

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchung von PTK7:
Expression der Rezeptortyrosinkinase im primären Mammakarzinom
und ipsilateralen axillären Lymphknoten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Angela Malik, geb. Gunesch

aus Starnberg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. Nadia Harbeck

Mitberichterstatter: PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl
PD Dr. Oliver Stötzer

Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. Beyhan Ataseven

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2019

Diese Arbeit wurde in Kooperation des Brustzentrums der Frauenklinik LMU, Leitung Frau Prof. Nadia Harbeck und dem Max-Planck-Institut Martinsried, Abteilung Molekularbiologie von Herrn Prof. Axel Ullrich angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Gärtner S*, Gunesch A*, Knyazeva T, Wolf P, Högel B, et al. 2014. PTK 7 is a transforming gene and prognostic marker for breast cancer and nodal metastasis involvement. PLoS One. 2014 Jan 7;9(1): e84472.

Ataseven B, Gunesch A, Eiermann W, Kates RE, Hoegel B, et al. 2014. PTK7 as a potential prognostic and predictive marker of response to adjuvant chemotherapy in breast cancer patients, and resistance to anthracycline drugs. Onco Targets Ther. 2014 Oct 6;7: 1723-31.

* Gleichberechtigte Erstautorschaften

1	EINLEITUNG	5
1.1	Tumorbiologie des Mammakarzinoms	6
1.2	Tumorprogression und Metastasierung	9
1.3	Prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom	10
1.3.1	Faktoren mit gesicherter klinischen Relevanz	10
1.3.2	Die Proteintyrosinkinase 7 (PTK7)	12
1.4	Systemische Therapieoptionen des frühen Mammakarzinoms	14
2	ZIELSETZUNG	16
3	PATIENTEN UND METHODEN	17
3.1	Patientenauswahl	17
3.2	Datenerhebung	17
3.3	Molekularbiologische Methoden	18
3.3.1	Operative Präparatgewinnung und Gewebeprozessierung	18
3.3.2	RNA-Extraktion	18
3.3.3	c-DNA Synthese	20
3.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
3.4	Immunhistochemie (IHC)	24
3.4.1	Immunhistochemischer Nachweis von PTK7	24
3.5	Datenauswertung und statistische Methoden	27
3.5.1	Einteilung der axillären Lymphknoten	27
3.5.2	PCR- Analyse und Auswertung	27
3.5.3	IHC- Histologische Auswertung und Quantifizierung	28
3.5.4	Statistische Methoden	29
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Patientencharakteristiken und histopathologische Befunde	30
4.1.1	Gesamtkollektiv	30
4.1.2	Patientenkollektiv PCR	35
4.1.3	Patientenkollektiv IHC	37
4.2	Vergleich molekulargenetische Methodik und Immunhistochemie	38
4.2.1	Vergleich klassische semiquantitative PCR und real time PCR	38
4.2.2	Vergleich molekulargenetische und immunhistochemische Methoden	39

4.3	Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen	40
4.3.1	Konventionelle semiquantitative PCR (rtPCR).....	40
4.3.1.1	Korrelation der PTK7 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor und Lymphknoten.....	40
4.3.1.2	Korrelation der PTK7 Expression mit Überleben	45
4.3.2	Real time PCR (qrt-PCR)	48
4.3.2.1	Korrelation PTK7 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor und Lymphknoten	49
4.3.2.2	Korrelation der PTK7 Expression mit Überleben	52
4.4	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung.....	54
4.4.1	Korrelation PTK7 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor und Lymphknoten	58
4.4.2	Korrelation der PTK7 Expression mit Überleben	60
5	DISKUSSION	62
5.1	Bedeutung von PTK7	62
5.2	Molekulargenetischer und immunhistochemischer Nachweis von PTK7	64
5.3	Ergebnisse der Arbeit und deren Bedeutung.....	66
6	ZUSAMMENFASSUNG	71
7	ANHANG	73
7.1	Abkürzungsverzeichnis	73
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	76
7.3	Tabellenverzeichnis	78
7.4	Literaturverzeichnis.....	80
8	LEBENS LAUF	90
9	DANKSAGUNG	91
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	92

1 Einleitung

Brustkrebs ist eine komplexe Erkrankung multifaktorieller Genese. Jährlich werden weltweit über eine Million neue Fälle diagnostiziert. Somit ist das Mammakarzinom mit 26.8%, vor dem Kolorektalen- und Lungenkarzinom, die häufigste maligne Erkrankungen der Frau (Husmann 2010).

Die biologische Heterogenität der Mammakarzinome, welche auf einer Variabilität hinsichtlich der molekularbiologischen, histopathologischen und klinischen Eigenschaften beruht, stellt möglicherweise eine Schlüsselrolle bei dem Therapieerfolg dieser Erkrankung dar. Es zeigt sich, dass diese heterogene Erkrankung mit den heutigen klinischen Parametern und pathologisch erhobenen Markern nicht vollständig abgebildet wird, so dass erst durch weitere Erkenntnisse aus der molekularen Grundlagenforschung mehr Einblicke in die komplexen Mechanismen der Tumorbilogie gewonnen werden und auf diesem Wege neue Behandlungsstrategien durch individualisierte Therapiekonzepte erarbeitet werden können (Prat und Perou 2011).

Die Einführung von Genexpressionsprofilanalysen hat in den letzten Jahren das Wissen um die Bedeutung der Subtypisierung von Mammakarzinomen wesentlich vertieft. Mittels unterschiedlicher Expressionsprofile wurden erstmals vier biologische Subtypen unterschieden: Luminal A, Luminal B, HER2-positiv und Basal-like Typ, die von prognostischer Relevanz sind. Wenngleich die molekulargenetisch definierten Subtypen nicht mit den klinischen, die auf Basis von histopathologischen Markern definiert werden können, identisch sind, so ergeben sich dennoch relevante Überschneidungen. Charakteristisch für die luminalen Subgruppen ist die Expression von Östrogen (ER)- und/oder Progesteronrezeptoren (PR). Dabei unterscheiden sich Luminal A und Luminal B-Tumoren durch eine höhere Proliferationsrate von Luminal B Tumoren. Der basale Subtyp ist gekennzeichnet durch ein Fehlen von Hormonrezeptoren und HER2 (Sorlie et al. 2003, Prat und Perou 2011). Die Korrelation der detektierten Subgruppen mit dem klinischen Überleben ergab deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich ihrer Prognose (Sorlie et al. 2003) und ihres Therapieanprechens (Hugh et al. 2009, Parker et al. 2009, Nielsen et al. 2010). So sprechen ER-, PR- und HER2-negative Mammakarzinome (sogenannte „Triple-negative Mammakarzinome „TNBC“), welche zu 50-75% dem Basal-like Subtyp angehören, zwar gut auf eine Chemotherapie an, zeigen aber dennoch hohe

Rezidivraten und eine insgesamt schlechtere Prognose, als Tumoren vom Luminal-A Subtyp (Sorlie et al. 2001, Prat et al. 2010).

Um das Ziel einer individualisierten und zielgerichteten onkologischen Therapie effektiv zu erreichen, ist eine Weiterentwicklung des molekular onkologischen Wissens über die komplexen Zusammenhänge und Eigenschaften des Mammakarzinoms von zentraler Bedeutung.

1.1 Tumorbiologie des Mammakarzinoms

Tumorerkrankungen entstehen als Folge genetischer Mutationen in einzelnen Zellen (*monoklonale Entwicklungstheorie*). Unterschiedliche Einflüsse können dies verursachen. Neben exogenen Einflüssen wie chemischen Substanzen (z.B. Tabak, Ernährung und chronische Infektionen) oder Strahlung (ionisierende und UV-Strahlung), werden zudem endogene Faktoren, wie die ovariellen Hormone (Östrogen und Progesteron), welche die Proliferation und Differenzierung des Brustepithels steuern, diskutiert (Kaaks et al. 2005, Russo und Russo 2006). Folge ist ein abnormes Zellverhalten, welches mit einer unkontrollierten Proliferation und dem Verlust der Differenzierungsfähigkeit und Kontaktinhibition als entscheidendes Charakteristikum im Vergleich zu einer physiologisch normalen Zelle einhergeht (Hanahan und Weinberg 2000). Auch genetische Veränderungen können zur Kanzerogenese beitragen. Inzwischen sind eine Vielzahl von Genen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind bekannt. Somatische oder sporadische genetische Veränderungen betreffen dabei nur einzelne Zellen. Dennoch reicht eine Mutation eines Gens nicht aus, um eine Zelle entarten zu lassen. So werden mehrere Mutationen eines Zellklons über einen langen Zeitraum erworben.

Das *Stufenmodell der Kanzerogenese* von Fearon und Vogelstein beschreibt die Tumorentstehung als schrittweise Ansammlung einer Vielzahl genetischer Veränderungen. Am Beispiel der Adenom-Karzinom-Sequenz zeigt sich, dass sich die meisten kolorektalen Karzinome über Stufen genetischer Mutationen (KRAS-Gen, APC-Gen) vom Adenom zu Karzinomen entwickeln (Fearon und Vogelstein 1990). Auch für die Entstehung des Mammakarzinoms wird ein analoger Prozess angenommen (Wellings et al. 1975, Shackney and Silverman 2003).

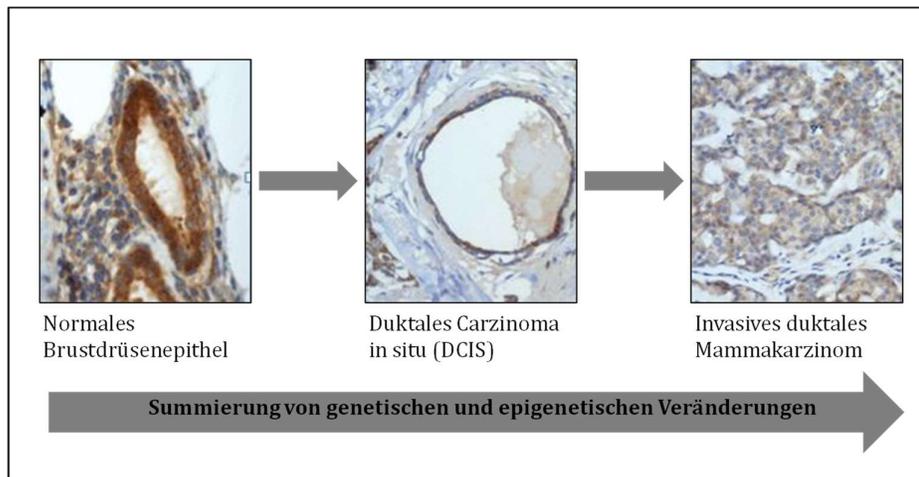


Abb. 1: Klassisches Stufenmodell der Kanzerogenese

Entstehungsmodell eines invasiven Mammakarzinoms ausgehend vom normalen Brustdrüsenepithel über benigne epitheliale Veränderung zum duktalem Karzinoma in situ und schließlich einem invasiven duktalem Mammakarzinom (IHC_Bilder BC3, BC 187, BC 355, nach Agnatis et al. 2004)

Die in der Literatur beschriebenen *Onkogene* kodieren für Transkriptionsfaktoren, Zelladhäsionsproteine oder sind an Signaltransduktionswegen beteiligt (Sjoblom et al. 2006, Wood et al. 2007). Die größte Gruppe bilden dabei die *Tyrosinkinassen*. Das menschliche Genom enthält 90 Tyrosinkinassen von denen 58 Rezeptor-Tyrosinkinassen (RTKs) kodieren. Alle RTKs bestehen dabei aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, an die ein Ligand bindet. Zudem bestehen die RTKs aus einer membrandurchgängigen hydrophoben Domäne und einem C-terminalen intrazellulären Anteil, der die katalytische Tyrosinkinasedomäne enthält. RTKs werden nach den strukturellen Gesichtspunkten ihrer extrazellulären Domänen in 20 Unterfamilien eingeteilt (Robinson et al. 2000). Prominente Vertreter dieser Familien sind die EGFR, VEGFR und RET Subfamilien. Das am häufigsten amplifizierte Onkogen beim Mammakarzinom ist der *HER2*- Wachstumsfaktorrezeptor (Marks et al. 1994). Die Membran-RTK ist Teil der EGRF-Genfamilie und auf Chromosom 17q21 lokalisiert. HER2 wird in einer Vielzahl von Körperzellen exprimiert und ist ein wichtiger Mediator für die Zellproliferation und Differenzierung, sowie Stoffwechselvorgänge der Zelle (Press et al. 1990).

Während benigne Läsionen der Brust keine Onkogenamplifikationen vorweisen, ist die HER2-Amplifikation in der Hälfte der duktalem in-situ bzw. in etwa 20-25% der invasiv duktalem Karzinomen nachweisbar (Park et al. 2006; Burkhardt et al. 2010). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die beobachtete HER2-Genamplifikation eine Rolle in der Anfangsphase der lokalen Proliferation und Initiation der

Tumorentstehung spielen könnte. Außerdem scheint die HER2-Genamplifikation nur bei bestimmten Tumorsubtypen wichtig zu sein, so tritt bei lobulären in-situ Läsionen so gut wie keine HER2- Onkogenamplifikation auf (Allred et al. 1992).

Nicht alle RTKs besitzen katalytische Aktivität und können die intrazelluläre Signaltransduktion direkt regulieren. Unter den RTKs sind 4 *Pseudokinasen* (HER3, EphA10, EphB6 und PTK7) bekannt, die eine veränderte Aminosäuresequenz des katalytischen Zentrums aufweisen und somit als inaktive Kinasen bezeichnet werden (Boudeau et al. 2006).

Neben Onkogenen sind außerdem *Tumorsuppressorgene*, wie beispielsweise BRCA1 und BRCA2, an der Mammakarzinom-entstehung beteiligt. Dabei handelt es sich meistens um Keimbahnmutationen, die zur Störung der supprimierenden Regulation des Zellwachstums und damit zur ungehemmten Zellproliferation führen (Kinzler et al. 1997). 5-10% aller Mammakarzinompatientinnen weisen eine vererbte Mutation auf, wobei ein Großteil durch die DNA-Reperaturgene BRCA1 und BRCA2 verursacht werden. Diese Keimbahnmutationen mit hoher Penetranz sind mit einem hohen Lebenszeitrisiko für das Mamma- und Ovarialkarzinom assoziiert (Oesterreich und Fuqua 1999).

Neben dem beschriebenen linearen Modell der Kanzerogenese, existieren weitere Theorien hinsichtlich der Entstehung eines Mammakarzinoms (Ladanyi et al. 2011). Das *klonale Modell der Tumorentstehung* besagt, dass eine normale Zelle auf dem Weg zur Tumorzelle viele Mutationen akkumuliert, die einen Selektionsvorteil hinsichtlich des Überlebens bieten und so zum Fortschreiten der Kanzerogenese führen (Nowell et al. 1976). Durch genetische Instabilität und unkontrolliertes Wachstum kommt es zur Tumorprogression, die Zellen mit weiteren Mutationen und veränderten Eigenschaften hervorbringt. Weiterhin wird angenommen, dass durch den Selektionsdruck Subpopulationen entstehen, welche die Heterogenität eines Tumors erklären (Ladanyi et al. 2011).

Ein weiteres Modell wird als *Tumor-Stammzell-Hypothese* bezeichnet, welches auf der Annahme beruht, dass eine Tumorzelle aus einer Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften hervorgeht. In Frage kommen zum einen mutierte Progenitorzellen, die sich im Übergangsstadium zwischen Stamm- und differenzierter Zelle befinden und Selbsterneuerungspotential besitzen. Zum anderen wird diskutiert, dass Tumorstammzellen von differenzierten Zellen stammen, die die Fähigkeit besitzen sich in Stammzell-ähnliche Zellen umzuwandeln. Möglicherweise

können sie durch diese Eigenschaft im Rahmen der Brustzellendifferenzierung unterschiedliche Zelltypen bilden, welche zum Fortschreiten der Erkrankung führen und somit zur Tumorprogression (Ladanyi et al. 2011).

1.2 Tumorprogression und Metastasierung

Die *Metastasierung* (griechisch *metastasis*, Wanderung) ist ein komplexes und mehrstufiges Geschehen. Fidler et al. postulierte, dass ein Tumor erst erfolgreich an einem zweiten Ort ansiedeln kann, nachdem die Tumorzelle eine Metastasierungskaskade durchlaufen hat. Die Metastasenbildung besteht aus den Schritten der Invasion mit Intravasation der Lymph- und Blutgefäße, Dissemination der Tumorzellen im Organismus, Anhaftung und Extravasation, sowie Metastasenwachstum im Zielorgan (Fidler et al. 1990). Dabei beginnt die metastatische Kaskade durch den Verlust von Zelladhäsionsmolekülen wie z.B. E-Cadherin mit der Loslösung von malignen Zellen aus dem Epithelverbund (Micalizzi et al. 2010). Die Proteolyse der extrazellulären Matrix z.B. durch Matrix-Metalloproteinasen, sowie eine erhöhte Motilität der Karzinomzellen führt letztlich zur Intravasation ins Blutgefäßsystem (Gialeli et al. 2011). Dabei steht die metastasierende Tumorzelle im ständigen Austausch mit dem umgebenden Tumorstroma. Somit spielen für das Metastasierungsverhalten eines Karzinoms, sowohl das Migrationsverhalten und die Plastizität der Tumorzellen, wie auch das tumorumgebende Mikromilieu eine entscheidende Rolle (Sund und Kalluri 2009). Darüberhinaus können im Primarius auch Blutgefäße neu gebildet werden (Angiogenese), über die die Tumorzellen ebenfalls den Primärtumor verlassen und in den Blutkreislauf eintreten können. Systemisch zirkulierende maligne Zellen müssen der körpereigenen Abwehr entgehen und werden zudem mechanischen Scherkräften ausgesetzt, so dass der Prozess der Metastasierung als ineffizient angesehen wird (Fidler et al. 2003). Aktuelle DNA-Microarray Studien zeigen, dass Primärtumore, welche Metastasen entwickeln bereits frühzeitig durch ihr Genexpressionsprofil von denen, die lokal destruierend wachsen unterschieden werden können. Somit ist eine Risikostratifizierung bezüglich des Metastasierungsrisikos und eine individuelle Therapieentscheidung in frühen Stadien der Erkrankung möglich geworden (Bernards et al. 2002, van t'Veer et al. 2002).

1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom

1.3.1 Faktoren mit gesicherter klinischer Relevanz

Es gibt nur wenige Prognosefaktoren mit gesicherter klinischer Relevanz. Diese sollten daher obligat bei jedem Mammakarzinompatienten zum Zeitpunkt der Primärtherapie bestimmt werden (Friedrichs und Mundhenke 2011).

Der Befall der *lokoregionären Achsellymphknoten* ist beim primären Mammakarzinom der bislang aussagekräftigste und stärkste prognostische Faktor. Wobei sowohl die Tatsache korreliert, ob überhaupt ein Befall der axillären Lymphknoten vorliegt, als auch die Anzahl der Lymphknotenmetastasen mit dem Rezidivrisiko bzw. Gesamtüberleben (Fisher et al. 1983).

Auch die *Tumorgröße* ist ein bedeutender prognostischer Faktor beim Mammakarzinom, wobei kleine Tumoren (<1cm) meist eine sehr gute Prognose haben. Im Allgemeinen steigt mit wachsender Tumorgröße die Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung der axillären Lymphknoten und der Entwicklung eines Rezidivs (Rosen et al. 1989). Dabei sind Tumorgröße und axillärer Lymphknotenstatus unabhängige, additive Prognosefaktoren, da mit zunehmender Tumorgröße unabhängig vom Lymphknotenstatus, als auch steigender Anzahl befallender Lymphknoten unabhängig der Tumorgröße die Überlebenschancen sinkt (Carter et al. 1989). Prognostische Aussagekraft bei den morphologischen Kriterien haben neben dem *histologische Tumortyp*, auch das *Grading* des Tumors. Dabei sind seltene Tumorsubtypen, wie das tubuläre, papilläre oder medulläre Mammakarzinom, mit einem geringerem metastatischen Potential, sowie einer besseren Prognose verbunden (Ellis et al. 1992). Auch haben sehr gut differenzierte (G1) Karzinome eine bessere Prognose als schlecht differenzierte (G3) Tumore der Mamma. Die klinische Relevanz wird aber durch die Tatsache eingeschränkt, dass etwa nur 10% der Patientinnen G1-Tumore entwickeln. Die Mehrzahl der Mammakarzinompatienten hat einen G2 (55,5%) oder G3 (32,2%) Tumor (Tumorregister München 2011). Das *Patientenalter* besitzt ebenfalls einen prognostischen Wert, wobei sehr junge Patientinnen (<35 Jahre) eine schlechte Prognose haben, die möglicherweise ein Auswirkung der Tumorbiologie im Sinne aggressiverer Tumoren ist (Nixon et al. 1994; Bonnier et al. 1995). Neben der prognostischen Bedeutung der *Steroidhormonrezeptore (HR)*, die mit Dauer der Nachbeobachtungszeit abnimmt, wird der ER- und PR-Status vielmehr als prädiktiver

Faktor für das Ansprechen der endokrinen Therapie gewertet (Marks et al. 1994, von Minckwitz et al. 2005). Hormonsensible Karzinome (ER- und/oder PR- positiv) stellen mit etwa 80% die Mehrzahl der Fälle dar, wobei der Nachweis des HR-Status Voraussetzung für die Behandlung mit einer endokrinen Therapie ist. Die prognostische Aussagekraft des *HER2-Status* ist noch nicht abschließend geklärt. Eine HER2-Überexpression ist in der Regel mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung und einer verkürzten Überlebenszeit verbunden (Press et al. 1997). Allerdings konnte eine wesentliche prädiktive Bedeutung von HER2 bezüglich des Ansprechens auf eine Therapie mit anti-HER2-gerichteten Therapiesubstanzen wie z.B. Trastuzumab (Herceptin®) (Slamon et al. 2001) gezeigt werden.

Neben den gesicherten, „klassischen“ Prognosefaktoren werden weitere zusätzliche Kriterien für den klinischen Einsatz diskutiert, die sich mit morphologischen, zellkinetischen oder genetischen Aspekten beschäftigen. Jedoch konnte bisher nur bei wenigen Faktoren der klinische Nutzen durch entsprechende Studien nachgewiesen werden. Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von *uPA/PAI1*, wiesen Look et al. nach, dass hohe Konzentrationen im Primärtumor mit einem höheren Metastasierungsrisiko und kürzeren Gesamtüberleben korrelieren (Harbeck et al. 1999, Look et al. 2002, Harbeck et al. 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *uPA/PAI1* vor allem bei nodalnegativen Brustkrebspatientinnen als Entscheidungskriterium hinsichtlich einer Chemotherapie eingesetzt werden kann.

So weisen Patientinnen mit hohen Werten einen deutlich größeren Nutzen von einer adjuvanten Chemotherapie als solche mit niedrigem *uPA/PAI1* (Look et al. 2002, Harris et al. 2007). Die klinische Bedeutung weiterer neuer Prognosefaktoren, wie dem zellkinetischen Parameter *Ki-67* ist noch nicht hinreichend geklärt. *Ki-67* ist ein Protein, das während der Zellteilung exprimiert wird und mittels monoklonalem Antikörper MIB-1 immunhistochemisch nachgewiesen werden kann (Gerdes et al. 1983). In multivariaten Analysen zeigt sich *Ki-67* als wichtiger prognostischer Marker. In aktueller Diskussion stehen der klinisch relevante Schwellenwert von *Ki-67*, sowie methodische Probleme bei der Bestimmung des Parameters (Sahin et al. 1991; Pietiläinen et al. 1996; Azambuja et al. 2007).

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten prognostischen (Prog.) und prädiktiven (Präd.) Faktoren beim Mammakarzinom (nach Tumormanual, Tumorzentrum München 2013).

	Prog.	Präd.
Alter < 35 Jahre ungünstig	X	
Menopausenstatus	X	X
TNM-Status:		
-T: Tumorgroße	X	
-N: axillärer Lymphknotenbefall	X	(X)
-M: Fernmetastasen	X	
Histologischer Tumortyp	X	
Grading	X	
Hormonrezeptoren (ER/PR)	X	X
HER2	X	X
uPA/PAI	X	X
Ki-67	X	(X)

1.3.2 Die Proteintyrosinkinase 7 (PTK7)

Die *Proteintyrosinkinase 7* (PTK7) wurde 1995 in Kolonkarzinomzellen identifiziert und ist deshalb auch unter *Colon carcinoma kinase 4* (CCK4) bekannt (Mossie et al. 1995). RTK-analog, besteht PTK7 aus einem N-terminalen Signalpeptid und sieben Immunglobulin Domänen als extrazelluläre Regionen, einer transmembranären Domäne und einer C-terminalen Region. Das PTK7 Polypeptid ist insgesamt aus 1070 Aminosäuren aufgebaut, mit einem Molekulargewicht von 118,5 kDa. Da der Ligand von PTK7 noch nicht identifiziert ist, wird das Protein auch als Orphanrezeptor bezeichnet (Jung et al. 2002). Aus phylogenetischer Sicht ist PTK7 in verschiedenen Arten wie der Drosophila (*off track, OTK*), dem Huhn (*kinase-like gene, KLG*) oder der Maus (*PTK7*) zu finden. Dabei beeinflusst PTK7 als Ligand des Wnt-Signalwegs Embryo- und Kanzerogenese (Lu et al. 2004).

Die Wnt-Familie, welche eine essentielle Rolle in der Entstehung von Tumoren spielt besteht aus 19 Proteinen, deren Bindung dieser Glycoproteine an spezifische Frizzled (Fzd) -Rezeptoren und Ko-Rezeptoren drei unterschiedliche Signalkaskaden initiiert. Je nach Wnt/Fzd-Interaktion werden der *canonical Wnt/β-Catenin*, *non-canonical Wnt/Ca²⁺* und *planar cell polarity (PCP)-Signalweg* unterschieden (Camilli et al. 2010). Der am besten erforschte canonical Wnt/ β-Catenin-Weg reguliert durch den Abbau und Akkumulation des als Transkriptionsfaktor fungierenden β-Catenins

Proliferationsprozesse in der Zelle, sowie auch Zell-Zell-Kontakte. Eine erhöhte β -Catenin-Konzentration ist assoziiert mit einer Aktivierung mitogener Gene, wie für das Mamma- und Zervixkarzinom beschrieben (Camilli et al. 2010).

Bei den non-canonical Wnt-Signalwegen erfolgt eine Regulierung der Transkriptionsaktivität unabhängig der β -Catenin Konzentration. So ist für die Regulierung des Wnt/PCP Signalwegs, welcher u.a. die Zellpolarität von Epithelzellen während der Embryogenese reguliert, die Bindung der Wnt-Glycoproteine an die Zellmembran von entscheidender Bedeutung (Wang et al. 2006). Eine Fehlregulation dieser embryogenetischen Differenzierungsprozesse findet sich im Zusammenhang mit der Kanzerogenese, beispielsweise beim Magen- und Bronchialkarzinom und ist mit den Zellinvasion und Metastasierung assoziiert (Kathoh 2005, Wang et al. 2006). Eine Interaktion von PTK7 wird vor allem für den PCP-, aber neuerdings auch für den *canonical* Wnt/ β -Catenin-Signalweg beschrieben. Dabei ist PTK7 an der Rekrutierung von *Dishevelled* (Dsh) an die Zellmembran und somit als Ko-Rezeptor beteiligt.

Shnitsar et al. wiesen nach, dass Mausembryonen mit mutiertem PTK7, perinatal Neuralrohr- und Innenohrdefekte zeigen. Diese Beobachtungen unterstreichen die wichtige Rolle von PTK7 im *non-canonical* Wnt/PCP-Signalweg und der damit vermittelten Zellmotilität (Shnitsar und Borchers 2008).

Für den *canonical* Wnt/ β -Catenin-Pfad wurde eine Interaktion der funktionell inaktiven Tyrosinkinasedomäne von PTK7 mit β -Catenin beobachtet. Eine verminderte Expression von PTK7 führt dabei zu einer niedrigeren Transkriptionsaktivität im Wnt3a/ β -Catenin Signalweg (Puppo et al. 2010). Darüber hinaus wiesen Peradziryi et al. die Interaktion von PTK7 zwischen den *canonical* und *non-canonical* Wnt-Signalkaskaden nach, bei der PTK7 den Wnt/ β -Catenin-Weg unterdrückt, während es den Wnt/PCP-Pfad über eine Koaktivierung des Fzd-Rezeptors aktiviert (Peradziryi et al. 2012). Dies könnte ebenfalls zu Motilitätssteigerung führen und somit eine Grundlage bei der Aktivierung der Kanzerogenese spielen.

In der bisherigen Literatur zeigt sich ein kontroverses Bild hinsichtlich der Bedeutung von PTK7. In Zelllinienversuchen war eine hohe PTK7 Expression beim intrahepatischen Cholangiokarzinom mit einem aggressiveren Proliferations- und Invasionsverhalten der Tumorzellen assoziiert (Jin et al. 2014). Im Widerspruch dazu stehen Daten aus einer Metaanalyse beim Lungenkarzinom. Hier führte eine RNA-Interferenz zur Abschwächung der PTK7-Expression und somit zu einem kürzeren Überleben durch Induktion einer erhöhten Apoptoserate (Chen et al. 2014).

In Mammakarzinomzelllinien konnten Gärtner et al. einen Einfluss von PTK7 auf die Motilität und Invasivität von Tumorzellen nachweisen und ihre vitro-basierten Daten anhand von Frischgewebe bestätigen (Gärtner et al. 2014). Dies zeigten auch andere Studien an Tumorgewebe. Eine Überexpression von PTK7 konnte in soliden Tumoren, wie dem Lungen- und dem Kolonkarzinom, sowie auch in hämatologischen Erkrankungen, wie der akut myeloischen Leukämie (AML) und der T-Zell akut lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) nachgewiesen werden (Saha et al. 2001, Endoh et al. 2004, Prebet et al. 2010, Jiang et al. 2012).

Allerdings zeichnet sich eine kontroverse Datenlage für das Überleben von Patienten im Zusammenhang mit der PTK7-Expression im Tumor ab. Während sich beim Magenkarzinom und pulmonalen Adenokarzinom eine erhöhte PTK7-Expression eher günstig auf das Überleben der Patienten auswirkte, konnten Prebet et al. eine Expression von PTK7 in der myeloische Vorläuferzellen (CD34+, CD38-), sowie primären AML Blasten im Knochenmark nachweisen (Lin et al. 2012, Endoh 2004, Prebet et al. 2010). Lymphatische, sowie Zellen der Erythropoese und Granulopoese zeigten hingegen keine PTK7 Expression. Dabei hatten AML Patienten mit hohen PTK7 Werten eine schlechte klinische Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens und Leukämie-freien Überlebens, so dass PTK7 als unabhängiger prognostischer Parameter gewertet wurde. Prebet et al. stellten die Hypothese auf, dass neben der prognostischen Wertigkeit von PTK7, hohe PTK7 Expressionslevel eine Resistenz bei der Firstlinientherapie mit Anthrazyklinen in vivo hervorruft (Prebet et al. 2010). Weitere Zusammenhänge zwischen der Apoptose, sowie der VEGF-induzierten Angiogenese weisen auf die entscheidende Rolle der PTK7 bezüglich der Kanzerogenese hin, obwohl die genauen Mechanismen noch ungeklärt sind (Shin et al. 2008, Meng et al. 2010).

1.4 Systemische Therapieoptionen des frühen Mammakarzinoms

Die systemische Therapie ist neben der Operation und Strahlentherapie ein wichtiger Bestandteil im multimodalen Behandlungskonzept des Mammakarzinoms. Je nach Risikoprofil wird dabei eine neoadjuvante oder adjuvante Therapie eingesetzt. Eine eindeutige Indikation zur neoadjuvanten Chemotherapie (NACT) besteht gemäß aktueller S3-Leitlinie 2017 vor allem bei Luminal-B Tumoren (HR positiv mit hoher Proliferationsrate) mit Charakteristika, wie mehr als 3 befallenen Lymphknoten oder

agressiver Tumorbiologie (Grading G3, hohes Ki-67, hohes Risiko im uPA/PAI1). Eine (neo)adjuvante Therapie sollte ebenfalls bei TNBC und HER2 positiven Tumoren ab einer Tumorausdehnung über 0,5cm durchgeführt werden (S3-Leitlinie, 2017). Die Entscheidung womit systemisch therapiert wird, wird individuell diskutiert und hängt von der Tumorbiologie des Mammakarzinoms ab. Nach den aktuellen Empfehlungen kommt in Abbildung 2 aufgeführter Algorithmus zum Einsatz.

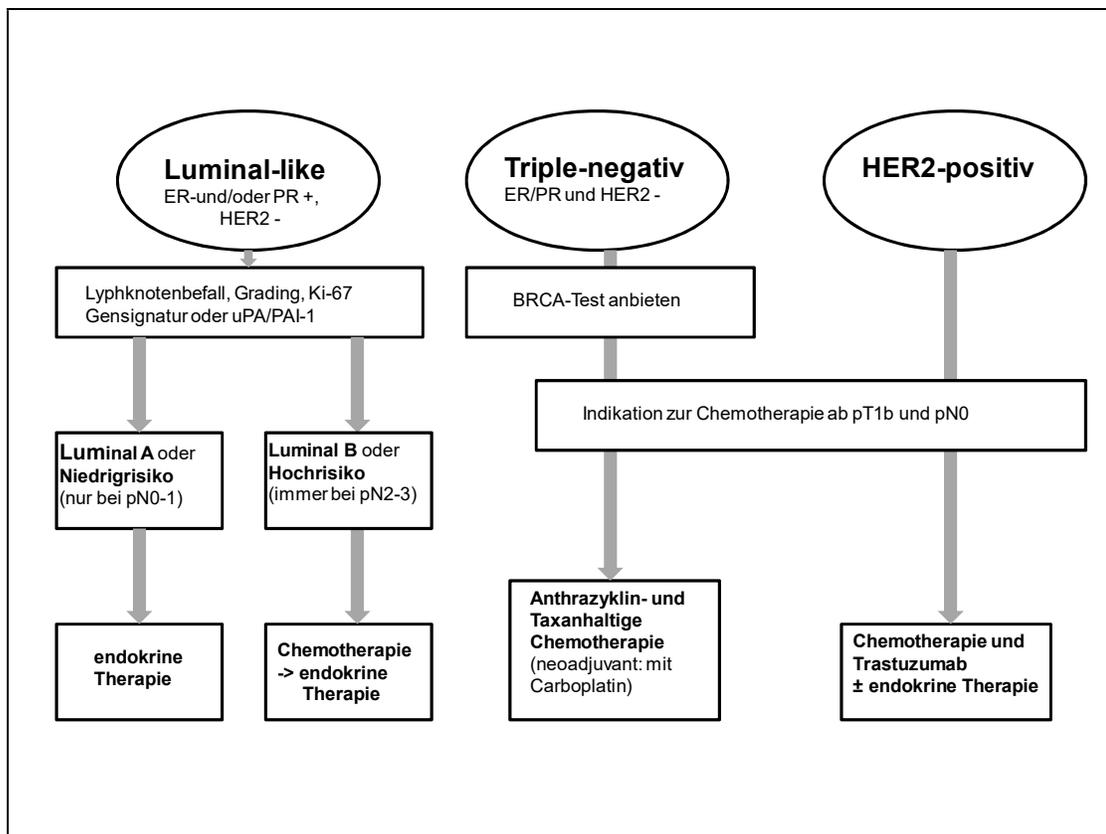


Abb.2: Therapiekonzepte beim frühen Brustkrebs (adaptiert nach Harbeck und Gnant 2017).

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals die PTK7-Expression bei 126 Mammakarzinom erkrankten Patienten, sowohl im Primärtumor, als auch in einem korrespondierenden axillären Lymphknoten mittels molekularbiologischer Nachweismethoden (PCR) und Immunhistochemie gemessen werden.

Eine Überexpression von PTK7 konnte in verschiedenen soliden Tumoren wie dem Magen-und Kolokarzinom (Lin et al 2012, Mossie et al. 1995), wie Tumoren des hämatopoetischen Systems (Prebet et al. 2010) detektiert werden, die Rolle von PTK7 im Mammakarzinom ist jedoch unklar.

1. Bei bisher ausstehenden Empfehlungen zum Nachweis von PTK7 sollen PCR und IHC als mögliche Methoden hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit zur PTK7-Detektion verglichen werden.
2. Ferner soll die klinische Bedeutung von PTK7 im Primärtumor und Lymphknoten unter Berücksichtigung klinisch-histopathologischer Parameter, sowie hinsichtlich rezidivfreier und Gesamtüberlebenszeit der Patienten analysiert werden.
3. Als weiteres Ziel war die Evaluation einer durch Prebet et al. vorgeschriebenen hypothetischen Anthracyclinresistenz in PTK7 überexprimierenden Zellen (Prebet et al. 2010). Durch Unterteilung des Kollektivs anhand der durchgeführten Chemotherapie in Subgruppen, sollen spezifische Unterschiede untersucht werden. Zusammenfassend war von Interesse, ob die PTK7-Expression einen prognostischen Faktor beim Mammakarzinom darstellt.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patientenauswahl

Die Durchführung dieser Studie erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München durch Prof. Dr. W. Eisenmenger am 23.08.2011 (Projekt-Nr. 335-11). Alle Patientinnen hatten nach eingehender Aufklärung der Probenasservierung schriftlich zugestimmt.

3.2 Datenerhebung

Die Tumorproben von 126 Patienten mit Mammakarzinom, die sich im Zeitraum von Januar 2006 bis Januar 2010 im Rotkreuzklinikum Frauenklinik München unter der Leitung von Prof. Dr. med Eiermann einer operativen Therapie unterzogen, wurden retrospektiv untersucht. Die Indikation zur operativen Therapie war aus onkologischer Notwendigkeit bedingt; die onkologische Sicherheit wurde durch die Probengewinnung nicht gefährdet.

Die histologische Aufarbeitung und Beurteilung aller Tumorexidate und ipsilateralen axillären Lymphknoten erfolgte in der pathologischen Gemeinschaftspraxis Dr. med Bernhard Högel, Dr. Dr. med Clemens Becker und Dr. med Michaela Beer.

Alle Patientendaten, einschließlich Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Tumordifferenzierung, Menopausen-, Lymphknoten-, Fernmetastasen-, und Rezeptorstatus, stammen aus den individuellen Patientenakten der Frauenklinik. Die klinischen Follow-up Daten wurden ebenfalls diesen Patientenakten entnommen und durch Kontakt von Patienten und Angehörigen vervollständigt.

Die Datenanalyse umfasste Patientinnen mit den folgenden Kriterien:

- Histologisch gesichertes invasives Mammakarzinom
- Operationszeitraum Januar 2006 bis Januar 2010
- Ausreichende Menge an archiviertem invasiven Tumormaterial des Primärtumors (Frischgewebe -80°C und paraffin-eingebetteter Tumorblock)
- Ausreichende Menge an archiviertem Material des ipsilateralen axillären Lymphknoten (Frischgewebe -80°C und paraffin-eingebetteter Tumorblock)

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Operative Präparatgewinnung und Gewebeprozessierung

Die Proben von Patienten mit schriftlicher Zustimmung wurden nach stadiengerechter Entfernung des malignen Gewebes (Primärtumor und Lymphknoten) im Rahmen der histopathologischen Beurteilung asserviert- sowohl in Form von Frischgewebe (-80°C), als auch in Paraffinblöcken. Die weitere Verarbeitung des Frischgewebes fand zeitnah im Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekularbiologie, in Martinsried statt.

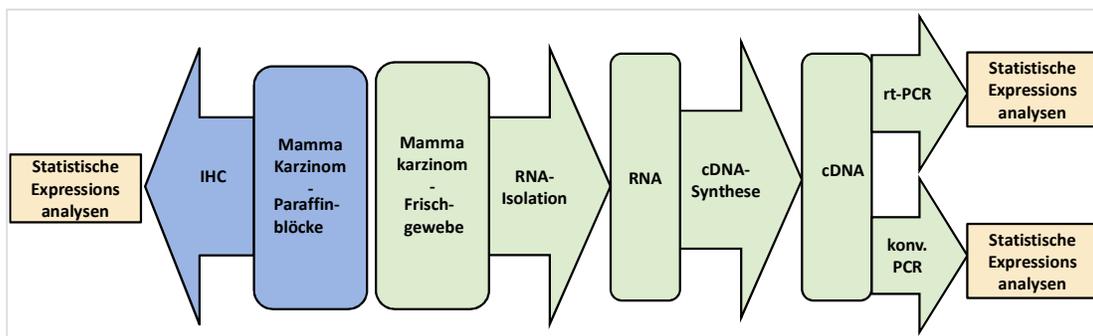


Abb 3: Übersicht Patientenmaterialien und Methoden

Mammakarzinomgewebe (Primärtumore und Lymphknoten) wurden immunhistochemisch (blau) oder molekularbiologisch (grün) weiterverarbeitet.

3.3.2 RNA-Extraktion

Die angewandte RNA-Isolierung basiert auf der von Chomczynski et al. beschriebenen single-step Methode, welche heutzutage die wichtigste Methode der RNA-Isolierung in der Molekularbiologie darstellt (Chomczynski und Sacchi 1987).

Als Lösungsmittel kam Diethylpyrocarbonatwasser (DEPC-dH₂O) zum Einsatz. Für die RNA-Extraktion wurde das zuvor zerkleinerte Gewebe in 4 ml Denaturierungslösung mittels der Schüttelplatte (Hoefer Scientific, San Francisco, USA) bei Raumtemperatur (RT) homogenisiert.

Die Denaturierungslösung enthielt folgende Zusammensetzung:

Tabelle 2: Zusammensetzung der Denaturierungslösung.

Reagenzien	pro 500ml
4 M Guanidiumthiocyanat (GTC)	250 mg
25mM Natriumcitrat, pH 7,0	17,6 ml
0.5% N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	26,4 ml
Aquadest (dH ₂ O)	293 ml
0.1 M β-Mercaptoethanol	3,5 ml

Alle aufgeführten Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen. Dem Homogenisat wurden zunächst 1/10Vol 2M Natriumacetat (pH 4.0), um den Anteil genomischer DNA zu reduzieren, beigefügt. Weiterhin wurden der Reihe nach 1/5 Vol Chloroform-Lösung (500 ml Chloroform + 20 ml Isoamylalkohol, alle Reagenzien von Merck, Darmstadt, Deutschland) und 1 Vol wässriges Phenol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugeführt und 5 min bei 4°C inkubiert.

Nach Zentrifugation (4000 rpm, 1 Stunde, 4°C) und vollständiger Phasenbildung wurde die wässrige Phase, zur weiteren RNA-Isolation abgenommen. Zur Präzipitation der RNA wurde das gleiche Volumen Isopropanol zugegeben, 1 Stunde bei -20°C inkubiert und dann abzentrifugiert (4000 rpm, 1 Stunde, 4°C). Das RNA-Pellet wurde in 1 ml Denaturierungspuffer gelöst und ein zweites Mal mit 1 ml Isopropanol gefällt. Anschließend wurde das Pellet in 80% Ethanol gewaschen, durch vortexen vermischt und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, RT). Nachdem das Pellet bei RT getrocknet war, wurde es in 400 µl RNase freies Wasser resuspendiert (Vortex, 10 min). Die Konzentrationsbestimmung (c) der RNA erfolgte mit einem Photometer (Eppendorf AG, Wessling-Berzdorf, Deutschland), in dem die optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen (λ) $\lambda = 260$ nm (OD_{260}) und $\lambda = 280$ nm (OD_{280}) ermittelt wurde. Die RNA-Konzentration errechnet sich aus der OD_{260} , der Verdünnung (V) und einem für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor ($F=40$).

$$c [ig/ml] = OD_{260} \times V \times F$$

Aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} erhält man eine Aussage über mögliche Proteinkontaminationen der Lösung. Reine Lösungen sollten ein Verhältnis von 1,9-2,0 aufweisen. Desweiteren diente zur Qualitätsbestimmung der RNA eine Agarosegel-Elektrophorese mit 2 µg RNA. Als Gel kam ein 1% Agarosegel mit folgenden Substanzen zum Einsatz:

Tabelle 3: Zusammensetzung des 1% Agarosegels.

Reagenzien	Hersteller
0.4 g Agarose	BRL, Eggstein, Deutschland
40 ml 1x TAE, pH 8	Merck, Darmstadt, Deutschland
2 µl Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Für den Gellauf fügte man je Probe 9 µl DEPC-H₂O, 2 µl Ladepuffer (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und 2 µl RNA hinzu, denaturierte das Gemisch bei 70°C für 5 min, transferierte die Proben in die Geltaschen und ließ das Gel bei 60 V, 100 mA,

30 min laufen. Bei intakter RNA waren im Gel deutlich zwei getrennte Banden im Verhältnis 2:1 zu erkennen, die der 28 S- und 18 S-ribosomaler RNA entsprachen. Zur weiteren cDNA Synthese wurden nur Proben verwendet, die eine 28 S/18 S Ratio größer als 2 und keine Anzeichen einer DNA Kontamination oder RNA Degradation aufwiesen.

3.3.3 c-DNA Synthese

Zur reversen Transkription der gesamten RNA aus Frischgewebe benötigte man etwa 5 µg Total-RNA, zu der dH₂O bis zur einem Gesamtvolumen von 7,5 µl und 1,5 µl Oligo-dT-Primer hinzupipettiert wurden. Die Lösung wurde für 3 min bei 70°C in den Thermoblock (Hoefer Scientific, San Francisco, USA) gestellt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte die cDNA-Synthese zu der folgende Substanzen zugegeben wurden:

Tabelle 4: Substanzen zur cDNA-Synthese.

Reagenzien	Hersteller
4 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer	Roche, Mannheim, Deutschland
1 µl RNase-Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs)	GE Healthcare, München, Deutschland
2 µl 100mM Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt, Deutschland
2 µl AMV Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim, Deutschland

Die Reverse Transkriptase aus dem avian myoblastosis virus (AMV-RT) ist eine DNA-Polymerase, die RNA- oder DNA-abhängig DNA synthetisiert. Weil ihr Arbeitsoptimum bei 42°C liegt wurde der Ansatz nun für 2 Stunden bei dieser Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mittels Zugabe von 80 µl Tris-EDTA (10/0,1) gestoppt, nochmals in dem Thermoblock bei 72°C für 7 min inkubiert und kurz zentrifugiert. Die Qualität der cDNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde ein 1.5% Agarosegel gegossen und mit 10 µl cDNA versehen, welche zuvor mit 2 µl Ladepuffer (Quiagen, Hilden, Deutschland) beladen wurde (60 V, 250 mA, 30 min). Als nächster Schritt wurde die cDNA denaturiert, indem 10 µl 1 N Natriumhydroxid (NaOH) hinzugefügt wurden und anschließend der pH- Wertmittels der Zugabe von 5 µl 2 N Chlorwasserstoff (HCl) und 5 µl 2 M Tris/HCl (pH 7,5) neutralisiert. Dann folgte die Aufreinigung von cDNA mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dazu wurde zur Probe

550 µl PB Puffer zugegeben, der gesamte Mix auf die Qiaquick-Säule geladen und für 2 min bei RT zentrifugiert (13000 rpm). Danach erfolgte das Waschen mit PE Puffer (6 ml PB Puffer mit 24 ml Ethanol) und Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, RT). Letztendlich wurde die Säule zur cDNA-Elution in ein neues Eppendorf-Tube überführt und 30 µl Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 8.5) hinzugegeben, für 5 min, bei RT inkubiert und zentrifugiert (13000 rpm, 3 min).

3.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für den Nachweis der mRNA-Expression von wurde sowohl die klassische semiquantitative *PCR* (rtPCR), sowie auch die real-time quantitative *PCR* (qrtPCR) angewandt. Beide PCR Methoden folgen demselben Grundprinzip: Denaturierung, Annealing und Elongation, welche 1985 das erste Mal beschrieben wurden (Saiki et al. 1985).

rtPCR

Bei der rtPCR zum Nachweis der mRNA Expressionslevel im Mammakarzinom, erfolgte zunächst eine Verdünnung der cDNA im Verhältnis 1:10 mit dH₂O. Nun wurde der Mastermix zusammengestellt, der je Probe aus folgenden Substanzen bestand:

Tabelle 5: Zusammensetzung Mastermix.

Reagenzien	Hersteller
10 µl RedTaq PCR Reaction Mix	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
7 µl dH ₂ O	
0.5 µl Primer forward (1:10)	MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
0.5 µl Primer reverse (1:10)	MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Nach dem Pipettieren von jeweils 2 µl cDNA in die PCR-Eppendorf-Gefäße wurde Mastermix bis zu einem Volumen von 20 µl hinzugefügt. Die Bedingungen für die PCR im Thermocycler (Mastercycler; Eppendorf AG, Wessling-Berzdorf, Deutschland) waren:

Tabelle 6: Schritte klassische semiquantitative PCR.

PCR-Schritte	Temperatur (°C), Zeit (sek)
Initialisierung	
Denaturierung	94, 120
Zyklus	
Denaturierung	94, 30
Annealing	Temperatur je nach Gen, 30
Elongation	72, 60
Ende	
Finale Elongation	72, 300
Kühlung	4, 180

Folgende spezifischen Primersequenzen (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) wurden verwendet:

Tabelle 7: Primersequenzen der klassischen semiquantitativen PCR.

Primer	Temperatur (°C)xZyklus	Primersequenzen
PTK7	57°x 34	PTK7-ex 7fwd 5'- GGA AGC CAC ACT TCA CCT AGC AG -3' PTK7-ex11rev 5'-CTG CCA CAG TGA GCT GGA CAT GG -3'
CK19	62°x 24	K19 fwd 5'- GAG GTG GAT TCC GCT CCG GGC A -3' K19 rev 5'- ATC TTC CTG TCC CTC GAG CAG -3'
α-Tub	57°x 28	Tub fwd 5'- AAG TGA CAA GAC CAT TGG GGG AGG -3' Tub rev 5'- GGG CAT AGT TAT TGG CAG CAT -3'

Interner endogener Standard war das housekeeping Gen α -Tubulin, welches bei jedem Lauf zusätzlich integriert wurde. Jedem Set von 10 Gewebeproben wurden jeweils eine Negativ-Kontrolle (dH₂O ohne cDNA) und eine Positiv-Kontrolle beigefügt. Die Positiv-Kontrolle bestand aus humaner Plazenta, die jeweils auch als Referenzgewebe für die spätere Auswertung diente. Zur Längenauftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese wurden 2% ige Agarosegele präpariert. Alle Proben wurden mit je 20 μ l in die Geltaschen geladen. Mit Hilfe eines parallel aufgetragenen 100 bp Längenmarkers (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde die relative Größe des Amplifikats bestimmt. Nach der Laufzeit (30 min, 250 mA, 60 V) wurden die Banden mittels des zugegebenen Ethidiumbromids im UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und wie unter Kapitel 3.5.2 näher ausgeführt, ausgewertet.

qrtPCR

Bei der qrtPCR handelt es sich um eine Weiterentwicklung der bereits ausgeführten rtPCR. Die Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren beruht dabei auf dem herkömmlichen PCR-Prinzip, wobei zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während des PCR-Zyklus möglich ist. Die Fluoreszenz-Messung kann dabei mit unterschiedlichen Methoden ausgeführt werden. Bei unserem Projekt kam die qrtPCR mittels TaqMan-Sonden (TaqMan®, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz. Dabei nutzt man den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), wie er 1988 eingeführt wurde, aus (Cardullo 1988). Für die qrtPCR zum Nachweis der mRNA Expressionslevel aus Frischgeweben wurde der Reaktionsmix zusammengestellt, der je Probe aus folgenden Substanzen bestand:

Tabelle 8: Reaktionsmix der real time quantitativen PCR.

Reagenzien	Hersteller
5 µl Solaris qPCR Master Mix (2x)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
0.5 µl Solaris Primer Probe Set (20x)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
3.5 µl dH ₂ O	

Nach dem pipettieren von je 1 µl der 1:10 verdünnten cDNA in eine 96-well Platte wurde 9 µl Reaktionsmix je Probe hinzugefügt.

Als SteponePlus® Thermo Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt Deutschland) qRT-PCR Programm wurden folgende Einstellungen gewählt:

Tabelle 9: Schritte der real time quantitativen PCR

qrtPCR-Einstellungen	Temperatur (°C)x Zeit (sek)
Enzymaktivierung	95, 900
40 Zyklen	95,15
	95,15
Kühlung	4, 180

Folgende Tabelle zeigt die angewandten Primer und Sonden (Thermo Fisher Scientific):

Tabelle 10: Primersequenzen der real time quantitativen PCR.

Primer	Sequenzen
PTK7	Ptk7 fwd 5' CAGTTCCTGAGGATTTCCAAGAG 3' Ptk7 rev 3' TGCATAGGGCCACCTTC 5'
A-Tub	TubA1A fwd 5' CCGGGCAGTGTTGTAGAC 5' TubA1A rev 3' GTGCCAGTGCGAACTTC 3'
Sonde	Sequenzen
PTK7	Ptk7 5' TCAGCACCAAGCAGAAG 3'
A-Tub	TubA1A 5' CCACAGTCATTGATGAAG 3'

Bei jedem Lauf wurden eine Negativ-Kontrolle (dH₂O), sowie für die relative Quantifizierung α -Tubulin als Referenzgen mit gemessen.

3.4 Immunhistochemie (IHC)

Immunhistochemische Färbemethoden zählen heute zu den Standardverfahren bei der histopathologischen Betrachtung und Diagnostik, dabei wird im Gewebe vorhandenes Antigen mit spezifischen Antikörpern gebunden und diese über ein Enzym, fluoreszierenden Farbstoff oder radioaktivem Element sichtbar gemacht. Zentrales Reagenz aller immunhistochemischen Färbungen sind dabei die Antikörper (Boenisch 2009).

3.4.1 Immunhistochemischer Nachweis von PTK7

Der immunhistochemische Nachweis von PTK7 erfolgte mit Klon R04052, der Firma Atlas Antibodies, Stockholm, Schweden. Zur Visualisierung wurde die Polymerkonjugat-Methode mittels ZytoChem plus HRP one-step Polymer anti-mouse/rabbit/ rat (Zytochem, Berlin, Deutschland) und anschließender Zugabe von Liquid 3,3 Diaminobenzidin (DAB) Chromogen Kit (Biogenex, Californien, USA) verwendet.

Gewebefixierung und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Fixierung von Frischgewebe erfolgte in 4%iger gepufferter Formaldehydlösung (pH 6.9) bei 4°C über Nacht. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben zugeschnitten, in Einbettkassetten überführt und erneut 1 Stunde bei 4°C fixiert. Danach wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser gründlich gewässert

und in den Einbettautomat (Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) gelegt. Dort durchliefen die Gewebeproben zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 70%, jeweils 1 h; 80%, 95%, 2x100%, jeweils 30 min), wurden anschließend in Xylol (1 h) und letztlich in Paraffin (3x 1 h) überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am nächsten Tag wurden die fixierten Gewebeproben aus den Einbettkassetten entnommen und in Paraffinblöcke gegossen, die bis zur weiteren Bearbeitung bei RT aufbewahrt wurden.

Um Paraffinschnitte herzustellen wurden die Blöcke in ein Mikrotom (Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) eingespannt und zu Schnitten von 2-3 µm Dicke verarbeitet. Anschließend wurden die Paraffinschnitte in einem Wasserbad bei 45°C geglättet und auf einen Objektträger (OT) (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) gezogen. Danach erfolgte eine Trocknung der fertigen Proben über Nacht bei 55°C.

Entparaffinieren

Zunächst wurde die Probe durch eine 10 minütige Inkubation in Xylol und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 95%, 70%; je 5 min) deparaffinisiert.

Blockieren der endogenen Peroxidase

Die Detektion erfolgte mit HRP-konjugiertem Antikörper, deshalb musste die endogene Peroxidase vor Beginn der Färbung blockiert werden, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Die Proben wurden mit 3% igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Methanol für 10 min vorbehandelt und anschließend mit Aqua destillata (Aqua dest.) gespült. Dies führte zu einer irreversiblen Inaktivierung von endogener Peroxidase und zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen.

Antigendemaskierungs Methode

Die meisten formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Gewebe benötigen eine Antigendemaskierung bevor man mit der immunhistochemischen Färbung fortfahren kann. Um eine Antigendemaskierung durchzuführen gibt es zwei Verfahren: Hitzeinduziert (HIER) oder enzymatisch. Durch Erhitzen der Schnitte in Citratpuffer (pH 6.0) wurden die Methylenbrücken aufgehoben und die Antigenbindungstelle

wieder freigelegt. Dies erfolgte für 6 min bei kochender Pufferlösung in einem Dampfkochtopf. Die Abkühlung unter fließendem Leitungswasser musste vorsichtig geschehen, um die Gewebe nicht vom Objektträger zu lösen. Anschließend wurden die OT mit Aqua dest. für 10 min gespült, in ein spezielles Coverslip System mit Deckkuvette (Starna, Pfungstadt, Deutschland.) eingebracht und nochmals mit Trishydroxymethylaminomethanpuffer (Trispuffer) 0.01 mM (Scienova, Jena, Deutschland) für 10 min gespült. Der Citratpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 11: Zusammensetzung des Citratpuffer der IHC.

Substanzen Citratpuffer 10x (pH6,0)	Hersteller
6.8 g Citronensäure	Scienova, Jena, Deutschland
43.4 g Trinatriumcitrat	Scienova, Jena, Deutschland
1800 ml Aqua dest	

Inkubation mit dem Primärantikörper PTK7

Nachdem die Waschlösung abgelaufen war wurden die OT mit dem Primärantikörper PTK7, in einer Verdünnung von 1:200, 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend mit Trispuffer für 10 min gespült. Bei jedem Färbvorgang wurde außerdem eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, die ohne Primärantikörper inkubiert wurde, ansonsten aber analog zu den spezifischen immunhistochemischen Färbungen behandelt wurde.

Inkubation mit dem Polymerkonjugat

Zur Detektion des Primärantikörpers wurde, das ZytoChem plus HRP one-step Polymer verwendet. Die OT wurden 30 min bei RT mit dem Polymer inkubiert und anschließend 10 min mit Trispuffer gespült. An dieses Polymer ist Peroxidase (HRP) gebunden, welches zusammen mit dem Chromogen DAB und H₂O₂ als Katalysator ein farbiges (braunes) Endprodukt bildet. Deshalb erfolgte eine 20 minütige Inkubation mit 3 Tropfen der Liquid DAB Chromogen Kit Lösung. Nach der DAB-Inkubationszeit wurden die Positiv-Kontrollen unter dem Mikroskop überprüft, um einen regelrechten Verlauf der Färbung sicherzustellen.

Hämatoxylin Gegenfärbung

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült und 5 Sekunden in Mayer's Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Die Mayer Hämatoxylin Lösung wird allgemein in der immunhistochemischen Färbung als nukleäres

Gegenfärbemittel verwendet. Hämatoxylin wird aus Blauholzextrakt (Haematoxylon campechianum) isoliert und fand seine erste erfolgreiche biologische Anwendung 1865 bei Boehmer (Horobin et al. 2002). Die Intensität kann dabei mittels der Einwirkzeit variiert werden. Die charakteristische blaue Farbe, der mit Hämatoxylin gefärbten Schnitte, tritt erst nach Exposition an Alkalilösungen auf. Deshalb wurden die Präparate nach einer Sekunde in HCL-Alkohol (70%) unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend durchwanderten sie eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%; 100%, Isopropylalkohol; für je 5 sek), Xylol und wurden dann mit einem xylolhaltigem Eindeckmedium Eukitt (VWR, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

3.5 Datenauswertung und statistische Methoden

3.5.1 Einteilung der axillären Lymphknoten

126 Mammakarzinompatienten wurden eingeschlossen, von 117 Patienten wurde auch Lymphknotengewebe analysiert. Um eine Einteilung der axillären Lymphknoten in tumorfrei bzw. -befallen zu treffen, wurde der Lymphknoten nach operativer Entnahme in zwei Hälften geteilt. Der eine Teil wurde zur pathologischen Aufarbeitung, der andere für die molekularbiologische Verarbeitung asserviert. Ein Lymphknoten wurde als tumorbefallen gewertet, wenn dieser histomorphologisch als solcher identifiziert wurde. Molekularbiologisch überprüften wir jeden Lymphknoten durch Bestimmung der CK19-Expression mittels semiquantitativer PCR. Lymphknotenpräparate, die eine Diskordanz bezüglich der histopathologischen Bewertung und CK19-Expression zeigten, wurden einer Reevaluation durch den Pathologen mit erneuter immunhistochemischer Färbung von weiteren Markern zugeführt. Falls dadurch keine eindeutige Zuordnung des Lymphknotenteilstücks möglich war wurde dieses aus der Auswertung herausgenommen.

3.5.2 PCR- Analyse und Auswertung

rtPCR

Zur Auswertung der Elektrophoresegele wurde die Densitometrie eingesetzt. Da den Gelen der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zugesetzt wurde, konnten die DNA Fragmente unter der UV Lampe (Intelligent Dark Box, FujiFilm,

Düsseldorf, Deutschland) detektiert werden. Anschließend konnten diese mit der Image Reader LAS-1000 Pro V 2.6 Software (FujiFilm) eingescannt und mit der Aida Image Analyzer v.4.03 Software (Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet werden. Das Ergebnis der densitometrischen Analyse, bei der für jede Bande gleich große Messfelder verwendet wurden, wurde als Integral zum Hintergrund in Prozent angegeben (Integral-Bkg [%]). Um die relativen Expressionsunterschiede zu detektieren wurde anschließend der Quotient gebildet zwischen Patientenprobe und externer Referenz angegeben.

$$\text{Genexpression Patientenprobe} = \text{Intensität (Gewebe)} / \text{Intensität(humane Plazenta)}$$

qrtPCR

Zur Durchführung der Datenanalyse des qrtPCR Datensatzes kam die $\Delta\Delta C_T$ Methode zur relativen Quantifizierung zur Anwendung (Livak und Schmittgen 2001). Dabei wurde zunächst für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Referenzgens, wozu Tubulin- α verwendet wurde, vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gewebes (Mammakarzinomgewebe bzw. Lymphknoten) subtrahiert:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Gewebe} - C_T \text{ Tubulin}$$

Nach dieser Normierung wurde vom ΔC_T Wert der zu analysierenden Gewebe der Mittelwert einiger gesunden Mammagewebe bzw. Metastasen-freien Lymphknoten, die zur Kontrolle dienten, subtrahiert. Daraus resultierte der $\Delta\Delta C_T$ Wert der einzelnen Proben. Der relative Expressionsunterschied zwischen Karzinomgewebe und gesundem Mammagewebe bzw. nicht befallenem Lymphknoten und Lymphknotenmetastase ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak und Schmittgen 2001).

3.5.3 IHC- Histologische Auswertung und Quantifizierung

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte semiquantitativ unter Berücksichtigung der Färbeintensität und Prozentsatz der angefärbten Tumorzellen. Hierzu wurde das Lichtmikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland) verwendet und mit Hilfe einer dazugehörigen Digitalkamera wurde die Färbung fotografisch dokumentiert. Die Färbeintensität und der Prozentsatz positiver Tumorzellen wurden nach einem Grading-System eingestuft. Hierbei steht 0 für keine zytoplasmatische Färbung Färbung der invasiven

Tumorzellen, 1+ für eine schwache zytoplasmatische Färbung in $\leq 10\%$ der invasiven Tumorzellen, 2+ für eine mittlere zytoplasmatische Färbung in 10-30% der invasiven Tumorzellen, 3+ für eine starke zytoplasmatische Färbung in über 30% der Tumorzellen.

3.5.4 Statistische Methoden

Die für die vorliegende Studie erhobenen Daten wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel Software (Version 2000) erfasst und mit SPSS, Version 19 (SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet.

Die statistische Auswertung und Interpretation fand in Zusammenarbeit mit dem Brustzentrum, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, LMU München, sowie dem Statistiker Dr. Ronald E. Kates statt.

Zur Berechnung signifikanter Zusammenhänge zwischen kategorischen Variablen wurde der exakte Test nach Fisher genutzt. Kontinuierliche Variablen wurden zwischen zwei Gruppen mit dem Zweistichproben-t-Test bzw. dem nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test verglichen. Für nicht normal verteilte Daten mit vielen Bindungen wurde ein exakter Permutationstest verwendet. Zum Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde die einfaktorielle ANOVA verwendet. Der Vergleich von Primärtumor und Lymphknoten Werten innerhalb eines Patienten wurde mit Hilfe des verbundenen t-Tests durchgeführt. Für alle Patienten wurde das Gesamtüberleben vom Zeitpunkt der Operation bis zum Todesdatum bzw. die rezidivfreie Überlebenszeit bis zum Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen erfasst. Patienten, für die kein dokumentiertes Ereignis bzw. keine Follow-up Information vorlag, erhielten am Tag des letzten Kontakts eine Zensur. Die Überlebensdaten wurden mittels Cox-Regression und Kaplan-Meier-Methode analysiert. Zum Gruppenvergleich wurde der Log Rank- Test verwendet. Alle statistischen Tests wurden zu einem zweiseitigen Signifikanzniveau <0.05 mit einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristiken und histopathologische Befunde

126 Patienten unterzogen sich ihrer Primärtherapie bei Mammakarzinom in den Jahren 2006- 2010 im Rotkreuzklinikum Frauenklinik München (Leitung: Prof. Dr. med Eiermann). Bei allen Patienten wurden klinische Daten (Alter, Geschlecht, Menopausenstatus, Follow-up) und etablierte klassische und histomorphologische Prognosefaktoren (TNM-Klassifikation, Tumordifferenzierung, Grading, Steroidhormonrezeptor- und HER2-Status), sowie PTK7 in Primärtumorgewebe und in einem axillären Lymphknoten retrospektiv bestimmt und ausgewertet.

4.1.1 Gesamtkollektiv

Alter

Das Patientenkollektiv bestand insgesamt aus 126 Patienten, wobei davon 122 (96.8%) Frauen und 4 (3.2%) Männer waren. Zum Zeitpunkt der Primärtherapie waren 41 (32.5%) Frauen prämenopausal und 82 (65.1%) postmenopausal. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose der Brustkrebserkrankung lag bei 59.8 (27 und 87) Jahren. Der Großteil der Patienten war zum Operationszeitpunkt zwischen 41 und 60 Jahre alt.

TNM-Status

Für das Tumorstadium wurde bei 40 (31.7%) Patienten ein pT1, bei 63 (50.0%) ein pT2, ein pT3 bei 12 (9.5%) und ein pT4 bei 11 (8.7%) Patienten angegeben. Aufgrund der Notwendigkeit ausreichend Frischgewebe der Patienten zu isolieren, wurden zunächst überwiegend größere Tumore ins Patientenkollektiv eingeschlossen. Dies führte zur Überrepräsentation von fortgeschrittenen Tumorstadien in unserem Kollektiv. Die Tumorerkrankung hatte sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in 95 (75.4%) Fällen auf die regionalen LN ausgedehnt (nodal-positiv), 31 Fälle waren nodal-negativ (24.6%). Von den 95 nodal-positiven Patienten war die Anzahl der befallenen LN bei 47 (37.3%) zwischen 1 und 3, bei 29 (23.0%) zwischen 4 und 9, sowie bei 19 (15.1%) Patienten ≥ 10 . In 7.1% (9) der Fälle waren bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen aufgetreten. Zudem wurde der Schwerpunkt

dieser Arbeit auf metastatisch befallene Lymphknoten (LN+) gelegt, so dass der Großteil der eingeschlossenen Lymphknoten tumorinfiltriert (65.1%) waren. Die klinischen Daten der Patienten zeigt Tabelle 12.

Tabelle 12: Zusammenfassung der klinischen und histologischen Daten der 126 Mammakarzinompatienten.

Gesamtkollektiv, n=126			
mitleres Alter (in Jahren)		59.81 (27-87) Jahre	
klinische und histologische Parameter		Anzahl (No.)	Prozent (%)
Geschlecht	weiblich	122	96.8
	männlich	4	42403
Menopausenstatus	peri-/prämeno	41	32.5
	postmeno	82	65.1
Histopathologischer Subtyp	invasiv-duktral	103	81.7
	invasiv-lobulär	17	13.5
	andere	6	4.8
Tumorgröße/ausdehnung (pT)	T 1	40	31.7
	T 2	63	50.0
	T 3	12	9.5
	T 4	11	8.7
Nodalstatus (pN)	N 0	31	24.6
	N 1	47	37.3
	N 2	29	23.0
	N 3	19	15.1
Fernmetastasen (M)	M 1	9	7.1
	M 0	117	92.9
befundeter Lymphknoten	infiltriert (LN+)	82	65.1
	tumorfrei (LN-)	35	27.8
Grading	G I	9	7.2
	G II	75	69.5
	G III	42	33.3
ER-status	positiv	95	75.4
	negativ	31	24.6
PR-status	positiv	79	62.7
	negativ	47	37.3
Her2neu-status	positiv	23	18.3
	negativ	101	80.2
	unbekannt	2	1.6
Tumorprogression	Fernmetastase	21	16.7
	Lokalrezidiv	3	2.4
	nein	87	69.0

Lymphknotenteilstücke

Alle bei der Operation entnommenen LN wurden vom Pathologen hinsichtlich einer Tumordinfiltration evaluiert. Besonderes Interesse galt dem Lymphknotenteilstück, dessen andere Hälfte zur Gewebeprozessierung und weiteren molekularbiologischen Aufarbeitung herangezogen wurde. Von insgesamt 117 Lymphknotenpräparaten konnten in 89 (76.1%) Fällen die komplementäre Lymphknotenhälfte pathologisch untersucht und bewertet werden.

Wie bei Gärtner et al. erfolgte eine weitere Prüfung des LN-Status anhand der CK19 mRNA-Expression, welches als Epithelzellmarker im LN physiologisch nicht exprimiert wird (Alvarenga et al. 2011, Gärtner et al. 2014, Masuda et al. 2015). Dabei ergaben sich vier diskrepante Fälle (Nr.61LN, Nr.149LN, Nr.160LN, Nr.409LN). In zwei Fällen (Nr. 61LN, Nr.409LN) zeigte sich ein histologisch infiltrierte Lymphknotenteilstück ohne CK19-Expression. Bei Nr.61LN wurde eine histologisch gesicherte Mikrometastase in der komplementären Lymphknotenhälfte des Pathologen beschrieben. Deshalb ist anzunehmen, dass in diesem Fall eine ungleiche Verteilung der Tumorzellen vorlag und die auf CK19-Expression untersuchte Hälfte keine (Mikro-)Metastase enthielt, so dass folglich keine CK19 Expression nachweisbar war. Ein weiterer Fall (Nr.409LN) zeigte eine sehr dünne CK19-Bande, die als keine CK19 Expression gewertet wurde. Beide Präparate wurden aus der Endanalyse genommen.

In zwei Fällen (Nr.160LN, Nr.149LN) war bei histologisch tumorfreiem Lymphknotenteilstück eine hohe CK19-Expression zu verzeichnen. In der immunhistochemischen Nachuntersuchung der entsprechenden komplementären Lymphknotenhälfte bei Nr.160LN wurde jeweils eine Mikrometastase entdeckt. Dieser Fall wurde nachträglich in die Gruppe der pathologisch bestätigten LN-Metastasen eingeordnet. Ein weiterer Fall wies eine geringe CK19-Bande auf, die jedoch von der densitometrischen Messung (nach Abzug des Hintergrundes), nicht detektiert wurde. Deshalb wurde das Präparat der tumorfreien Lymphknotengruppe zugeordnet.

Tumorgrading

Die Häufigkeit der Differenzierungsgrade nach Bloom und Richardson verteilte sich wie folgt, in neun (7.2%) gut differenzierte Karzinome (G1), gefolgt von den schlecht

differenzierten (G3), die in 42 (33.3%) der Fälle gefunden wurden. Mit 75 (59.5%) Patienten war der Großteil der Mammakarzinome mäßig differenziert (G2).

Steroidhormonrezeptorstatus, HER2 -Status

Im Rahmen der Primärdiagnostik wurde die immunhistochemische Bestimmung des ER- und PR- und HER2 -Status, sowie zusätzlich die Untersuchung von HER2 mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) bei IHC 2+ durchgeführt. Dabei war der Großteil der Patienten Hormonrezeptor positiv 78 (60.1%) und/ oder HER2 negativ 101 (80.2%). Betrachtet man den Rezeptorstatus gruppiert, hatten nur wenige Patienten sowohl einen negativen Hormonrezeptorstatus, wie auch einen negativen HER2-Status 17 (13.3%), auch TNBC genannt.

Krankheitsverlauf

Der Krankheitsverlauf wurde bei 111 (94.9%) Patienten dokumentiert. Die Dauer der Beobachtung lag zwischen 11 Tagen und 143.3 Monaten, mit einer medianen Beobachtungsperiode von 73.9 Monaten (letzte Datenerhebung 15. Mai 2011). Neun (8.1%) Patienten verstarben in diesem Zeitraum an ihrem Mammakarzinom.

Weitere 13 (11.7%) entwickelten Fernmetastasen, wobei das metastasenfreie Intervall bei vier (3.6%) weniger als 12 Monate, bei sieben (6.3%) 12 bis 36 Monate und bei zwei (1.8%) mehr als 36 Monate währte.

Die meisten Fernmetastasen wurden im Knochensystem (n=10, 47.6%) detektiert, gefolgt von Leber (n=6, 28.6%) und Lunge (n=4, 19.0%), sowie einer (4.8%) zerebralen Metastase. Wobei sechs (5.4%) Patienten mehrere simultane Metastasen aufwiesen. Bei acht (7.2%) Patienten waren bereits bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms Fernmetastasen aufgetreten. Bei drei (2.7%) Patientinnen entstand im Zeitverlauf ein metachrones Mammakarzinom in der kontralateralen Brust. Lokalrezidive wurden in drei (2.7%) Fällen beobachtet. Frühere Malignome waren bei vier (jeweils ein (0.9%) Melanom, Bronchialkarzinom, Kolonkarzinom und Lymphom) der Mammakarzinompatienten bekannt, im Verlauf traten drei (2.7%) Zweitmalignome (ein (0.9%) Schilddrüsenkarzinom und zwei (1.8%) Kolonkarzinome) auf.

Therapie

Eine postoperativ adjuvante Chemotherapie (CTx) erfolgte bei 77 (60.7%) der Patienten. Diese wurde meist mittels einer Kombination von anthrazyklin- und taxanhaltigen Schemata (36.1%) durchgeführt, wie auch in einer Regimekombination nur mit Taxan (29.7%) oder nur mit Anthrazyklin (25.8%).

Bei 100 (79.4%) Patienten erfolgte eine postoperative perkutane Radiatio der Mamma und/oder Thoraxwand. Zudem wurden 21 (16.7%) mit Trastuzumab und 79 (62.7%) Patienten mit einer endokrinen Therapie zusätzlich behandelt.

Im weiteren Verlauf wurden zur Analyse der prognostischen Rolle von PTK7 anhand der Therapiewahl, drei Kohorten (A-C) gebildet (siehe Abb.2):

- Kohorte A: anthrazyklinhaltige CTx; entsprechend folgender Schemata; Doxorubicin/ Cyclophosphamid [EC], Epirubicin/ Cyclophosphamid [EC], Fluoruracil/ Doxorubicin/ Cyclophosphamid [FEC], vier bis sechs Zyklen)
- Kohorte B: taxanhaltige CTx; entsprechend Docetaxel/ Doxorubicin/ Cyclophosphamid [TAC], Fluoruracil/ Epirubicin/ Cyclophosphamid-Docetaxel [FEC-Doc], Fluoruracil/ Epirubicin/ Cyclophosphamid- Paclitaxel [FEC-Pac] mit vier bis sechs Zyklen oder sechs Zyklen Cyclophosphamide/ Methothrexat/ Fluoruracil [CMF]
- Kohorte C: keine CTx

Ausgeschlossen wurden dabei Patienten mit primären Fernmetastasen (M1).

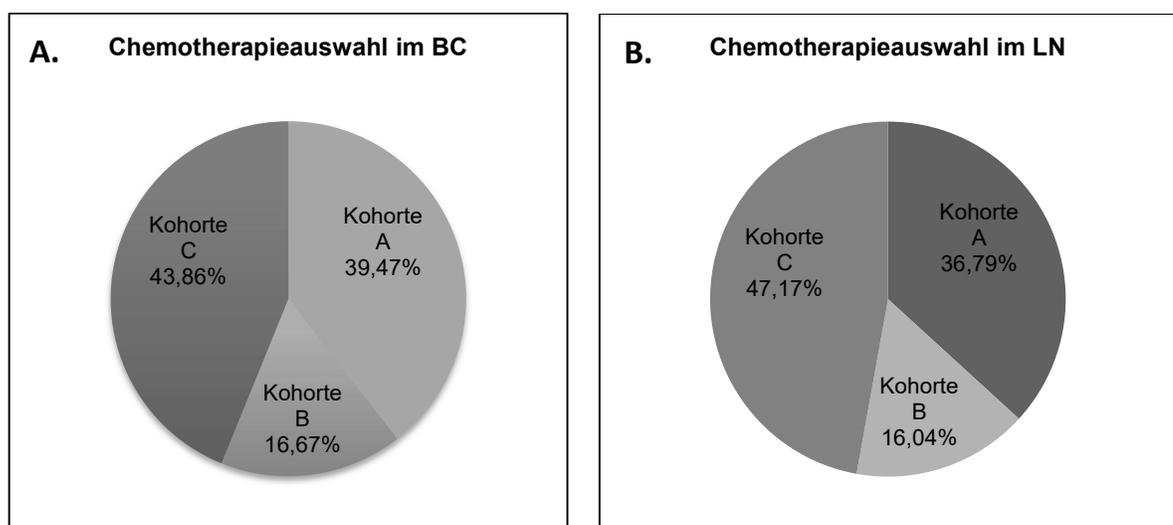


Abb. 4: Assoziation Chemotherapieauswahl im Kollektiv der untersuchten Primärtumore (BC) (A) und Lymphknoten (LN) (B): Anthrazyklinhaltige Chemotherapie (Kohorte A) und Taxanhaltige Chemotherapie (Kohorte B), ohne Chemotherapie (Kohorte C).

4.1.2 Patientenkollektiv PCR

Molekularbiologische Untersuchungen am Kollektiv erfolgen mittels rtPCR und qrtPCR. Tabelle 13 veranschaulicht die klinischen Daten für 124 Patienten deren PTK7 Level in der rtPCR gemessen wurden. Dieses entspricht im Allgemeinen dem Gesamtkollektiv, lediglich zwei BC-Proben konnten aus technischen Gründen nicht in die Auswertung genommen werden.

Tabelle 13: Histologische und klinische Daten der 124 Mammakarzinompatienten der rtPCR.

Kollektiv rtPCR, n=124			
mittleres Alter (in Jahren)		59.68 (31-86) Jahre	
klinische und histologische Parameter		Anzahl (No.)	Prozent (%)
Geschlecht	weiblich	120	96.8
	männlich	4	3.2
Menopausenstatus	peri-/prämeno	41	33.1
	postmeno	80	64.5
Histopathologischer Subtyp	invasiv-duktral	101	81.5
	invasiv-lobulär	17	13.7
	andere	6	4.8
Tumorgröße/ausdehnung (pT)	T 1	40	32.3
	T 2	62	50.0
	T 3	12	9.7
	T 4	10	8.1
Nodalstatus (pN)	N 0	30	24.2
	N 1	46	31.1
	N 2	29	23.4
	N 3	19	15.3
Fernmetastasen (M)	M 1	8	6.5
	M 0	116	93.5
befundeter Lymphknoten	infiltriert (LN+)	83	66.1
	tumorfrei (LN-)	34	27.4
Grading	G I	9	7.3
	G II	74	59.7
	G III	41	33.1
ER-status	positiv	94	75.8
	negativ	30	24.4
PR-status	positiv	78	62.9
	negativ	46	37.1
Her2neu-status	positiv	23	18.5
	negativ	99	79.8
	unbekannt	2	1.6
Tumorprogression	Fernmetastase	19	15.3
	Lokalrezidiv	3	2.4
	nein	87	70.2

In die qrtPCR Auswertung wurde eine Subgruppe von 78 Patienten eingeschlossen, die Tabelle 14 veranschaulicht.

Tabelle 14: Histologische und klinische Daten der 78 Mammakarzinompatienten der qrtPCR.

Kollektiv qrtPCR, n=78			
mitleres Alter (in Jahren)	60.23 (30-87) Jahre		
klinische und histologische Parameter		Anzahl (No.)	Prozent (%)
Geschlecht	weiblich	74	94.9
	männlich	4	5.1
Menopausenstatus	peri-/prämeno	26	33.3
	postmeno	49	62.8
Histopathologischer Subtyp	invasiv-duktral	62	79.5
	invasiv-lobulär	11	14.1
	andere	5	6.4
Tumorgroße/ ausdehnung (pT)	T 1	20	25.6
	T 2	41	52.6
	T 3	6	7.7
	T 4	11	14.1
Nodalstatus (pN)	N 0	16	20.6
	N 1	27	34.6
	N 2	21	26.9
	N 3	14	17.9
Fernmetastasen (M)	M 1	8	10.3
	M 0	70	89.7
befundeter Lymphknoten	infiltriert (LN+)	54	69.2
	tumorfrei (LN-)	19	24.4
Grading	G I	6	7.7
	G II	48	61.5
	G III	24	30.8
ER-status	positiv	52	66.7
	negativ	26	33.3
PR-status	positiv	48	61.5
	negativ	30	38.5
Her2neu-status	positiv	16	20.5
	negativ	61	78.2
	unbekannt	1	1.3
Tumorprogression	Fernmetastase	16	20.5
	Lokalrezidiv	1	1.3
	nein	51	65.4

4.1.3 Patientenkollektiv IHC

Die Patientenauswahl erfolgte anhand des Hormonrezeptor- und HER2-Status, sowie dem Befallzustandes des befundeten Lymphknotens. Insgesamt wurden 35 Patienten eingeschlossen, wovon 12 (34.4%) einen negativen ER/PR/HER2-Status (TNBC) und 26 Patienten einen LN+ (74.3%) hatten (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Histologischen und klinischen Daten der 35 Mammakarzinompatienten der IHC.

Kollektiv IHC, n=35			
mitleres Alter (in Jahren)	59.29 (27-87) Jahre		
klinische und histologische Parameter		Anzahl (No.)	Prozent (%)
Geschlecht	weiblich	33	94.3
	männlich	2	5.7
Menopausenstatus	peri-/prämeno	14	40.0
	postmeno	19	54.3
Histopathologischer Subtyp	invasiv-duktral	28	80.0
	invasiv-lobulär	5	14.3
	andere	2	5.7
Tumorgroße/ ausdehnung (pT)	T 1	12	34.3
	T 2	19	54.3
	T 3	3	8.6
	T 4	1	2.8
Nodalstatus (pN)	N 0	8	22.9
	N 1	11	31.4
	N 2	11	31.4
	N 3	5	14.3
Fernmetastasen (M)	M 1	6	17.1
	M 0	29	82.9
befundeter Lymphknoten	infiltriert (LN+)	26	74.3
	tumorfrei (LN-)	8	22.9
Grading	G I	3	8.6
	G II	19	54.3
	G III	13	37.1
ER-status	positiv	21	60.0
	negativ	14	40.0
PR-status	positiv	19	54.3
	negativ	16	45.7
Her2neu-status	positiv	4	11.4
	negativ	31	88.6
	unbekannt	0	0.0
Tumorprogression	Fernmetastase	9	25.7
	Lokalrezidiv	1	2.9
	nein	22	62.9

4.2 Vergleich molekulargenetische Methodik und Immunhistochemie

4.2.1 Vergleich klassische semiquantitative PCR und real time PCR

Da keine Vorarbeiten bezüglich einer validen Messmethodik bestehen wurden im Folgenden die Ergebnisse der Expressionsanalysen von rtPCR und qrtPCR bezüglich PTK7 im BC bzw. LN auf ihre Korrelation untersucht. Dabei ergab sich eine schwache ($r=0.298$, $P=0.014$) bzw. moderate ($r=0.626$, $P<0.001$) Korrelation der molekulargenetischen PCR-Methoden im BC bzw. LN. Wie die graphische Auswertung der PTK7 Expression in Abbildung 5 zeigt, ist dabei eine größere Streuung der rtPCR (Mittelwert 0.90, SD 0.99) als qrtPCR (Mittelwert 1.13, SD 0.39) in den tumorfreien LN zu sehen. Die Betrachtung der LN-Metastasen weist in beiden Methoden eine annähernd identische Streuung auf (rtPCR: Mittelwert 2.80, SD 2.57; qrtPCR: Mittelwert 2.99, SD 2.32).

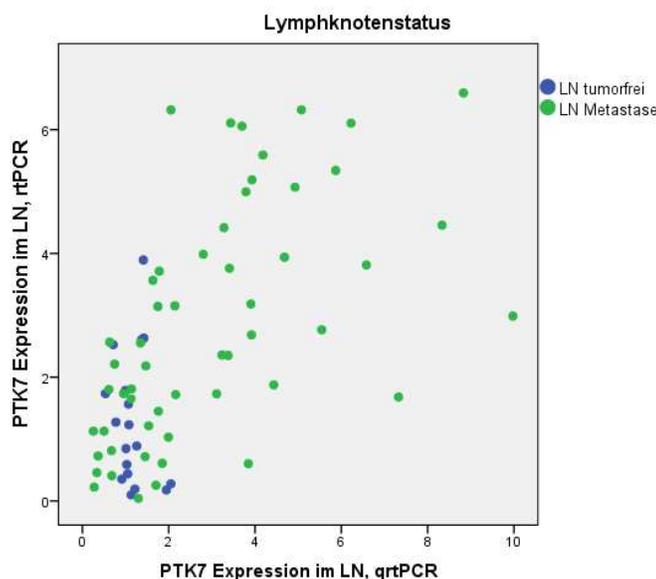


Abb. 5: Korrelation PTK7 Expression in den molekulargenetischen PCR-Methoden im Lymphknoten.

Wie in Abbildung 6 ersichtlich, zeigte sich einen Zusammenhang zwischen BC und LN in beiden PCR-Methoden; dabei korreliert BC mit LN-Metastasen in einem höheren Maß, als BC mit tumorfreien LN ($P=0.050$). Somit erscheint die PCR ein geeignetes Messverfahren, um die PTK7 Expression zu erfassen.

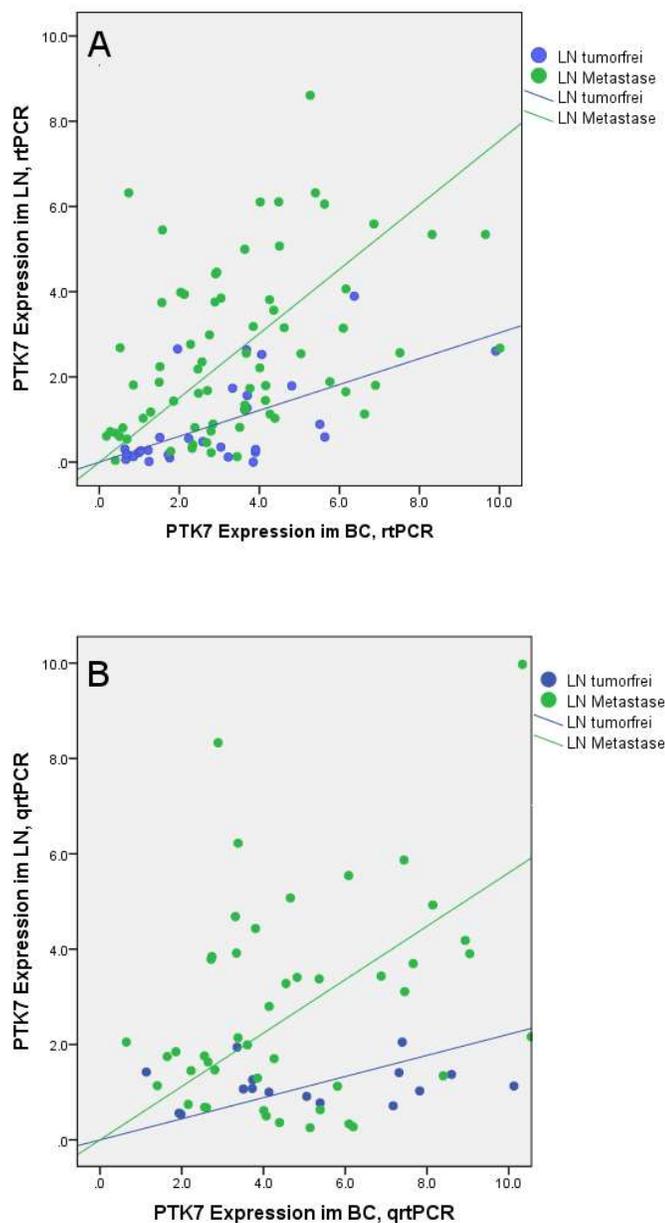


Abb. 6: Korrelation der PTK7 Expression im Mammakarzinom (BC) und Lymphknoten in der semiquantitativen (A) und realtime (B) PCR.

4.2.2 Vergleich molekulargenetische und immunhistochemische Methoden

Weiterhin wurden die Korrelation zwischen der Transkriptions- (rtPCR/qrtPCR) und Translationsebene (IHC) im Zusammenhang mit der PTK7 Expression im BC und LN untersucht. Dabei ergab sich eine moderate ($r=0.398$, $P=0.027$) bzw. keine signifikante ($r=0.039$, $P=0.830$) Korrelation der rtPCR und IHC im BC bzw. LN. Die Korrelation zwischen der qrtPCR und IHC im BC bzw. LN betrug $r=0.254$ ($P=0.168$) bzw. $r=0.557$ ($P<0.001$).

4.3 Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen

4.3.1 Konventionelle semiquantitative PCR (rtPCR)

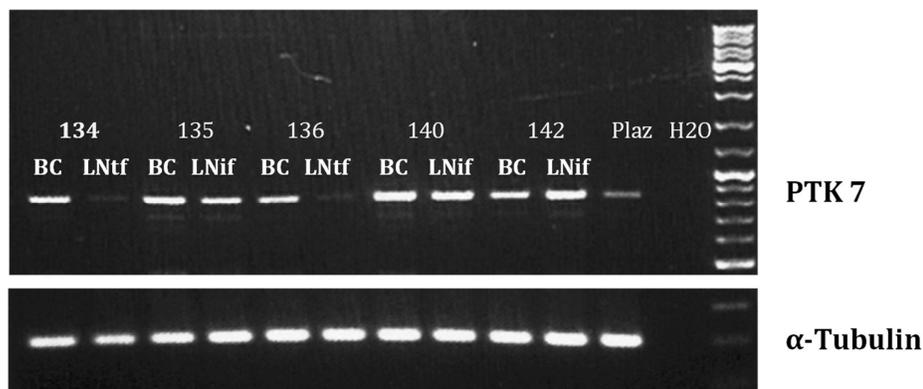


Abb. 7: PTK7 Expression in der PCR-Gelelektrophorese im Mammakarzinom (BC), Lymphknotenmetastase (LNif) und Lymphknoten tumorfrei (LNtf), sowie α Tubulin als housekeeping-Gens.

Es wurde in Gewebeproben von 124 Mammakarzinompatienten die PTK7 Expression, mittels rtPCR untersucht. Abbildung 7 zeigt ein Beispiel einer PTK7 Expression im Tumor (BC) und Lymphknotengewebe (LN).

4.3.1.1 Korrelation der PTK7 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor und Lymphknoten

Im vorliegenden Patientenkollektiv wurde die Expression von PTK7 mit den folgenden klinisch-pathologischen Parametern sowohl im Primärtumor (BC) als auch Lymphknoten (LN) korreliert: histologischer Tumortyp, pT, pN, Grading, Menopausenstatus, ER-, PR-, HER2-Status. Dabei kamen zum Vergleich von zwei Gruppen der t-Test und von mehr als zwei Gruppen die univariate Varianzanalyse (ANOVA) zur Anwendung.

Primärtumor

Im BC ergab sich kein statistischer Zusammenhang zwischen der PTK7 Expression und klinisch pathologischen Parametern (siehe Tabelle 16/17).

Tabelle 16: Korrelation der PTK7 Expression in der rtPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor (BC), t-Test.

Klinisch-path. Parameter, rtPCR (BC)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert	mittl.Differenz, 95%KI
PTK7/ Menopausenstatus	121	0.437	0.40 [-0.06; 1.40]
PTK7/ ER-Status	124	0.860	0.10 [-1.01; 1.21]
PTK7/ PR-Status	124	0.244	0.57 [-0.39; 1.55]
PTK7/ HER2-Status	122	0.114	-0.96 [-2.15; 0.24]
PTK7/ gruppierter Rezeptorstatus	122	0.714	-0.29 [-1.83; 1.26]

Tabelle 17: Korrelation der PTK7 Expression in der rtPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor, ANOVA.

Klinisch-path. Parameter, rtPCR (BC)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert
PTK7/ histolog.Subtyp	124	0.984
PTK7/ Tumorgröße (pT)	124	0.729
PTK7 /Lymphknotenbefall (pN)	124	0.152
PTK7/ Grading	124	0.827

Lymphknoten

Bei der Analyse der PTK7-Expressionslevel im LN wurden ausschließlich LN+ in die Auswertung genommen. Bei der Korrelation von PTK7 mit den klinisch-pathologischen Parametern zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich des Menopausenstatus, sowie der Steroidhormonrezeptoren und des HER2-Status (vgl. Tabelle 18). Prämenopausale Frauen, hatten signifikant höhere PTK7 Werte im LN+ als postmenopausale Patientinnen (P=0.045). PR-, ER-, HER2- Patienten zeigten signifikant höhere PTK7 Expression in befallenen LN als das PR+, ER+ oder HER2+ Kollektiv (vgl. Abb.8, HER2 nicht dargestellt).

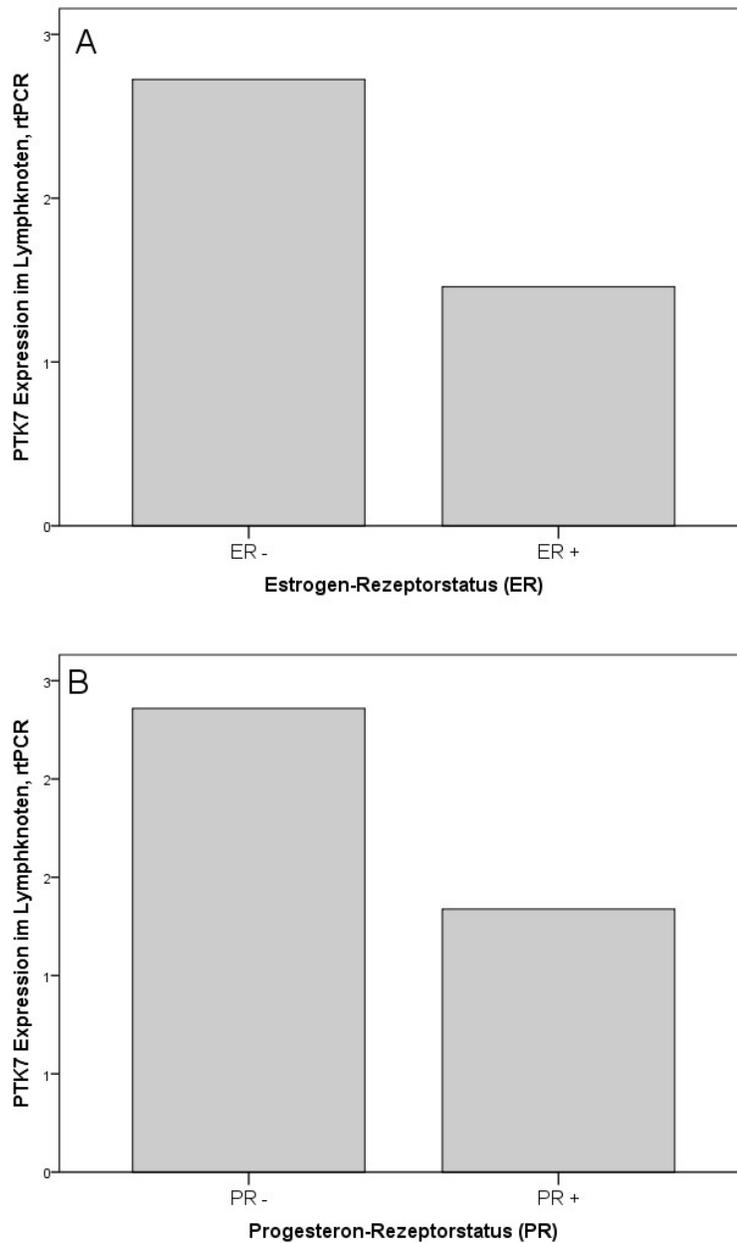


Abb. 8: Zusammenhang PTK7 Expression und Steroidhormonrezeptorstatus (ER/PR) im LN+ gemessen mittels rtPCR.

Die gruppierte Betrachtung der Rezeptoren in binären Gruppen ER/PR/HER2-negativ versus alle anderen Rezeptorstatus-Kombinationen ergab keinen statistischen Zusammenhang (vgl. Tabelle 18)

Tabelle 18: Korrelation der PTK7 Expression in der qPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), t-Test.

Klinisch-path. Parameter, rtPCR (LN)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert	mittl.Differenz, 95%KI
PTK7/ Menopausenstatus	80	0.045*	-1.24 [-2.45; -0.30]
PTK7/ ER-Status	80	0.023*	1.17 [0.16; 2.18]
PTK7/ PR-Status	80	0.01*	1.19 [0.29; 2.08]
PTK7/ HER2-Status	79	<0.001*	-1.99 [-3.05; -0.95]
PTK7/ gruppierter Rezeptorstatus	79	0.848	0.14 [-1.27; 1.54]

Bei der univariaten Analyse, ergab sich keine statistische Signifikanz zwischen der PTK7 Expression im LN und den klinisch-pathologischen Parametern (vgl.Tabelle 19).

Tabelle 19: Korrelation der PTK7 Expression in der qPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), ANOVA.

Klinisch-path. Parameter, rtPCR (LN)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert
PTK7/ histolog.Subtyp	82	0.879
PTK7/ Tumorgröße (pT)	82	0.184
PTK7 /Lymphknotenbefall (pN)	82	0.060
PTK7/ Grading	81	0.158

Desweiteren wurde die Validität der histopathologischen Beurteilung der LN des Pathologen beurteilt. Dabei wurden bei der statistischen Auswertung die PTK7 Expression im LN am Median in zwei Gruppen getrennt und mit der durch den Pathologen erhobenen Einteilung der LN (LN+/LN-) korreliert (siehe Abb.9).

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen niedriger PTK7 Level in LN- und hohen PTK7 Werten in LN+ (*t-Test*, $P < 0.001$). Dabei korreliert die Höhe der PTK7-Werte im LN mit der Anzahl der befallenen LN (pN) (*Chi-Quadrat*, $P < 0.001$).

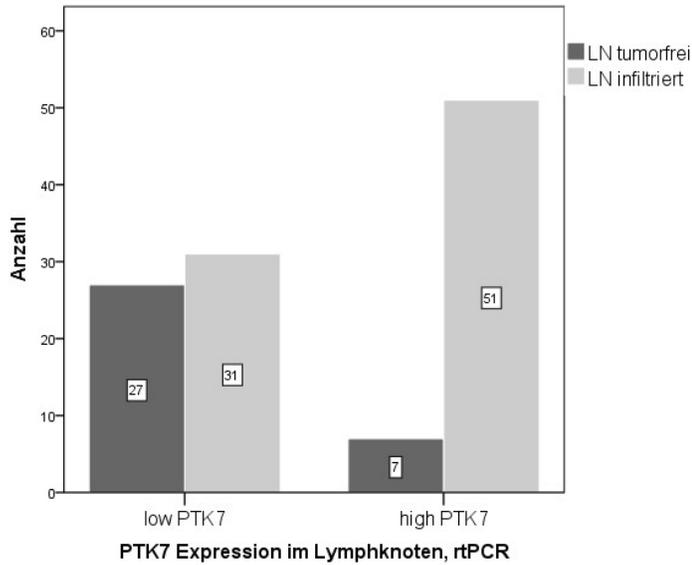


Abb.9: Zusammenhang histopathologische Beurteilung der Lymphknoten (tumorfrei/infiltriert) und PTK7-Level (high/low) in der rtPCR.

Es wurde zusätzlich die PTK7 Expression im Lymphknotengewebe der Subgruppe Patienten mit LN-versus Patienten mit LN+ erfasst. Der Median der PTK7 Werte bei den Patienten mit LN+ betrug 2.01 (0.14-6.86) versus 1.02 (0.43-2.14) bei Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (Fisher, $P < 0.001$) (vgl.Abb.10).

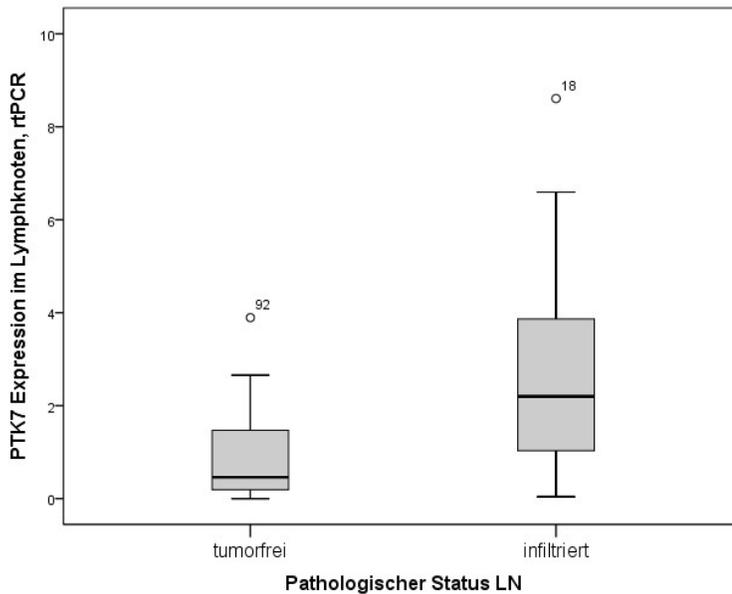


Abb 10: PTK7 Verteilung im Lymphknotengewebe bei Patienten mit tumorfreien im Vergleich zu tumorinfiltrierten Lymphknoten in der rt-PCR.

Im Vergleich der PTK7 Werte im BC mit den korrespondierenden axillären LN (LN+/LN-) im Gesamtkollektiv ergaben sich keine signifikant verschiedenen Werte ($P=0.089$).

4.3.1.2 Korrelation der PTK7 Expression mit Überleben

Die Untersuchung des krankheitsfreien (*disease-free survival, DFS*)- bzw. Gesamtüberleben (*overall survival, OS*) in Abhängigkeit der PTK7 Expression im vorliegenden Patientenkollektiv wurde mittels Log-Rank-Test berechnet und in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Zum adjustierten Gruppenvergleich wurde die Cox-Regression berechnet.

Im Gesamtkollektiv konnte im BC kein Einfluss von PTK7 auf das Überleben (OS, Log Rank, $P=0.814$; DFS, Log Rank, $P=0.955$) gezeigt werden. Auch für die PTK7 Expression im LN (PTK7LNrtPCR=1.7) konnte kein signifikanter Zusammenhang im OS ($P=0.431$) erlangt werden (nicht gezeigte Daten). Wie in Abbildung 11 ersichtlich, zeigte sich beim DFS ein annähernd signifikanter Unterschied in den Patientengruppen (Log Rank, $P=0.067$). Dabei war eine hohe PTK7 Expression im LN mit einem geringeren DFS assoziiert (3-Jahresüberleben: high PTK7 ($n=49$) vs. low PTK7 ($n=52$); 66.4 % vs. 76.0%).

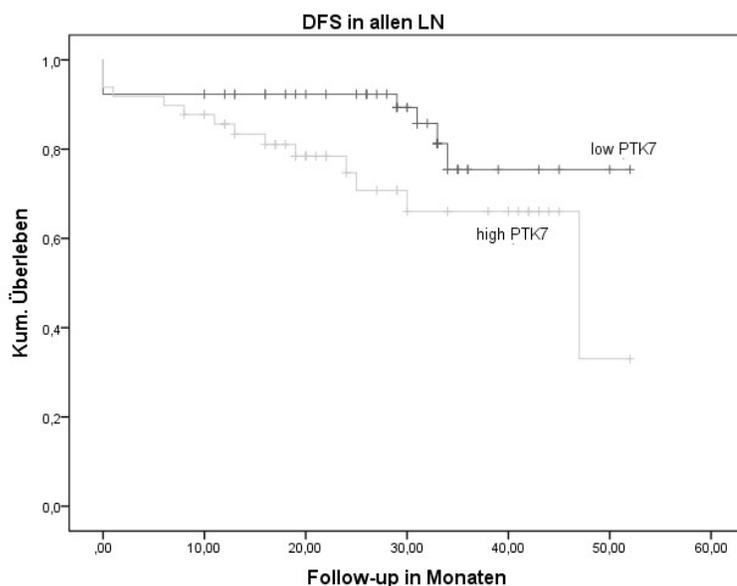


Abb.11: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der PTK7 Werte im Lymphknoten (LN), rtPCR.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse zur PTK7 Expression im LN (vgl S.43/44), wurden die nachfolgenden statistischen Überlebensberechnungen auf Basis der PTK7-Expression in LN fortgeführt. Insbesondere wurde der prädiktive Einfluss der

PTK7-Expression in Bezug zur applizierten Chemotherapie evaluiert. Dazu wurden die Patienten je nach ihrer stattgehabten Therapie in zwei Gruppen eingeteilt: Chemotherapie (CTx) oder keine Chemotherapie (noCTx). Patienten in der noCTx Gruppe mit hohen PTK Level im LN (n=14) wiesen dabei im Vergleich zu Patienten der low PTK7 Gruppe (n=21) ein signifikant schlechteres DFS ($P < 0.001$; 3-Jahres DFS: low versus high, 92.0% versus 23.0%) auf (siehe Abb. 12A). Vergleichend konnte kein Gruppenunterschied zwischen high PTK7 (n=32) versus low PTK7 (n=27) in der CTx Gruppe beobachtet werden ($P = 0.552$; 3-Jahres DFS: low versus high, 85.0% versus 75.0%) (siehe Abb. 12B).

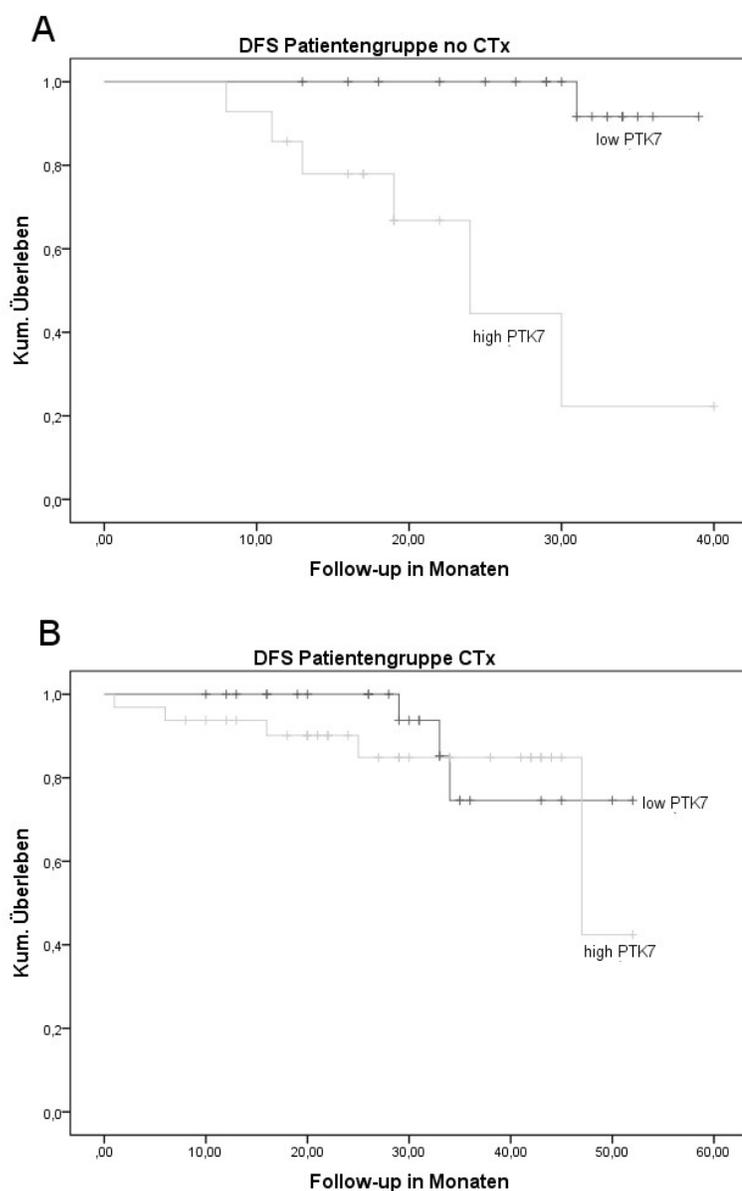


Abb. 12: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der Therapieentscheidung, und PTK7 im Lymphknoten: (LN)keine Chemotherapie (noCTx) (A) oder Chemotherapie (CTx) (B).

Um den Einfluss von PTK7 auf die Chemotherapie und die in der Literatur beschriebene Anthrazyklin-Resistenz zu evaluieren, wurden die Patienten wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben in drei Kohorten unterteilt. Bei Annahme einer Antrazyklinresistenz von PTK7 wurde Kohorte A und C versus B getestet. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied im DFS bezüglich der PTK7 Expression in der Kohorte A+C ($P < 0.001$), nicht aber in Kohorte B ($P = 0.873$; 3-Jahres DFS: low versus high; 95.8% versus 84.2% (vgl. Abb 13 B). In der Kohorte A+C hatten Patienten der low PTK7 Gruppe ein 3 Jahresüberleben von 88.4% versus 47.4% in der high PTK7 Gruppe (siehe Abb. 13A).

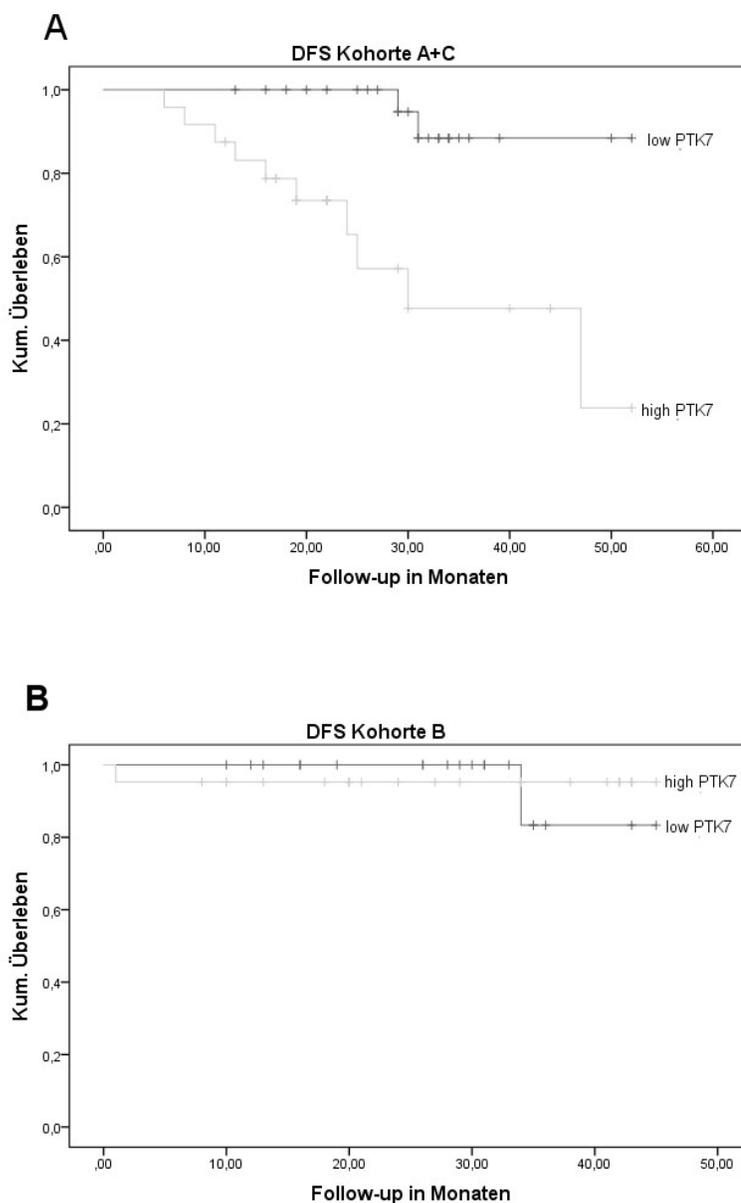


Abb. 13: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der Kohorten A+C (A) versus B (B) und PTK7 im Lymphknoten (LN), rtPCR.

Kein statistischer Überlebensvorteil konnte im DFS für Patienten mit low PTK7 im Vergleich der Kohorten A/B/C gesehen werden ($P=0.592$), wohl aber in Patienten mit high PTK7 ($P=0.003$). Dabei zeigte sich ein Überlebensvorteil der Kohorte B versus C ($P=0.06$) mit 74.3% versus 21.0% im 3-Jahres DFS (siehe Abb 14 A/B).

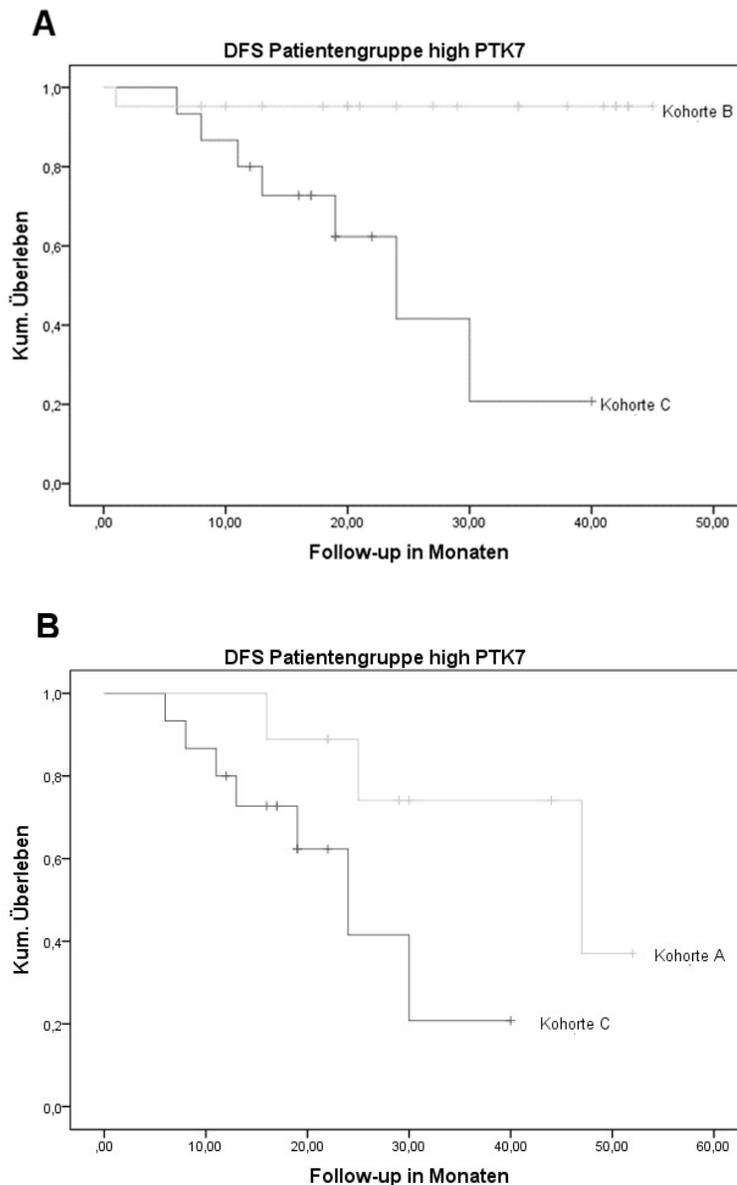


Abb. 14: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit high PTK7 und der Kohorten C versus B (A) und Kohorten C versus A (B) im Lymphknoten (LN), rtPCR.

4.3.2 Real time PCR (qrt-PCR)

Es wurde in Gewebeproben (BC und LN) von 78 Mammakarzinompatienten die PTK7 Expression mittels qrt-PCR untersucht (Patientencharakteristik vgl. Kapitel 4.1.2, Tabelle 14). Zur relativen Quantifizierung der Expressionsunterschiede diente als

Referenzgen α -Tubulin (vgl. Kapitel 3.3.4), anschließend wurden statistische Analysen durchgeführt.

4.3.2.1 Korrelation PTK7 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor und Lymphknoten

Im vorliegenden Patientenkollektiv wurde die Expression von PTK7 mit den folgenden klinisch-pathologischen Parametern (analog zur rt-PCR) sowohl im BC und LN korreliert: histologischer Tumortyp, pT, pN, Grading, Menopausenstatus, in situ Komponente, ER/PR/HER2 -Status. Dabei kamen zum Vergleich von zwei Gruppen der t-Test und von mehr als zwei Gruppen die univariate Varianzanalyse (ANOVA) zur Anwendung.

Primärtumor

Im BC ergab sich, wie aus Tabelle 20 hervorgeht, keine statistische Signifikanz bei der Berechnung PTK7 und klinisch-pathologische Parameter im BC.

Tabelle 20: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor (BC), t-Test.

Klinisch-path. Parameter, qrtPCR (BC)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert	mittl.Differenz, 95%KI
PTK/ Menopausenstatus	66	0.633	0.75[-1.85; 1.13]
PTK7/ ER-Status	70	0.665	-0.34 [0.75; -1.84]
PTK7/ PR-Status	70	0.884	-0.14[-1.60; 1.31]
PTK7/ HER2-Status	69	0.553	0.50 [-2.18; 1.18]
PTK7/ gruppierter Rezeptorstatus	69	0.156	1.37 [-3.28; 0.54]

Tabelle 21: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor (BC), ANOVA.

Klinisch-path. Parameter, qrtPCR (BC)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert
PTK7/ histolog.Subtyp	70	0.611
PTK7/ Tumorgröße (pT)	70	0.687
PTK7 /Lymphknotenbefall (pN)	70	0.890
PTK7/ Grading	70	0.039*

Wie in Tabelle 21 ersichtlich, zeigte sich beim Vergleich der PTK7 Expression im BC und den übrigen klinisch-pathologischen Parametern, lediglich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Grading ($P=0.039$). Dabei wiesen G1-Tumore im Mittel höhere PTK7 Werte ($n=6$; Mittelwert 7.13, SD 3.37) auf als G3-Karzinome ($n=22$; Mittelwert 4,01, SD 2.95).

Lymphknoten

Bei der Untersuchung der LN-Metastasen ($n=54$) bezüglich der PTK7 Expression und Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern, konnten die Ergebnisse der rtPCR bestätigt werden. Ein statistischer Zusammenhang zwischen der PTK7 Level im LN und dem Menopausenstatus ($P=0.063$) konnte nicht erreicht werden, dennoch zeigte sich, dass postmenopausale Mammakarzinompatientinnen höhere PTK7 Werte ($n=36$; Mittelwert 3.48, SD 2.48) als prämenopausale ($n=16$; Mittelwert 2.19, SD 1.67) aufweisen. Wie auch die rtPCR Evaluation gezeigt hat, besteht eine negative Korrelation bezüglich des ER- ($P=0.007$), PR- ($P=0.006$) und HER2 -Status ($P=0.066$) im LN (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern in Lymphknoten Metastasen (LN+), t-Test.

Klinisch-path. Parameter, qrtPCR (LN)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert	mittl.Differenz, 95%KI
PTK/ Menopausenstatus	52	0.063	-1.29 [-2.66; 0.07]
PTK7/ ER-Status	54	0.007*	-1.76 [-3.03; -0.49]
PTK7/ PR-Status	54	0.006*	-1.76 [-2.99; -0.53]
PTK7/ HER2-Status	54	0.066*	1.37 [-0.10; 2.84]
PTK7/ gruppiertes Rezeptorstatus	12	0.219	-1.69 [-4.57; 1.19]

Wie in Tabelle 23 aufgeführt, zeigten weitere klinisch-pathologische Parameter, wie der histologische Subtyp, pT, pN, das Grading und die in situ Komponente keine statistische Signifikanz bezüglich der PTK7 Expression im LN.

Tabelle 23: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern in Lymphknoten-Metastasen (LN), ANOVA.

Klinisch-path. Parameter, qrtPCR (LN)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert
PTK7/ histolog.Subtyp	54	0.956
PTK7/ Tumorgröße (pT)	54	0.983
PTK7 /Lymphknotenbefall (pN)	54	0.176
PTK7/ Grading	54	0.237

Analog zur rtPCR wurde die Validität der histopathologischen Beurteilung der LN durch den Pathologen auch in der qrtPCR beurteilt (siehe Abb.15). Hierbei bestätigte sich das Ergebnis der rtPCR und es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen niedriger PTK7 Level in tumorfreien LN und hohen PTK7 Werten in LN-Metastasen in der qrt-PCR (*Chi-Quadrat, P<0.001*).

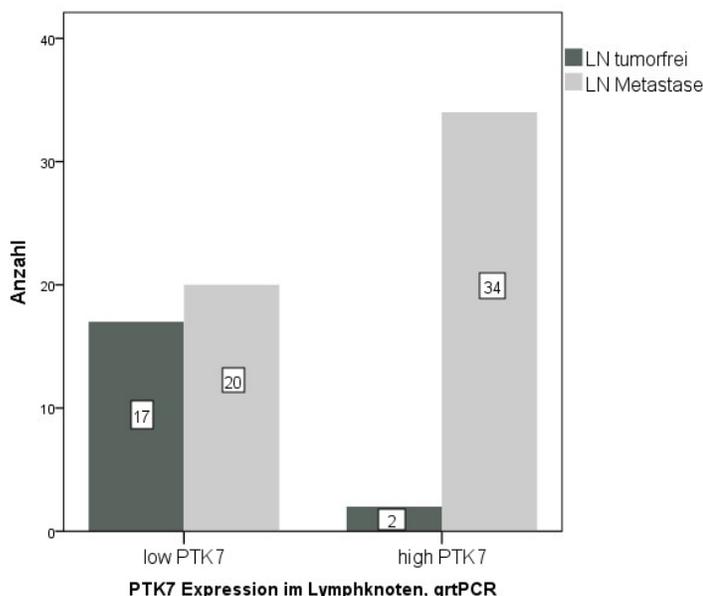


Abb.15: Zusammenhang histopathologische Beurteilung der Lymphknoten (tumorfrei/infiltriert) und PTK7-Level (high/low) in der qrtPCR.

Bei der Analyse der Expressionslevel von PTK7 in den Gruppen tumorfreier LN und LN Metastase mittels exaktem Test nach Fischer, zeigte sich eine hochsignifikante Überexpression von PTK7 ($P<0.001$) in der Lymphknotenmetastase (vgl. Abb.16).

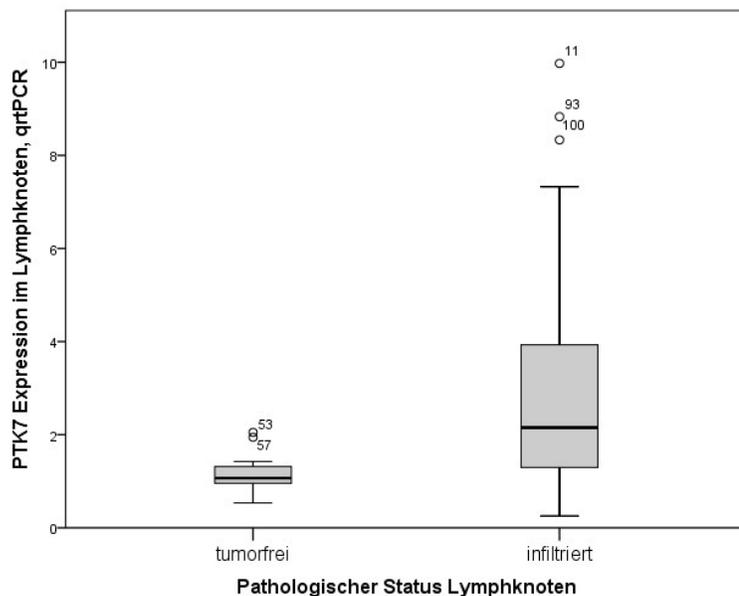


Abb. 16: Expressionslevel von PTK7 im Vergleich infiltrierter und tumorfreier Lymphknoten in der qrt PCR.

4.3.2.2 Korrelation der PTK7 Expression mit Überleben

Die Untersuchung des DFS bzw. OS in Abhängigkeit der PTK7 Expression im vorliegenden Patientenkollektiv wurde, wie bei den Analysen der rtPCR, mittels Log-Rank-Test durchgeführt und in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Zum adjustierten Gruppenvergleich wurde die Cox-Regression berechnet.

Primärtumor

Im Patientenkollektiv zeigte sich bei binärer Betrachtung der PTK7 Level im BC, getrennt am Median (PTK7BCqrtPCR= 4.2) ein Trend im OS der low PTK7 (n=29) versus high PTK7 (n=31) Patienten, der allerdings nicht signifikant ist ($P=0.084$). Ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil ergab sich bei Betrachtung der low PTK7 versus high PTK7 Gruppe im DFS ($P=0.048$; 3-Jahres DFS, 85.6% versus 61.0%) bezüglich aller eingeschlossenen Patienten (siehe Abb.17).

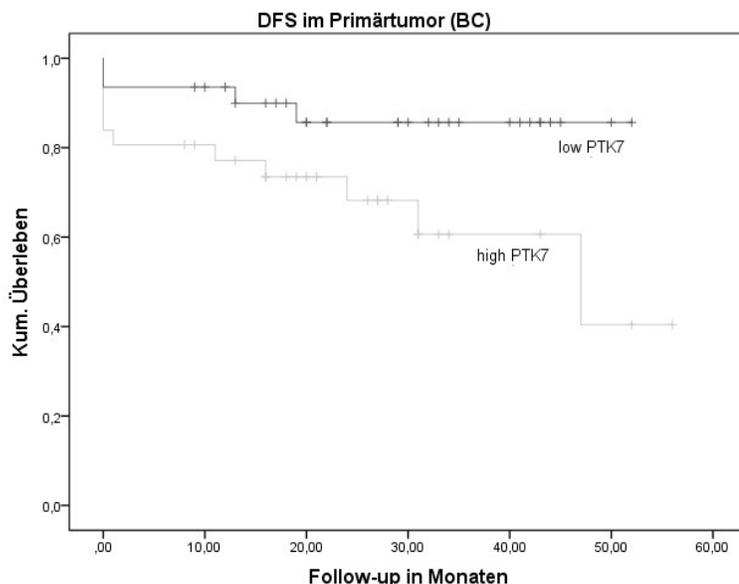


Abb. 17: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der der PTK7 Werte im BC, qrtPCR.

Lymphknoten

Im Patientenkollektiv der qrtPCR konnte für die PTK7 Expression in den LN im OS kein Überlebensvorteil der low PTK7 Gruppe (n=32) versus der high PTK7 Gruppe (n=30) berechnet werden ($P=0.071$; 3-Jahres DFS 96.2% versus 78.1%) (vgl.Abb18).

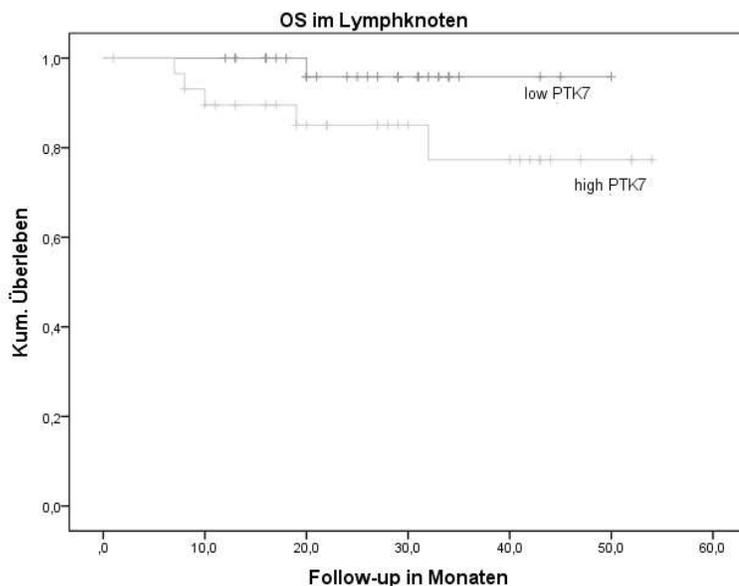


Abb. 18: OS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der der PTK7 Werte im LN, qrtPCR.

Die Analyse des OS in der Untergruppe der LN Metastasen ergab keinen statistisch signifikanten Überlebensvorteil der low PTK7 (n=18) im Vergleich zur high PTK7 (n=28) Gruppe ($P=0.214$). Im DFS konnte weder für PTK7 Level in LN ($P=0.349$),

noch in der Untergruppe der LN-Metastasen ($P=0.750$) ein signifikanter Überlebensvorteil der einer Patientengruppe nachgewiesen werden. Aufgrund der zu geringen Fallzahl konnten wir die Analyse gruppierter Arten der adjuvanten Chemotherapie (siehe Kapitel 4.1.1, Abb.4) nicht durchführen.

4.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung

Präparate von 35 Mammakarzinompatienten wurden immunhistochemisch auf die Expression von PTK7 untersucht. Zur Beurteilung der Expressionsstärke wurden die aufgearbeiteten Präparate unter dem Mikroskop betrachtet und wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben qualitativ ausgewertet. Dabei wurde die zytoplasmatische Färbung von PTK7 in den Mammakarzinomzellen in vier Stufen (0 bis 3+) unterteilt. Die Abbildungen 22 bis 24 zeigen drei repräsentative Tumorproben mit Scoring-Abstufung 1+ bis 3+.

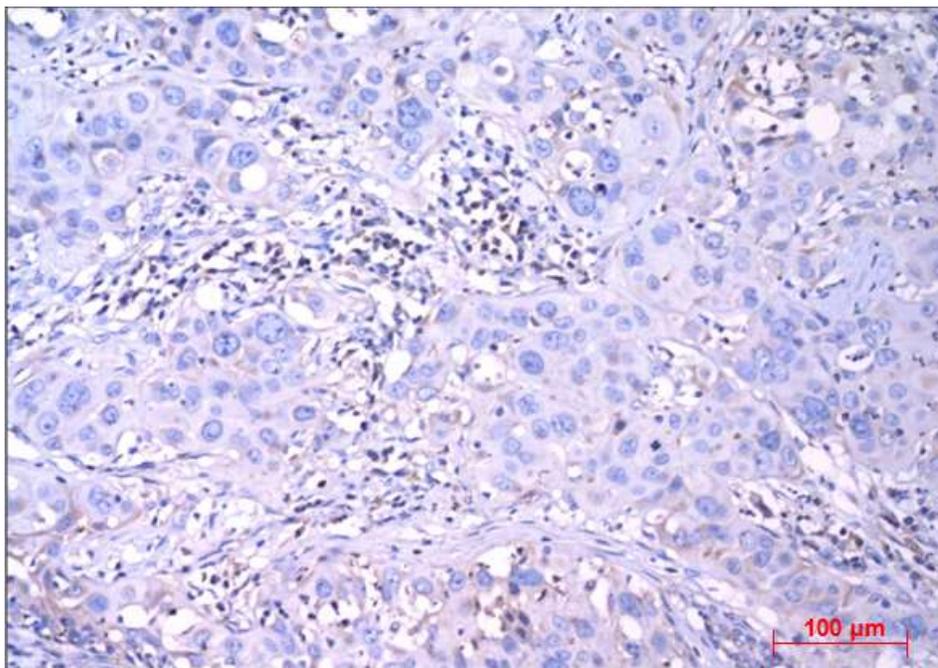


Abb. 19: Schwache zytoplasmatische Expression (1+) von PTK7 im Mammakarzinom (Pat.Nr. 405BC, HE-Färbung, 20 fache Vergrößerung).

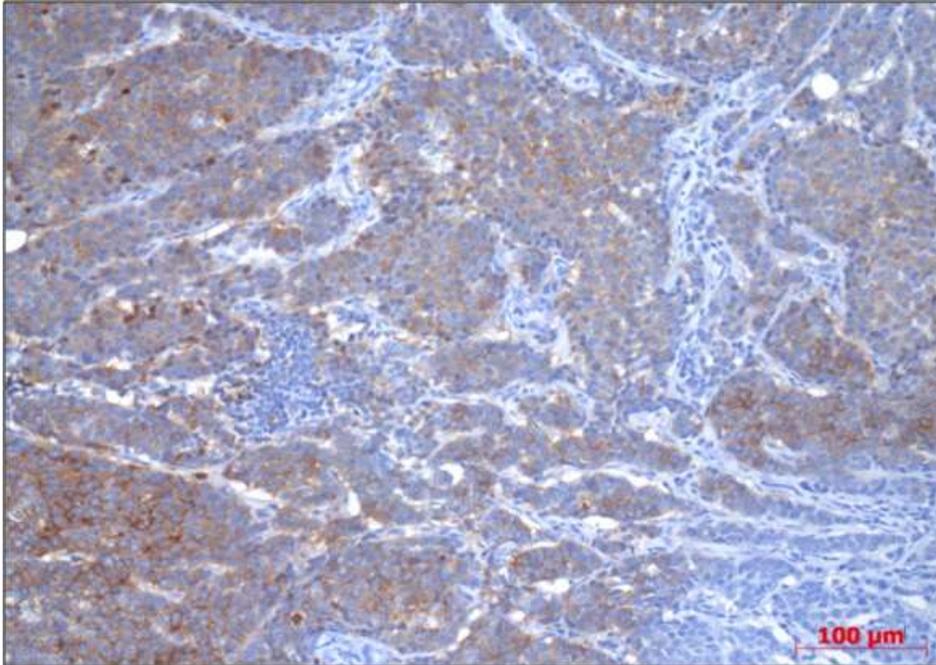


Abb. 20: Mittlere zytoplasmatische Expression (2+) von PTK7 im Mammakarzinom (Pat.Nr. 3BC, HE-Färbung, 20 fache Vergrößerung).

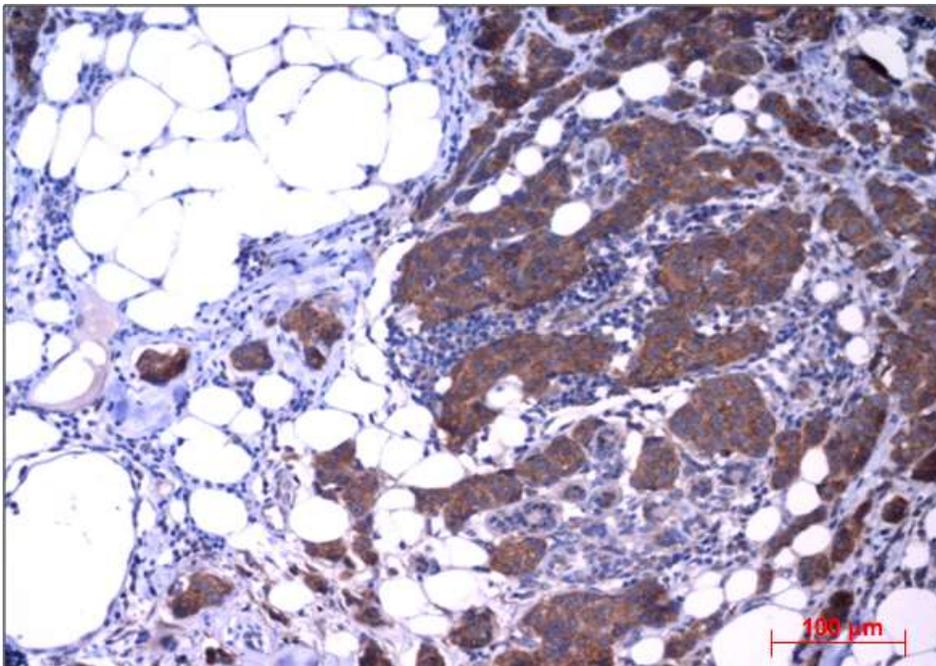


Abb. 21: Starke zytoplasmatische Expression (3+) von PTK7 im Mammakarzinom (Pat.Nr.1BC, HE-Färbung, 20fache Vergrößerung).

Primärtumor

In unserem Patientenkollektiv lag in 28 Fällen (80%) eine schwache (1+) bis mittlere (2+) zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen vor, nur wenige BC wiesen keine (2 BC, 5.7%) oder eine starke (5 BC, 14.3%) zytoplasmatische Färbung auf (vgl. Abb. 22).

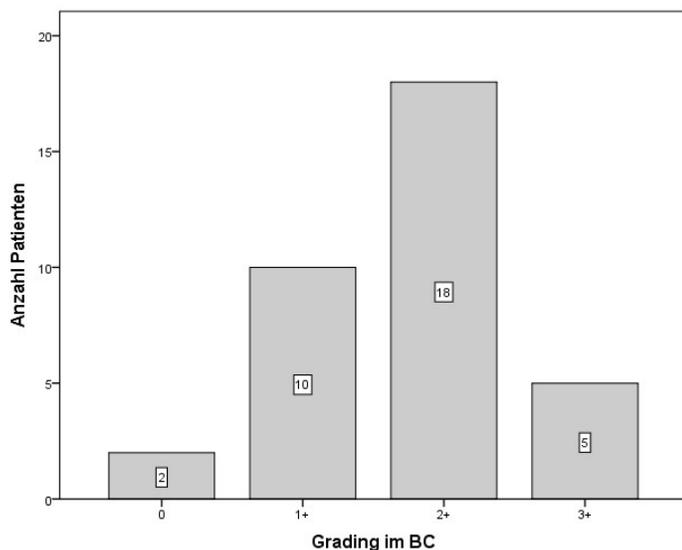


Abb. 22: Anzahl der Mammakarzinome (BC) mit dem erreichten Score (0-3+) in der immunohistochemischen Färbung von PTK7.

Bei der immunohistochemischen Analyse wurden aus dem Gesamtpatientenkollektiv alle TNBC eingeschlossen. Von 17 TNBC (13.3%) waren sowohl Karzinomgewebe, wie auch die ipsilaterale Lymphknotenmetastase in Paraffin eingebettet vorhanden und konnten in die Untersuchung einbezogen werden. Dabei zeigte sich, dass bei Patienten mit TNBC im BC vorwiegend eine mittlere (2+) bis starke (3+) zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen aufwiesen (15 BC, 88.2%). Nur zwei BC der TNBC hatten keine (1 BC, 0.5%) oder eine schwache (1BC, 0.5%) zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen (vgl. Abb 23).

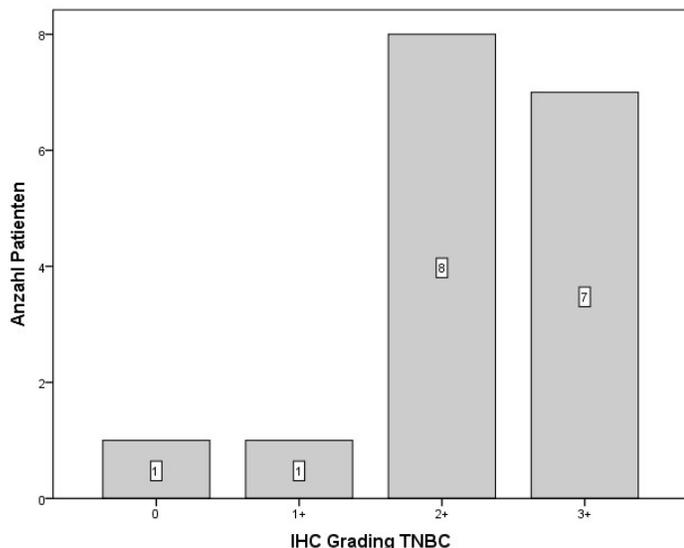


Abb.23: Anzahl TNBC Mammakarzinompatienten mit dem erreichten Grading (0 bis 3+) in der immunhistochemischen Färbung von PTK7.

Lymphknoten

In die immunhistochemische Evaluation konnten 35 LN eingebracht werden, davon waren 25 (71.4%) Lymphknotenmetastasen und 10 (28.6%) tumorfrei. Die metastatisch befallenen Lymphknoten zeigten, wie auch im BC, vorwiegend eine schwache (1+) bis mittlere (2+) zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen (22 LN, 88.0%), die tumorfreien LN hingegen exprimierten PTK7 überwiegend nicht (7 LN, 70%) (vgl. Abb 24).

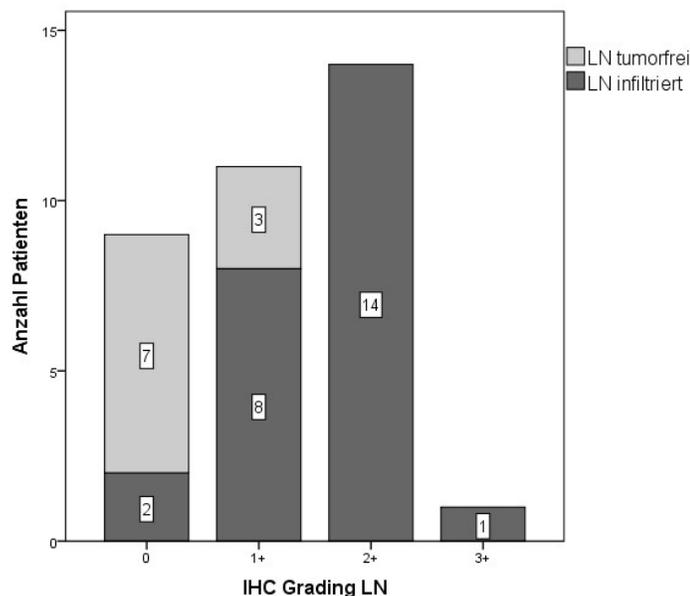


Abb.24: Anzahl Mammakarzinompatienten mit dem erreichten Score (0 bis 3+) im Lymphknoten (LN) in der immunhistochemischen Färbung von PTK7.

Betrachtet man die Untergruppe der TNBC, zeigten tumorfreie LN (4 LN, 100%) keine PTK7 Expression, Lymphknotenmetastasen hingegen waren überwiegend zytoplasmatisch schwach (1+) oder mittel (2+) angefärbt (12 LN, 92.3%) (vgl. Abb 25).

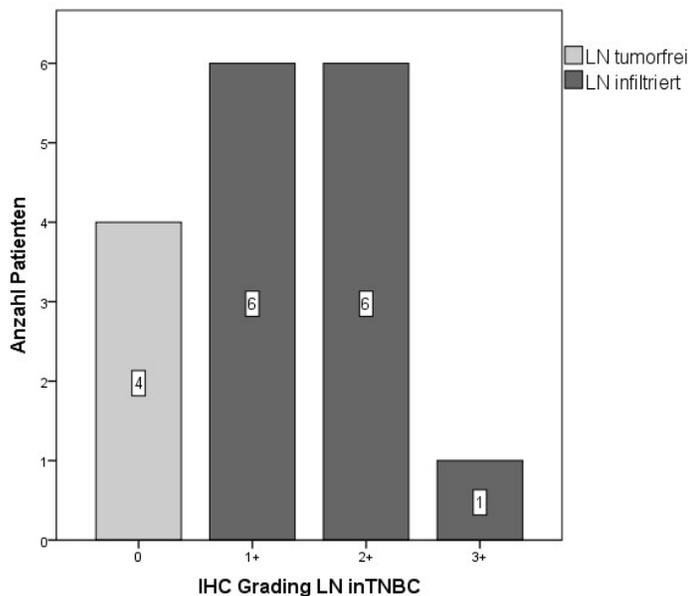


Abb.25: Anzahl TNBC Mammakarzinompatienten mit dem erreichten Score (0 bis 3+) im Lymphknoten (LN) in der immunhistochemischen Färbung von PTK7.

4.4.1

4.4.1 Korrelation PTK7 Expression mit klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor und Lymphknoten

Im vorliegenden Patientenkollektiv wurde der immunhistochemische Score von PTK7 mit den klinisch-pathologischen Parametern, sowohl im BC als auch LN korreliert: Menopausenstatus, histologischer Tumortyp, Grading, pT, pN, ER-, PR- und HER2-Status. Dabei kamen der exakte Test nach Fischer und die univariate Varianzanalyse zur Anwendung.

Primärtumor

Im BC ergab sich, wie bereits quantitative PCR-Analysen zeigten, kein statistischer Zusammenhang zwischen den immunhistochemisch erhobenen PTK7 Werten und den klinisch-pathologischen Parametern (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Zusammenhang der immunohistochemischen PTK7 Werte und klinisch-pathologischen Parameter im Primärtumor (BC), t-Test.

Klinisch-path. Parameter, IHC (BC)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert	mittl.Differenz, 95%KI
PTK7/ Menopausenstatus	33	0.508	0.18 [-0.37; -0.72]
PTK7/ ER-Status	35	0.492	0.18 [0.26; -0.34]
PTK7/ PR-Status	35	0.541	0.16 [-0.36; 0.67]
PTK7/ HER2-Status	35	0.580	0.22 [-0.59; 1.03]
PTK7/ gruppierter Rezeptorstatus	35	0.132	0.40 [-0.13; 0.92]

Die Analyse unverbundener Stichproben mittels Varianzanalyse (ANOVA) ergab keinen statistischen Zusammenhang von PTK7 IHC-Werten mit den klinisch-pathologischen Parametern im BC, wie es nachfolgende Tabelle 25 verdeutlicht.

Tabelle 25: Korrelation der immunohistochemischen PTK7 IHC Werte mit den klinisch-pathologischen Parametern im Mammakarzinom (BC), ANOVA.

Klinisch-path. Parameter, IHC (BC)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert
PTK7/ histolog.Subtyp	35	0.513
PTK7/ Tumorgröße (pT)	35	0.660
PTK7 /Lymphknotenbefall (pN)	35	0.857
PTK7/ Grading	35	0.266

Lymphknoten

Wie Tabelle 26 zeigt, ergab sich in der Untersuchung der LN bezüglich der Assoziation der PTK7 Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern, ein statistischer Zusammenhang mit dem Menopausenstatus ($P=0.004$). Jüngere prämenopausale Frauen wiesen statistisch höhere PTK7-Werte im LN auf als postmenopausale ($P=0.004$). Außerdem hatten Patienten mit einem negativen Rezeptorstatus ebenfalls höhere PTK7 Expressionen im LN als die rezeptorpositive Vergleichsgruppe. Somit konnte ein Trend zwischen TNBC und PTK7 LN-Werten gezeigt werden, der die statistische Signifikanz jedoch verfehlte ($P=0.095$).

Tabelle 26: Korrelation der immunohistochemischen PTK7 Werte mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), t-Test.

Klinisch-path. Parameter, IHC (LN)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert	mittl.Differenz, 95%KI
PTK/ Menopausenstatus	25	0.004*	-0.90 [-1.15; -0.31]
PTK7/ ER-Status	25	0.080	0.56 [-1.18; 0.07]
PTK7/ PR-Status	25	0.296	-0.33 [-0.98; 0.31]
PTK7/ HER2-Status	25	0.277	-0.54 [-1.53; 0.46]
PTK7/ gruppierter Rezeptorstatus	25	0.095	0,78 [0.61; 2.17]

Die Analyse unverbundener Stichproben mittels Varianzanalyse (ANOVA) ergab einen statistischen Zusammenhang von PTK7 IHC-Werten im LN mit der Anzahl der befallenen Lymphknoten (pN) ($P < 0.001$), wie es nachfolgende Tabelle 27 verdeutlicht.

Tabelle 27: Korrelation der immunohistochemischen PTK7 IHC Werte mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), ANOVA.

Klinisch-path. Parameter, IHC (LN)	Anzahl gültiger Werte (N)	p-Wert
PTK7/ histolog.Subtyp	25	0.715
PTK7/ Tumorgröße (pT)	25	0.379
PTK7 /Lymphknotenbefall (pN)	25	<0.001*
PTK7/ Grading	25	0.703

4.4.2 Korrelation der PTK7 Expression mit Überleben

Im vorliegenden Patientenkollektiv wurde die PTK7 IHC Expression mit den Überlebensdaten (OS; DFS) sowohl im BC als auch LN mittels Log-Rank-Test berechnet. Zum adjustierten Gruppenvergleich wurde die Cox-Regression berechnet. Die Überlebensdaten wurden in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Zur Analyse dieser Parameter wurden die Patienten binär anhand der PTK7 Scoringwerte in zwei Gruppen geteilt; 0 bis 1+ versus 2+ bis 3+.

Zur Analyse der prognostischen Bedeutung des Rezeptorstatus und PTK7 erfolgte die Trennung anhand des gruppierten Rezeptorstatus in TNBC versus nonTNBC, jeweils in BC und LN.

Primärtumor

Im BC konnte kein Zusammenhang zwischen dem Score 0/1+ versus 2+/3+, weder im OS (*Log-Rank*, $P=0.767$) noch im DFS (*Log-Rank*, $P=0.967$) nachgewiesen werden. Das Risikoverhältnis zwischen der TNBC versus nonTNBC Patientengruppe zeigte in den beobachteten Daten keine signifikante Veränderung des Überlebens bezüglich der IHC PTK7 Level im BC (*HR* 0.839; 0.32-2.23, 95%KI; $P=0.724$).

Lymphknoten

Betrachtet man in dem vorliegenden Patientenkollektiv die Korrelation der PTK7 Level in allen Lymphknoten zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang im OS ($P=0.027$, 3-Jahres OS: low versus high, 76.5% versus 43.5%) (siehe Abb.26).

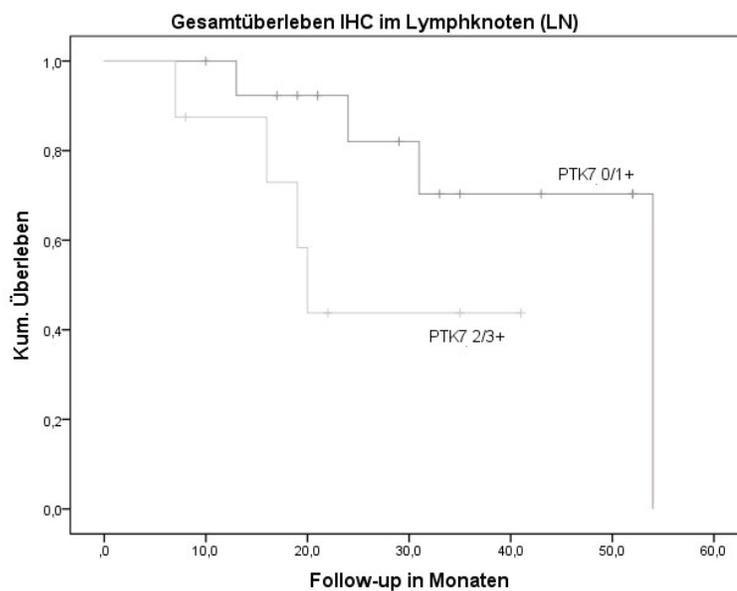


Abb. 26: Kaplan-Meier-Kurve: Einfluss von PTK7 IHC im Lymphknoten (LN) auf das Gesamtüberleben (OS).

Im DFS zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen low und high PTK7-Gruppe ($P=0.161$). Das Risikoverhältnis zwischen der TNBC versus nonTNBC Patientengruppe zeigte in den beobachteten Daten keine signifikante Veränderung des Überlebens bezüglich der IHC PTK7 Level im LN (*HR* 2.33; 0.7-7.3, 95%KI; $P=0.146$). Die Untersuchung der Untergruppe LN-Metastasen ($n=25$) ergab aufgrund der geringen Fallzahl ($n=25$) keine statistische Signifikanz für das OS zeigte (*Log-Rank*, $P=0.095$). Auch für das DFS zeigte sich bei den LN-Metastasen kein statistischer Unterschied (*Log-Rank*, $P=0.315$) im Überleben zwischen der high und low PTK7 Gruppe. Ein Gruppenunterschied der TNBC versus nonTNBC Patienten zeigte in den

beobachteten Daten keine signifikante Veränderung des Überlebens bezüglich der IHC PTK7 Level in LN-Metastasen (HR 1.38; 0.5-3.9, 95%KI; $P=0.536$).

5 Diskussion

5.1 Bedeutung von PTK7

Proteintyrosinkinase 7 (PTK7), ist eine katalytisch-inaktive Rezeptortyrosinkinase, die 1995 von Mossie et al. in Kolonkarzinomzellen identifiziert wurde und deshalb auch als *Colon carcinoma kinase 4* (CCK4) bekannt ist (Mossie et al. 1995). Jung et al. fanden in normalem Hodengewebe, sowie unterschiedlichen Krebszelllinien vier mRNA Splicingvarianten, die darauf hindeuten, dass PTK7 eine Rolle in der Signaltransduktion /- modulation in der Embryogenese, sowie in der Tumorgenese spielt (Jung et al. 2002).

Die Funktionen von PTK7 in der embryonalen Entwicklung beinhalten dabei die konvergente Extension der Drosophilagastrulation, wie auch den Neuralrohrverschluss oder die kardiale Morphogenese bei Wirbeltieren (Wallingford et al. 2002, Lu et al. 2004, Wang et al. 2006, Shnitsar und Borchers 2008, Paudyal et al. 2010). Lu et al. konnten am Mausmodell zeigen, dass PTK7-*loss of function* Mutanten zu perinatalen Defekten beim Neuralrohrverschluss und der Innenohrentwicklung führten und folgerten daraus eine zentrale Rolle von PTK7 im *non-canonical Wnt/planar cell polarity* (PCP)-Signalweg (Lu et al. 2004).

Als Schnittpunkt von PTK7 mit dem *non-canonical* Weg konnten Shnitsar et al. eine Rekrutierung des *Dsh* durch PTK7 an die Plasmamembran nachweisen. *Dsh* ist der Schlüsselregulator des β -*Catenin*-abhängigen canonical, wie auch des non-canonical Wnt-Signalwegs, dessen Spezifität abhängig der Interaktionspartner und *Dsh*-Bindung ist. In vivo Daten zeigten außerdem eine Co-Existenz von PTK7 und *Fz7/Dsh* in Immunopräzipitaten, sowie eine Hemmung der *Fz7* vermittelten *Dsh* Rekrutierung und Phosphorylierung in PTK7 Mutanten, die zur Alteration im weiteren Wnt-Signalweg führt (Shnitsar und Borchers 2008). Unklar lassen Shnitsar et al., ob es sich dabei um eine aktivierende oder inhibierende Funktion von PTK7 handelt, da es unter beiden Umständen zu einer Störung der konvergenten Extension mit dem gleichen Phenotyp führen würde. Ein Hinweis auf eine aktivierende Funktion zeigt sich nicht nur darin, dass PTK7 die Membranrekrutierung von *Dsh* fördert, sondern

auch dass, eine PTK7 Überexpression zur nukleären Lokalisation von phosphoryliertem *JNK* führt (Shnitsar und Borchers 2008).

Aktuelle Forschungsergebnisse verdeutlichen, dass PTK7 wahrscheinlich nicht nur auf den *non-canonical* Wnt/PCP Signalweg begrenzt ist, sondern auch den *canonical* Wnt-Weg beeinflusst. Puppo et al. beschreiben eine Aktivierung des *canonical* Wnt-Signalwegs durch PTK7 abhängige Stabilisierung von β -Catenin und Initiierung β -Catenin-abhängiger Transkription. Dabei zeigen die Daten eine dynamische Interaktion der Tyrosinkinase-Domäne von PTK7 mit β -Catenin unter Kontrolle der *canonical* Signalweg beteiligten Wnt-Liganden (*Wnt3a*, *Wnt8*) (Puppo et al. 2010). Auch wenn eine Interaktion von PTK7 und den Schlüsselproteinen des *canonical* Wnt-Signalwegs nachgewiesen wurde, wird diese kontrovers diskutiert. Peradziryi et al. zeigen, dass PTK7 den *canonical* Wnt-Weg hemmt und vermuten, dass PTK7 die β -Catenin/Wnt-Signalkaskade unterdrückt, während es den *noncanonical* Wnt/PCP-Pfad über eine Bindung des *Fzd*-Rezeptors aktiviert. Dabei konkurriert PTK7 mit anderen *Fzd*-bindenden Korezeptoren und führt dadurch zu einer verminderten Aktivierung des nachfolgenden *canonical* Wnt-Wegs (Peradziryi et al. 2011). Durch in vivo Versuche am Zebrafisch konnte zudem eine hemmende Wirkung von PTK7 auf die *canonical* β -Catenin/Wnt-Kaskade gefunden werden. Zebrafische mit Überexpression von *Wnt8* bringen phänotypische Ausprägungen von β -Catenin/Wnt-Aktivierung hervor, die durch Einbringung von PTK7 mRNA unterdrückt werden. Dadurch folgern sie eine Hemmung der exogenen β -Catenin/Wnt-Aktivierung durch PTK7 (Hayes et al. 2013). Die Entdeckung eines Wnt-Proteins (*Wnt1*) als Proto-Oncogen zeigt Parallelen zwischen der embryonalen Morphogenese von Gewebe und Organen mit Abläufen der Karzinomentstehung (Nusse und Varmus 1982).

In der Zusammenschau der publizierten Literatur scheint die Rolle von PTK7 im Hinblick auf deren Signaltransduktion bisher noch nicht vollends verstanden. Eine klare Zuordnung hinsichtlich non-canonical oder canonical Wnt-Kaskade ist nicht gegeben. Die kontrovers diskutierte Rolle von PTK7 im Wnt-Signalweg lässt bedeutende Folgerungen bezüglich der Tumorgenese zu. So ist es möglich, dass PTK7 während der Tumorprogression durch einen Aktivierungswechsel der β -Catenin/Wnt getragenen Tumorformation/ Zellproliferation zur *PCP* gerichteten Veränderung der Zelladhäsion, -polarität und -motilität, wie sie zur Metastasierung benötigt wird, initiiert. Bezogen auf das Mammakarzinom konnten Gärtner et al. basierend auf Datenanalyse- der Oncomine Datenbank, eine PTK7 Koexpression von Genen des

wnt-Signalwegs nachweisen. In ihren molekularbiologischen Zellversuchen wiesen Gärtner et al. neben der transformierenden Wirkung von PTK7 auch einen Zusammenhang von PTK7 mit der Zellmotilität und dem invasiven Verhalten von Mammakarzinomzellen nach. Die Inhibition von PTK7 mittels siRNA führte zu einer Umwandlung eines hochaggressiven Phänotyps zu einem nicht-invasiven Phänotyp mit verminderter Motilität und Invasivität von Mammakarzinomzellen (Gärtner et al. 2014). Diese Erkenntnis deckt sich zudem mit Ergebnissen von Golubkov et al., die ebenfalls durch Knockout von PTK7 in Zelllinienversuchen eine Veränderung des Metastasierungsverhalten der Zellen erzielen konnten (Golubkov et al. 2010). Jene in-vitro Untersuchungen legen dar, dass durch die PTK7-Blockade das onkogene Potential gehemmt werden kann. Was wiederum eine gute therapeutische Option bieten könnte, PTK7-überexprimierende Tumore gezielt zu therapieren. Weiterführende Untersuchungen sind daher erforderlich, um diese Hypothese zu belegen.

5.2 Molekulargenetischer und immunhistochemischer Nachweis von PTK7

Ziel dieser Arbeit war die prognostische und prädiktive Bedeutung der Rezeptortyrosinkinase PTK7 beim Mammakarzinom zu untersuchen. Dazu wurden in einem retrospektiven Ansatz, Tumorgewebe von 126 Mammakarzinom-Patienten hinsichtlich deren Expressionsverhalten von PTK7 mittels molekulargenetische Methoden (PCR) und immunhistochemischer Technik im Primärtumor der Mamma und ipsilateralen axillären Lymphknoten untersucht.

Da zum jetzigen Zeitpunkt keine klare Linie hinsichtlich der Nachweismethode der PTK7 Expression besteht, war ein Ziel dieser Arbeit die Evaluation und Vergleichbarkeit der PTK7 Level auf Transkriptions- und Translationsebene.

Dazu erfolgte die Expressionsanalyse von PTK7 mittels quantitativer mRNA-Bestimmung von PTK7 durch rt- und qrtPCR. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation bezüglich der PTK7 Genexpression im BC und LN. Intermethodische Unterschiede erklären dabei die nur moderat ausgeprägten Zusammenhänge (Lyons 1992, Bustin 2000).

Weiterhin wurden Analysen eines ausgewählten Kollektivs (BC und LN) mittels immunhistochemischer Nachweismethode durchgeführt. Hier zeigte sich nur eine

schwache bis keine Korrelation der PTK7 Werte auf Translations- und Transkriptionsebene. Der fehlende Zusammenhang der sensitiveren qrtPCR Methode und IHC, weist auf mögliche Unterschiede in den Expressionsmuster auf Transkriptions- und Translationsebene hin, welche durch posttranskriptionelle und/oder posttranslationale Regulationsmechanismen sowie Protein-Proteininteraktionen verursacht werden können. Vorstellbar ist, dass zum Zeitpunkt der Tumorexzision eventuell die mRNA Transkription schon erhöht, der Translationsprozess noch nicht vollzogen oder im umgekehrten Fall die Expression auf Proteinebene vorliegt, die instabile mRNA jedoch bereits wieder abgebaut war. Dieser nicht lineare Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteingehalt einer Tumorzelle könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Regulation von PTK7 auf verschiedenen Ebenen geschieht. Jung et al. identifizierten 5 PTK7 Splicing-Varianten, die in Leber- und Kolonkarzinomzelllinien unterschiedlich vorhanden waren. Außerdem nahmen sie an, dass eine Hochregulierung von PTK7 auf transkriptioneller Ebene stattfindet, da die 5'-flankierende Sequenz als Promoter fungiert. Sie argumentieren, dass PTK7 so durch alternatives Splicen der mRNA, verschiedene Funktionen bei der Zellsignalübertragung einnehmen könnte (Jung et al. 2002).

Ein weiterer Grund für den intermethodischen fehlenden Zusammenhang könnte einerseits in der geringen Anzahl der IHC untersuchten Patienten (n=35) liegen, andererseits durch die Schwierigkeiten einer cut-off Bildung. In der aktuellen Literatur zu PTK7 existiert keine einheitliche Definition eines solchen Punktes, also eines bestimmten Prozentsatzes gefärbter Zellen oder einer bestimmten Farbtintensität, ab der ein Tumor als positiv für den Marker angesehen wird. Es erfolgte die Einteilung in vier Gruppen (0 bis 3+) nach Prozentsatz der angefärbten Tumorzellen (cut-off 10%) und Färbintensität analog zur PTK7 Studienlage (Lin et al. 2012, Shin et al. 2013, Zhang et al. 2014). Dabei werden für die Bewertung von PTK7 unterschiedliche cut-off Punkte angenommen: ab einer Färbung von mindestens 5% der Tumorzellen nehmen Zhan et al. eine Positivität für PTK7 an (Zhang et al. 2014). Lin et al. bestimmen dagegen eine Färbung von mehr als 10% der Tumorzellen und Shin et al. sogar erst mehr als 40% der angefärbten Tumorzellen, zu ihrem cut-off Punkt (Lin et al. 2012, Shin et al. 2013). Weitere Kriterien zur Bestimmung eines cut-offs können die Intensität der Färbung sein, wie bei Lin et al. (Lin et al. 2012). Während Zhang et al. eine Kategorisierung in drei Gruppen (no staining, moderate, strong) verwendet, um eine Dichotomisierung der PTK7

Expression (low/high) entsprechend des Prozentsatz der angefärbten Tumorzellen und Färbeintensität vorzunehmen, unterteilt Shin et al. in drei Untergruppen (Shin et al. 2013, Zhang et al. 2014). Grundsätzlich bleibt die Problematik, dass die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Festlegung des cut-off-points die Vergleichbarkeit der Studien zu PTK7 erschwert. Da der immunohistochemische Nachweis von PTK7 nicht standardisiert ist, ergeben sich zudem grundsätzliche Probleme in der Vergleichbarkeit durch verschiedene Färbeprotokolle, sowie verwendete Antikörper. Für den Nachweis von PTK7 existieren verschiedene mono- und polyklonale Antikörper. Zhang et al., die immunohistochemisch die PTK7 Expression bei 180 Prostatkarzinom-Präparaten erfassten, verwendeten dabei einen murinen monoklonalen Antikörper (Zhang et al. 2014). Wohingegen ein polyklonaler Antikörper zur immunohistochemischen Untersuchung der PTK7 Expression beim Magen- und Ösophaguskarzinom eingesetzt wurde (Lin et al. 2012, Shin et al. 2013). Generell ergibt sich eine Problematik in der Vergleichbarkeit sämtlicher immunhistochemischer Studien zu PTK7 durch eine fehlende Standardisierung der Methodik, insbesondere hinsichtlich der unterschiedlichen Quantifizierbarkeit der Färbungen, sowie die verschiedenen Antikörpern zum Nachweis von PTK7.

5.3 Ergebnisse der Arbeit und deren Bedeutung

PTK7 und klinisch-pathologische Faktoