-2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17: 2639-2648
32. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387-2392
33. Cox G, O`Byrne KJ (2001). Matrix metalloproteinases and cancer. *Anticancer Res* 21: 4207-4219
34. Daidone MG, Silvestrini R, D`Errico A, Di Fronzo G, Benini E, Mancini AM, Garbisa S, Liotta LA, Grigioni WF (1991). Laminin receptors, collagenase IV and prognosis in node-negative breast cancers. *Int J Cancer* 48: 529-532

35. Dalberg K, Eriksson E, Enberg U, Kjellman M, Backdahl M (2000). Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 24: 334-340
36. Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR (1993). Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 67: 1126-1131
37. De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (1998). Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol* 184: 44-52
38. De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (1998). Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 184: 53-57
39. De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (2001). Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat* 66: 201-208
40. Dempsey PJ, Meise KS, Yoshitake Y, Nishikawa K, Coffey RJ (1997). Apical enrichment of human EGF precursor in Madin-Darby canine kidney cells involves preferential basolateral ectodomain cleavage sensitive to a metalloprotease inhibitor. *J Cell Biol* 138: 747-758
41. Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P (2002). Transforming growth factor β signal transduction. *J Leukoc Biol* 71(5):731-40
42. Diab SG, Yu YY, Hilsenbeck SG, Allred DC, Ellegde RM (1997). WAF1/CIP1 protein expression in human breast tumors. *Breast Cancer Res* 43: 99-103
43. Domagala W, Welcker M, Chosia M, Karbowiczek M, Harezga B, Bartkova J, Bartek J, Osborn M (2001). P21/WAF1/Cip1 expression in invasive ductal breast carcinoma: relationship to p53, proliferation rate, and survival at 5 years. *Virchow Arch Aug*; 439(2): 132-40
44. Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS (1999). Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signalling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6235-6240
45. Drabsch Y and ten Dijke P (2012). TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev Dec*;31(3-4): 553-68
46. Duivenvoorden WCM, Hirte HW & Singh G (1999). Transforming growth factor β 1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17: 27-34

47. Egeblad M, Werb Z (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2 (3); 161-194
48. Engel J, Hölzel D, Kerr J, Schubert-Fritschle G (2003). Epidemiologie. In: Manual „Mammakarzinome“. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumorzentrum München an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York 9: 1-11
49. Elston CW, Ellis IO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410
50. Fiche M, Avet-Loiseau H, Maugard CM, Sagan C, Heymann MF, Leblanc M, Classe JM, Fumoleau P, Dravet F, Mahe M, Dutrillaux B (2000). Gene amplifications detected by fluorescence in situ hybridization in pure intraductal breast carcinomas: relation to morphology, cell proliferation and expression of breast cancer-related genes. *Int J Cancer* 89: 403-410
51. Fischer B (1979). Sounding Board. Breast cancer management, alternatives to radical mastectomy. *N Engl J Med* 301(6): 326-328
52. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Har AL (1993). Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* 53(18): 4161-4161
53. Garbett EA, Reed MW, Stephenson TJ, Brown NJ (2000). Proteolysis in human breast cancer. *Mol Pathol* 53: 99-106
54. Garbisa S, Pozzatti R, Muschel RJ, Saffiotti U, Ballin M, Goldfarb RH, Khoury G, Liotta LA (1987). Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a. *Cancer Res* 47: 1523-1528
55. Gasco M, Shami S, Crook T (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast cancer Res* 4: 70-76
56. Gasparini G, Bevilacqua P, Pozza F, Meli S, Boracchi P, Marubini E, Sainsbury JR (1992). Value of epidermal growth factor receptor status compared with growth fraction and other factors for prognosis in early breast cancer. *Br J Cancer* 66: 970-976
57. Gillett C, Fantl V, Smith R, Fischer C, Bartek J, Dickson C, Barnes D and Peters G (1994). Amplification and overexpression of Cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 54: 1812-1817

58. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ (2001). Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 19: 3817-3827
59. Gonzalez MA, Pinder SE, Wencyk PM, Bell JA, Elston CW, Nicholson RI, Robertson JFR, Blamey RW and Ellis IO (1999). An immunohistochemical examination of the expression of E-Cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer. *J Pathol* 187: 523-52
60. Hanahan D, Weinberg RA (2000). The Hallmarks of cancer. *Cell* Volume 100: 57-70
61. Hannon GJ, Beach D (1994). P15INK4B is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-261
62. Harari D, Yarden Y (2000). Molecular mechanism underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19: 6102-6114
63. Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Janni W, Lebeau A, Permanetter G, Raab G, Untch M, Zenzoum I (2003). Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. In: Manual „Mammakarzinome“. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumorzentrum München an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York 9: 67-71
64. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH (1996). Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 149: 273-282
65. Hirsch-Kauffmann M und Schweiger M (1992). *Biologie für Mediziner*. Georg Thieme Verlag 2: 85-142
66. Ioachim EE, Kamina S, Athanassiadou S, Agnantis NJ (1996). The prognostic significance of EGF-R, c-erbB-2, Ki-67 and PCNA expression in breast cancer. *Anticancer Res* 16: 3141-3148
67. Ioachim EE, Athanassiadou SE, Kamina S, Carassavoglou K and Agnantis NJ (1998). Matrix metalloproteinase expression in human breast cancer: An immunohistochemical study including correlation with cathepsin D, type IV collagen, laminin, fibronectin, EGFR, c-erbB-2 oncoprotein, p53, steroid receptors status and proliferative indices. *Anticancer Res* 18: 1665-1670
68. Ivanović V, Todorović- Raković N, Demajo M, Nešković- Konstantinović Z, Subota V, Ivanišević-Milovanović O, Nikolić- Vukosavljević D (2003). Elevated plasma levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. *Eur J Cancer* 39; 454-461

69. Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, Fujimoto N, Okada Y (1996). Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 87: 602-611
70. Jean Q, Quaroni T (1999). Involvement of p21 (WAF/Cip1) and p27 (Kip1) in intestinal epithel cell differentiation. *Am J Physiol.* 99; 0363-6143: C1245-C1258
71. Jonjic´ N, Luin K, Krstulija M, Iternička Z and Mustac´ E (1993). Expression of beta-1 integrins on tumor cells of invasive ductal breast carcinoma. *Path Res Pract* 189: 979-984
72. Jones JL, Glynn P, Walker RA (1999). Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 189: 161-168
73. Jungck M, Friedl W, Propping P (1999). Erblich bedingte gastrointestinale Tumorerkrankungen. *Der Internist* 40: 502-512
74. Jud SM, Schrauder MG, Lux MP, Fasching PA, Beckmann MW, Löhberg CR (2007). Signalhemmer in der gynäkologischen Onkologie. *GebFra-Refresher: Thieme Verlag Sept; R73-R100*
75. Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ, Kang HS (2001). Methylation in the p53 promotor is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promotor and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest* 81: 573-579
76. Kaufmann M, Costa SD, Scharl A (2006). Mammakarzinom. In „Die Gynäkologie“: Springer Verlag 2. Auflage: 477-493
77. Keen JC, Davidson NE (2003). The biology of breast carcinoma. *Cancer* Feb 1; 97 (3 Suppl): 825-33
78. Kesari AL, Chellam VG, Mathew BS, Nair MK, Pillai MR (1999). Transforming growth factor beta related to extent of tumor angiogenesis but not apoptosis or proliferation in breast carcinoma. *Breast cancer* Jan 25; 6(1): 29-36
79. Kiechle M, Böttcher B, Ditsch N, Kuschel B, Plattner B, Schwarz-Boeger U, Untch M, Vodermaier A (2003). Hereditäres Mammakarzinom. In: Manual „Mammakarzinome“. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumorzentrum München an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York 9: 72-81

80. Koli K and Keski-Oja J (1996). Transforming growth factor- β system and its regulation by members of the steroid-thyroid hormone family. *Adv Cancer Res* Volume 70: 63-94
81. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind G, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Heep H, Slamon DJ (2003). Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 142-153
82. Koukoulis GK, Virtanen I, Korhonen M, Laitinen L, Quaranta V and Gould VE (1991). Immunohistochemical localisation of integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Am J Pathol* 139: 787-799
83. Landberg G (2002). Multiparameter analysis of cell cycle regulatory proteins in human breast cancer: a key to definition of separate pathways in tumorigenesis. *Adv Cancer* 84; 35-56
84. Lawrence DA (1996). Transforming growth factor- β : a general review: *Eur Cytokine Netw* Vol.7: 363-374
85. Lebeau A, Müller-Aufdemkamp C, Allmacher C, Sauer U, Nerlich A, Lichtinghagen R, Löhrs U (2004). Cellular Protein and mRNA expression patterns of matrixmetalloproteinases-2, -3 and -9 in human breast cancer: correlation with tumor growth. *J Mol Histol* 35/5: 443-455
86. Lebeau A, Unholzer A, Amann G, Kronawitter M, Bauerfeind I, Sendelhofert A, Iff A, Löhrs U (2003). EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* May; 79(2): 187-98
87. Lebeau A, Nerlich AG, Sauer U, Lichtinghagen R and Löhrs U (1999). Tissue distribution of major metalloproteinases and their transcripts in human breast cancer. *Anticancer Res* 19: 4257-4264
88. Lebeau A, Nathrath W, Permanetter W (2003). Pathomorphologie des Mammakarzinoms. In: Manual „Mammakarzinome“. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumorzentrum München an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York 9: 41-59
89. Lelle RJ, Heidenreich W, Stauch G and Gerdes J (1987). The correlation of growth fractions with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer* 59: 83-88
90. Levine AJ (1997). P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88: 323-331, Copyright © 1997 by Cell Press. Review

91. Llorens A, Rodrigo I, Lopez-Barcons L, Gonzalez-Garrigues M, Lozano E, Vingals A, Quintanilla M, Cano A, Fabra A (1998). Down-regulation of E-Cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab Invest* 78 (9); 1131-1142
92. Lui VW, Grandis JR (2002). EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res* 22 (1A): 1-11
93. Luo J, Lubaroff DM, Hendrix MJ (1999). Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-adherin transfection. *Cancer Res* 59: 3552-3556
94. McCune BK, Mullin BR, Flanders KC, Jaffurs WJ, Mullen LT, Sporn MB (1991). Localization of Transforming Growth Factor- β Isotypes in lesions of the human breast. *Hum Pathol* 23(1): 13-20
95. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R (1994). TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithel cells to mesenchymal cells: involvement of type I Receptors. *J Cell Biol* 127, 6 (pt 2): 2021-2036
96. Mizukami Y, Nonomura A, Yamada T, Kurumaya H, Hayashi M, Koyasaki N, Taniya T, Noguchi M, Nakamura S, Matsubara F (1990). Immunohistochemical demonstration of growth factors, TGF- α , TGF- β , IGF-I and neu oncogene product in benign and malignant human breast tissues. *Anticancer Res* 10: 1115-1126
97. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA and Stetler-Stevenson WG (1990). Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 136: 585-592
98. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH (2002). Mechanismen of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 82: 85-9
99. Murray PA, Barrett-Lee P, Travers M, Luqmani Y, Poweles T & Coombes RC (1993). The prognostic significance of transforming growth factors in human breast cancer. *J Cancer* 67: 1408-1412
100. Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, Nicolson GL (1987). Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res* 47: 4869-4876
101. Nakopoulou L, Giannopoulou I, Gakiopoulou H, Liapis H, Tzonou A, Davaris PS (1999). Matrix metalloproteinase-1 and -3 in breast cancer: correlation with progesterone receptors and other clinicopathologic features. *Hum Pathol* 30: 436-442

102. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149
103. Neskovic-Kontantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D, Brankovic-Magic M, Kanjer K, Gavrilović D, Mitrović L, Borojević N, Vukotić D, Spuzić I. (1999). Expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer, from early stages to advanced disease. *J Exp Clin Cancer Res* 18: 347-355
104. Nielsen BS, Sehested M, Kjeldsen L, Borregaard N, Rygaard J, Dano K (1997). Expression of matrix metalloprotease-9 in vascular pericytes in human breast cancer. *Lab Invest* 77: 345-355
105. Oda K, Hori S, Itoh H, Osamura RY, Tokuda Y, Kubota M, Tajima T (1992). Immunohistochemical study of transforming growth factor β , fibronectin and fibronectin receptor in invasive mammary carcinomas: *Acta Pathol Jpn* 42 645-650
106. Oh YL, Choi JS, Song SY, Ko YH, Han BK, Nam SJ, Yang JH (2001). Expression of p21Waf1, p27Kip1 and cyclin D1 proteins in breast ductal carcinoma in situ: Relation with clinicopathologic characteristics and with p53 expression and estrogen receptor status. *Pathol Int* 51: 94-99
107. Okamura K, Kobayashi I, Matsuo K, Kiyoshima T, Yamamoto K, Miyoshi A, Sakai H (1997). Immunohistochemical localization of cathepsin D, proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor receptor in human breast carcinoma analysed by computer image analyser: correlation with histological grade and metastatic behavior: *Histopathology* 31: 540-548
108. Osin PP, Anbazhagan R, Bartkova J, Nathan B & Gusterson BA (1998). Breast development gives insights into breast disease: *Histopathology* 33: 275-283
109. Overall CM and López-Otín C (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era: *Nat Rev Cancer* 2(9): 657-672
110. Pacheco MM, Mourao M, Mantovani EB, Nishimoto IN, Brentani MM (1998). Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinicopathological correlations. *Clin Exp Metastasis* 16: 577-585
111. Pelosio P, Barbareschi M, Bonoldi E, Marchetti A, Verderio P, Caffo O, Bevilacqua P, Boracchi P, Buttitta F, Barbazza R, Dalla PP, Gasparini G (1996). Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node-positive breast carcinoma treated with adjuvant therapy. *Ann Oncol* 7: 695-703
112. Pharoah PD, Day NE, Caldas C (1999). Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 80: 1968-1973

113. Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8: 11-31
114. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO (2010). Combinatorial biomarker expression in breast cancer: *Breast Cancer Res Treat Apr*;120(2):293-308
115. Ravitz MJ and Wenner CE (1997). Cyclin-dependent kinase regulation during G1 Phase and cell cycle regulation by TGF- β : *Adv Cancer Res* 82: 165-218
116. Reddy KB and Howe PH (1993). Transforming growth factor β 1-mediated inhibition of smooth muscle cell proliferation is associated with a late G1 cell cycle arrest: *J Cellular Phys* 156: 48-55
117. Reed W, Florens VA, Holm R, Hannisdal E, Nesland JM (1999). Elevated levels of p27, p21 and cyclin D1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients. *Virchow Arch* 435: 116-124
118. Remacle AG, Noel A, Duggan C, McDermott E, O'Higgins N, Foidart JM, Duffy MJ (1998). Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer. *Br J Cancer* 77: 926-931
119. Reiss M, Vellucci VF, Zhou ZL (1993). Mutant p53 tumor suppressor gene causes resistance to transforming growth factor beta 1 in murine keratinocytes: *Cancer Res* 53 (4): 899-904
120. Révillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34: 791-808
121. Rey MJ, Fernandez PL, Jares P, Munoz M, Nadal A, Peiro N, Nayach I, Mallofre C, Muntane J, Campo E, Estape J, Cardesa A (1998). p21WAF1/CIP1 is associated with cyclin D1 (CCND1) expression and tubular differentiation but is independent of p53 overexpression in human breast carcinoma. *J Pathol* 184: 265-271
122. Rifkin DB, Mazzieri R, Munger JS, Noguera I and Sung J (1999). Proteolytic control of growth factor availability: *APMIS* 107: 80-85
123. Robson CN, Gnanapragasam V, Byrne RL, Collins AT (1999). Transforming growth factor- β 1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium: *J Endocrinol* 160: 257-266
124. Rosen PP und Obermann HA (1993). Tumors of the mammary gland. AFIP: Washington D.C
125. Ross JS and Fletcher JA (1999). HER-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer: *Am J Clin Pathol* 112: 53-67

126. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies: *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232
127. Sandhu C, Garbe J, Bhattacharya N, Daksis J, Pan C-H, Yaswen P, Koh J, Slingerland JM, Stampfer MR (1997). Transforming growth factor β stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B -cdK4 complexes and inhibits Cyclin D1-cdK4 association in human mammary epithelial cells: *Mol Cell Biol* 17: 2458-2467
128. Schnitt SJ, Abner A, Gelman R, Connolly JL, Recht A, Duda RB, Eberlein TJ, Mayzel K, Silver B, Harris JR (1994). The relationship between microscopic margins of resection and the risk of local recurrence in patients with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Cancer* 74: 1746-1751
129. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, Talieri M (2001). Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 84: 1488-1496
130. Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L (2001). Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res* 61: 1320-1326
131. Sherr CJ (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274 (5293): 1672-1677
132. Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ (1996). Reduced E-Cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer: *Am J Clin Pathol* 105: 394-402
133. Sittek H, de Waal JC, Eiermann W, Engel J, Gauwerky J, Hellmann HP, Heywang-Köbrunner S, Keßler M, Mahl G, Perlet C, Sommer H, Strigl R, Untch M (2003). Screening und Diagnostik. In: Manual „Mammakarzinome“. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumorzentrum München an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität: W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York 9: 28-40
134. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer: *Science* 244: 707-712
135. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783-792

136. Stauber M, Weyerstahl T (2001). *Maligne Tumoren in Gynäkologie und Geburtshilfe: Georg Thieme Verlag (Duale Reihe), Stuttgart, 366-389*
137. Sternlicht MD, Lochter A, Simpson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissel MJ, Werb Z (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98: 137-146
138. Sternlicht MD, Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior: *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516
139. Storjohann HE (1998). *Immunhistologie in der täglichen Praxis: mta* 13; 4: 236-241
140. Sun P, Dong P, Dai K, Hannon GJ and Beach D † (1998). P53-independent role of MDM 2 in TGF- β 1 resistance. *Science* 282: 2270-2272
141. Taipale J, Saharinen J and Keski-Oja J (1998). Extracellular matrix-associated transforming growth factor- β : role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 71: 87-134
142. Takahashi M, Tonoki H, Tada M, Kashiwazaki H, Furuuchi K, Hamada J, Fujioka Y, Sato Y, Takahashi H, Todo S, Sakuragi N, Moriuchi T (2000). Distinct prognostic values of p53 mutations and loss of estrogen receptor and their cumulative effect in primary breast cancers. *Int J Cancer* 89: 92-99
143. Takano Y, Takenaka H, Kato Y, Masuda M, Mikami T, Saegusa M, Okayasu I (1999). Cyclin D1 overexpression in invasive breast cancers: correlation with cyclin-dependent kinase 4 and oestrogen receptor overexpression, and lack of correlation with mitotic activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 505-512
144. Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T (2001). Matrix metalloproteinase-2 (MMP2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 65: 55-61
145. Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T (1999). MMP-2 positivity and age less than 40 years increases the risk for recurrence in premenopausal patients with node-positive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 58: 287-293
146. Tan AR, Alexe G, Reiss M (2009). Transforming growth factor- β signaling: emerging stem cell target in metastatic cancer? *Breast Cancer Res Treat* 115: 453-495
147. Tanner B, Friedberg T, Beck T, Mitze M et al. (1992). Molekulargenetischer und immunhistologischer Nachweis der Onkogenprodukte des c-erbB-2 in Mammakarzinomen. *Tumordiagn Ther* 13: 24-29
148. Tavassoli FA, Devilee P (2003). *Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs; WHO Classification of Tumors. IARC Press, Lyon*

149. Thor AD, Liu S, Moore DH, Shi Q, Edgerton SM (2000). p(21WAF1/CIP1) expression in breast cancers: associations with p53 and outcome. *Breast Cancer Res Treat* 61: 33-43
150. Tlsty TD, Hein PW (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 11: 54-59
151. UICC (2002). TNM classification of malignant tumors. Wiley-Liss., Inc.: New York
152. Umekita Y, Enokizono N, Sagara Y, Kuriwaki K, Takasaki T, Yoshida A, Yoshida H (1992). Immunohistochemical studies on oncogene products (EGF-R, c-erbB-2) and growth factors (EGF, TGF-alpha) in human breast cancer: their relationship to oestrogen receptor status, histological grade, mitotic index and nodal status. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 420: 345-351
153. Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H (2002). Overexpression of cyclin D1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Int J Cancer* 98: 415-418
154. Untch M, Gutschow K, Höb C, Kahlert St, Perlet C, Rauthe G (2003). Hormonelle Substitutionstherapie (HRT) und Mammakarzinom. In: Manual „Mammakarzinome“. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge; Tumorzentrum München an der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. W. Zuckschwerdt Verlag München, Wien, New York; 9: 174-176
155. van Diest PJ, Michalides RJAM, Jannink I, van der Valk P, Peterse HL, de Jong JS, Meijer CJL and Baak JPA (1997). Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. *Am J Patho* 150: 705-711
156. Vihinen P, Kahari M (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 99 (2); 157-166
157. Visscher DW, Hoyhtya M, Ottosen SK, Liang CM, Sarkar FH, Crissman JD, Fridman R (1994) Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer* 59: 339-344
158. Vos CBJ, Ter Haar NT, Peterse JL, Cornelisse CJ and Van De Vijver MJ (1999). Cyclin D1 gene amplifikation and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Patho*; 187: 279-284
159. Wagener C, Müller O (2010). Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Thieme Verlag, 3. komplett aktualisierte und erweiterte Auflage
160. Wakasugi E, Kobayashi T, Tamaki Y, Ito Y, Miyashiro I, Komoike Y, Takeda T, Shin E, Takatsuka Y, Kikkawa N, Monden T, Monden M (1997). p21(Waf/Cip1) and p53 protein expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 107: 684-691

161. Walker RA and Dearing SJ (1992). Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 28: 641-644
162. Wang SE, Xiang B, Guix M, Olivares MG, Parker J, Chung CH, Pandiella A, Arteaga CL (2008). Transforming growth factor beta engages TACE and ErbB3 to activate phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in ErbB2-overexpressing breast cancer and desensitizes cells to trastuzumab. *Mol Cell Biol* 28: 5605-5620
163. Wango EO (1996). *Progress in Reproductive. Health Res* No 40: 1
164. Wedad H, Kahn HJ, Trudeau M (1999). Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: From bench to bedside. *Mod Pathol* 12: 827-834
165. Weinberg RA (1995). The cell cycle clock and its control of cellular proliferation. *Cell* 81: 323-330
166. Wendt MK, Schiemann WP (2009). Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF-beta signaling and metastasis. *Breast Cancer Res* 11: R68
167. Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP (2010). Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene* 29: 6485-6498
168. Wiercinska E, Naber HP, Pardali E, van der Pluijm G, van Dam H, Ten Dijke P (2011). The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast Cancer Res Treat*;128(3): 657-666.
169. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002). Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA*; 288(3): 321-333
170. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach R (1993). p21 is a universal inhibitor of kinases. *Nature* 366: 701-704
171. Yamamoto-Ibusuki M, Yamamoto Y, Yamamoto S, Fujiwara S, Fu P, Iyama K, Iwase H (2013). Comparison of prognostic values between combined immunohistochemical score of estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, Ki-67 and the corresponding gene expression score in breast cancer. *Mod Pathol* 26(1): 79-86
172. Yu Q, Geng Y, Sicinski P (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411: 1017-1021
173. Zoltan N, Korsmeyer O and SJ (1994). Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79: 189-192, Copyright © 1994 by Cell Press Minireview

174. Zu X, Zhang Q, Cao R, Liu J, Zhong J, Wen G, Cao D (2012). Transforming growth factor- β signaling in tumor initiation, progression and therapy in breast cancer: an update. *Cell Tissue Res* 347: 73-84

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle		Seite
1.1	Überblick der TGF- β -Zielgene zur Regulation der Zellproliferation	18
2.1	Untersuchungskollektiv beim invasiven Mammakarzinom	33
2.2	Auswertungskriterien HER-2/neu-Immunhistochemie und Bewertung der Scores	40
3.1	Korrelation zwischen Hormonrezeptoren und Faktoren der Zellproliferation sowie der Zelladhäsion in der invasiven Tumorkomponente und dem Tumortyp, histologischem Grad sowie pT- und pN-Status	45-48
3.2	Korrelation der potenziell regulatorischen Proteine untereinander und mit der Proliferationsaktivität (n.s. = nicht signifikant)	51
3.3	Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2-, -3- und -9-Protein im Normalgewebe (Prozentsatz positiver Zellen Mittelwert [MW] \pm Standardabweichung [SD])	54
3.4	Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2, -3 und -9-Protein in 66 invasiven Mammakarzinomen mit einer auswertbaren intraduktalen Tumorkomponente 40 Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)	54
3.5	Korrelation zwischen der immunhistochemischen MMP-Expression in der invasiven Tumorkomponente und pathomorphologischen Parametern in 65 Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)	55-57
3.6	Immunhistochemischer Nachweis von TGF- β 1, - β 2 und - β 3 in 64* Fällen eines invasiven Mammakarzinoms mit Bewertung der intraduktalen Komponente in 36 Fällen und des Normalgewebes in 10 Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)	62
3.7	Korrelation zwischen der TGF- β -Expression in der invasiven Tumorkomponente und pathomorphologischen Parametern in 64* Fällen (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)	63-65
3.8	Korrelation zwischen TGF- β -Proteinexpression und Regulatoren der Zellproliferation sowie der Proliferationsaktivität (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)	69-70

3.9	Korrelation zwischen TGF- β -Proteinexpression und Faktoren der Zelladhäsion in der invasiven Tumorkomponente in 64* Fällen eines Mammakarzinoms (Prozentsatz positiver Zellen: MW \pm SD)	71
3.10	Korrelation zwischen der TGF- β -Proteinexpression und der immunhistochemischen MMP-Expression in der invasiven wie intraduktalen Tumorkomponente sowie im peritumoralen Stromagewebe ($p < 0,05$)	74-76
8.1	Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie (in alphabetischer Reihenfolge); Vorgehen zur Antigendemaskierung und Inkubationsbedingungen	118-120
8.2	Puffer und Reagenz-Lösungen (in alphabetischer Reihenfolge)	121-122
8.3	Patientenkollektiv	123-125

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
1.1	Large-latent-TGF- β -Komplex (Abbildung in Anlehnung an David A. Lawrence, 1996)	14
1.2	TGF- β als multifunktionaler Regulator	15
1.3	Effekte des TGF- β auf Faktoren des Zellzyklus	19
3.1	Immunhistochemischer Nachweis von Ki 67, p53, p21, Cyclin D1, EGFR, HER-2/neu, E-Cadherin und β 1-Integrin	43-44
3.2	Kollagen-IV-Expression in einem invasiven-duktalem Karzinom mit EIC.	49
3.3	Immunhistochemischer Nachweis von MMP2, MMP3 und MMP9	53
3.4	CD31-Immunhistochemie zur Darstellung der Tumervaskularisation	58
3.5	Immunhistochemische TGF- β 2-Expression in peritumoralen Stromazellen bezogen auf den PgR-Status ($p = 0,012$)	60
3.6	Immunhistochemischer Nachweis von TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3	61
3.7	Zusammenhang zwischen der TGF- β 1-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente und der p21-Überexpression ($p = 0,049$)	66
3.8	Inverser Zusammenhang der TGF- β 2-Proteinexpression des invasiven peritumoralen Stromagewebes mit der Cyclin D1-Überexpression ($p = 0,01$)	67
3.9	Inverser Zusammenhang von TGF- β 3-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente und Cyclin-D1-Überexpression ($p = 0,007$)	67
3.10	Zusammenhang von TGF- β 1-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente mit der HER-2/neu-Überexpression ($p = 0,043$)	68
3.11	Zusammenhang der TGF- β 2-Proteinexpression in der invasiven Tumorkomponente mit der HER-2/neu-Überexpression ($p = 0,002$)	68
3.12	Zusammenhang zwischen der TGF- β 3-Expression in peritumoralen	72

Stromazellen und der $\beta 1$ -Integrin-Expression in den invasiven
Tumorzellen ($p = 0,03$)

8 Anhang

Tabelle 8.1: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie (in alphabetischer Reihenfolge); Vorgehen zur Antigendemaskierung und Inkubationsbedingungen

Antigen	Antikörper-Klon	Bezugsquelle	Vorbehandlung	Antikörper-Verdünnung	Inkubation	Detektions-System
β1-Integrin	JB1a (J-10)	IDS ^a	Mikrowelle: Target Retrieval Solution (TRS, pH 6,0) ^b 3x10 Min.	1:20	22 Std., 0-4° C	ABC
CD31	JC/70A (mouse)	DAKO ^b	Protease XXIV 60 Min., 18-22°C	1:30	1 Std., 18-22°C	APAAP
Cyclin D1	18-0220	Zymed ^c	Mikrowelle: TRS (pH 6,0) ^d 15 Min.	1:100	1 Std., 18-22°C	LSAB
E-Cadherin	5H9	Labo Nova ^e	Mikrowelle: Antigen Retrieval (AR-10) Solution ^f 3x10 Min.	1:10	22 Std., 18-22°C	
EGFR	E30	Merck ^g	0,1% Protease ^h E 10 Min., 37°C	1:20	22 Std., 0-4°C	LSAB
ER	6F11	Ventana ⁱ	Mikrowelle: Borsäure (pH 7,4) 3x10 Min.	vorverdünnt	28 Min., 37°C	Enhanced V-Red Detection Kit ^j (alcalic phosphatase red)
HER-2/neu	Polyklonal (HercepTest TM)	DAKO ^b	Wasserbad: Epitope Retrieval-Solution 40 Min., 95-99°C	vorverdünnt	30 Min., 18-22°C	Visualization Reagent

^a Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland

^b DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland

^c Zymed Lab Inc., South San Francisco, CA, USA

^d Zymed Lab Inc.

^e Euro-Diagnostika/LaboNova GmbH, Gießen, Deutschland

^f Innovative Diagnostik-Systeme

Antigen	Antikörper-Klon	Bezugsquelle	Vorbehandlung	Antikörper-Verdünnung	Inkubation	Detektions-System
Ki-67	DIA 505 (mouse)	Dianovok	Mikrowelle: TRS (pH 6,0) 3x10 Min.	1:50	1 Std., 18-22°C	APAAP
			Mikrowelle: Zitrat-Puffer (pH 6,0) 3x10 Min.	1:10	1 Std., 18-22°C	
Kollagen IV	polyklonal	Laboserv l	Pepsinn 60 Min., 37°C	1:200	1 Std., 37°C	F(ab)R
MMP-2	polyklonal (#AB-809)	Chemicon ^m	0,1% Trypsin ⁿ 30 Min., 18-22°C	1:200	22 Std., 0-4°C	LSAB
MMP-3	polyklonal (#AB-811)	Chemicon ^m	0,1% Protease E ^h 10 Min., 37°C	1:300	22 Std., 0-4°C	EnVision
MMP-9	polyklonal	Lichtinghagen ^o	0,1% Protease XXIV ⁿ 30Min., 18-22°C	1:300	22 Std., 0-4°C	LSAB
p21	OP 64 (mouse)	Calbio-Chemie ^p	Mikrowelle: TRS (pH 6,0) 3x10 Min.	1:100	1 Std., 18-22°C	LSAB
				1:50	1 Std., 18-22°C	APAAP
p53	M7001	DAKO	Mikrowelle: Zitrat-Puffer (pH 6,0) 3x10	1:20	1 Std., 18-22°C	LSAB
			Mikrowelle: TRS (pH 6,0) 3x10 Min.	1:100	1 Std., 18-22°C	LSAB
PgR	1A6	Ventana	Mikrowelle: Borsäure (pH 7,4) 3x10 Min.	vorverdünnt	28 Min., 37°C	Enhanced V-Red Detection Kit (alcalic phosphatase red)
TGF-β1	polyklonal (#SC-146)	Santa Cruz ^q Biotech.	Mikrowelle: Zitrat-Puffer (pH 6,0) 3x10 Min.	1:50	Casein 22 Std., 0-4°C	LSAB
TGF-β2	polyklonal (#SC-90)	Santa Cruz Biotech.	0,1% Protease E 10 Min., 37°C	1:60	22 Std., 0-4°C	LSAB
TGF-β3	polyklonal (#SC-82)	Santa Cruz Biotech.	Casein 10 Min., 37°C	1:60	22 Std., 0-4°C	LSAB

^g Merck, Darmstadt, Deutschland

^h Sigma, Deisenhofen, Deutschland

ⁱ Ventana Medical Systems, Illkirch, Cedex, Frankreich

^j Ventana Medical Systems

^k Dianova, Hamburg, Deutschland

^l Laboserv

^m Chemicon, San Diego, CA, USA

ⁿ Sigma

^o PD Dr. R. Lichtinghagen; Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland

^p Calbio Chemie

^q Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Deutschland

Tabelle 8.2 : Puffer und Reagenzlösungen (in alphabetischer Reihenfolge)

Lösung	Substanzen	Menge
3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-(AEC-) Lösung	AEC (Sigma ^a)	20 mg
	Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck ^b)	12 ml
	PBS-Puffer für AEC	100 ml
	Aqua dest. (Braun ^c)	ad 200 ml
	Perhydrol p. a. (Merck)	10 µl
Borsäure	Stammlösung (pH 7,0):	20 ml
	Borsäure reinst (Merck)	31 g
	Aqua dest.	500 ml
	Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck)	nach Bedarf
Brij-Stammlösung	TRIS-Puffer	60 ml
	Brij-Konzentrat (Merck)	20 ml
BT-Puffer	Natriumhydrogencarbonat (Merck)	3,1 g
	Tri-Natriumzitat-Dihydrat p. a. (Sigma)	0,05 g
	Tween 20 (Sigma)	0,25 ml
	Aqua bidest. (Braun)	500 ml
Carlsberg-Lösung	Protease Typ XXIV (Sigma)	0,01 g
	Puffer 1	10 ml
Pepsin-Stammlösung	Pepsin A (Sigma)	100 mg
Phosphate Buffered Saline (PBS) für AEC-Lösung (pH 5,0-5,5)	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p. a. (Merck)	0,93 g
	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p. a. (Merck)	3,18 g
	Natriumchlorid p.a.	21,03 g
	Aqua dest.	ad 2,5 l
	Brij-Konzentrat	5 ml
Tris-Brij-Puffer	Tris-Puffer	5 l
	Brij-Stammlösung	5 ml
TRIS-Puffer für die Immunhistochemie (50mM; pH 7,5)	Natriumchlorid p. a. (Merck)	43,90 g
	Trizma-Hydrochlorid (Sigma)	34,25 g
	Trizma-Base (Sigma)	4,50 g
	Aqua dest.	ad 5,0 l

Zitratpuffer (pH 6,0)	Aqua bidest.	450 ml
	Stammlösung A für Zitratpuffer:	9 ml
	Zitronensäure-Monohydrat p. a. (Merck)	21,01 g
	Aqua bidest.	ad 1 l
	Stammlösung B für Zitratpuffer:	41 ml
	Tri-Natriumzitat-Dihydrat p. a. (Sigma)	29,41 g
	Aqua bidest.	ad 1 l

^a Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

^b Merck, Darmstadt, Deutschland

^c B. Braun, Melsungen, Deutschland

8.3 Patientenkollektiv

Fall-Nr.	Alter	prä-/post-	Untersuchungs-	Histologie	Grading	pT	Zusatz	pN	bi	pM	Besonderheiten
		menopausaler Status									
1	47	prä	Primärtumor	IDC mit DGP	3	3		1	bi	x	
2	65	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		1	biii	x	
3	35	prä	Primärtumor	IDC mit EIC	2	1	a	0		x	
4	38	prä	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
6	74	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		1	biv	x	
7	59	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	2		0		x	
11	53	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	3		0		x	Zn.Chemotherapie
12	66	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	3		1	bi	x	
14	78	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	1	c	0		x	
15	56	post	Primärtumor	IDC mit EIC	1	2		0		x	Lymphangiosis carcinomatosa
16	37	prä	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		1	bii	x	Lymphangiosis carcinomatosa
17	51	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	2		1	biv	x	Lymphangiosis carcinomatosa
18	83	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	3		2		x	Lymphangiosis carcinomatosa, Metastase Beckenwand
19	48	prä	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		1	bi	x	
21	76	post	Primärtumor	IDC mit LIC	1	1	a	0		x	
22	76	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	2		1	biv	x	R1
23	51	post	Primärtumor	IDC mit EIC	2	1	a	1	bi	x	multifokal
27	56	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	3		1	biii	1	
29	63	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		0		x	
30	53	post	Primärtumor	IDC mit EIC	2	2		0		x	
31	61	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		1	biii	x	Lymphangiosis carcinomatosa
33	55	post	Primärtumor	IDC mit EIC	3	3		1	biv	x	
34	54	post	Primärtumor	IDC mit EIC	2	3		1	biii	x	Lymphangiosis carcinomatosa, R1
35	63	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	4	d	1	biii	x	Lymphangiosis carcinomatosa
36	76	post	Primärtumor	IDC mit EIC	2	1	b	0		x	

Fall-Nr.	Alter	prä-/post-menopausaler Status	Untersuchungsmaterial	Histologie	Grading	pT	Zusatz	pN	bi	pM	Besonderheiten
37	67	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	2		1	biii	x	
39	59	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
40	78	post	Primärtumor	ILC	2	2		0		x	Colon-Ca
42	72	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		0		x	
43	42	prä	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		1	biii	x	
44	67	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	1	c	0		x	
47	67	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		1	biv	x	
48	76	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		1	biii	x	
49	60	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	2		0		x	
50	64	post	Primärtumor	ILC	2	2		0		x	
52	71	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	2		1	biii	x	
53	48	prä	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
54	55	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
55	67	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	2		1	bi	x	
56	62	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
57	80	post	Primärtumor	IDC mit EIC	2	2		0		x	
58	58	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
59	58	post	Primärtumor	ILC	2	2		1	biii	x	
60	63	post	Primärtumor	ILC	2	3		1	biii	x	
61	63	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	3		1	a	x	
62	53	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		1	biii	x	
63	33	prä	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		1	biv	x	
64	66	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	2		1	bi	x	
65	53	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	4	b	2		x	
66	66	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		2		x	
67	69	post	Primärtumor	ILC	2	2		2		x	Lymphangiosis carcinomatosa

Fall-Nr.	Alter	prä-/post-menopausaler Status	Untersuchungsmaterial	Histologie	Grading	pT	Zusatz	pN	bi	pM	Besonderheiten
68	58	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	3		1	biii	x	Lymphangiosis carcinomatosa
69	57	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		1	bii	x	
70	54	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		1	biv	x	
71	63	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		0		x	
72	64	post	Primärtumor	ILC	2	2		2		x	
74	73	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	3		1	biii	x	Lymphangiosis carcinomatosa
75	66	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
77	65	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	Lymphangiosis carcinomatosa, Z.n.Chemotherapie
78	70	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
79	52	post	Primärtumor	IDC mit LIC	3	2		0		x	
80	85	post	Primärtumor	IDC mit LIC	2	1	c	1	bi	x	
81	45	prä	Primärtumor	IDC mit EIC	2	2		1	biii	x	
84	59	post	Primärtumor	IDC mit LIC	1	1	b	0		x	Mamma-Ca bds.; rechts ausgewertet
91	68	post	Primärtumor	IDC mit EIC	3	2		1	biii	x	Lymphangiosis carcinomatosa
103	53	post	Primärtumor	IDC mit DGP	2	3		1	biii	x	Lymphangiosis carcinomatosa, Z.n.Chemotherapie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr.med. Annette Lebeau für ihre kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten und der Abfassung dieser Dissertation. Durch Ihre herzliche und aufmunternde Art in Gesprächen und Diskussionen verstand sie es, mir den Sinn für Humor nicht abhandeln kommen zu lassen. Ihre konstruktive Kritik und fortwährende fachliche Unterstützung, auch später aus der Ferne, haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. Udo Löhrs danke ich besonders für die primäre Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit, in dem von ihm geleiteten Institut für Pathologie der LMU München meine Dissertationsarbeit unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Annette Lebeau anfertigen zu können.

Bei Frau Annette Iff (MTA) möchte ich mich für die Anfertigung der histologischen Präparate bedanken, die ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit waren.

Sehr herzlich bedanke ich mich auch bei meinem Ehemann, Herrn Dipl. Ing. M.Sc. Wolfgang Müller, der einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit in Hinblick auf Layout- und Office-Integration geleistet hat. Auch seine fortwährende emotionale Unterstützung und Bestärkung sollen in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben.

Bei meinen beiden Familien möchte ich mich für ihre Aufmunterung, Bestärkung und ihr Interesse an meiner Arbeit recht herzlich bedanken.

Ein sehr großes Dankeschön geht auch an Frau Dr. med Astrid Hacker, die mir häufig motivierend und mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie hat mir gezeigt, dass man mit den Problemen, die ein solches Projekt mit sich bringt, nicht alleine dastehen muss.

Für einen Motivationsschub, der zur Abrundung und Finalisierung der Arbeit führte, möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. sc. hum. Phillip Müller (Imperial College London) für die fachliche Durchsicht und bei Frau Annette Herdeis (Oberstudienrätin) für das Korrekturlesen hinsichtlich der Orthografie, bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Müller-Aufdemkamp, Claudia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**TGF- β und seine Korrelation mit Faktoren der Zellzyklusregulation und Zellinvasion
beim invasiven Mammakarzinom**

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.

Landshut, 30.09.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand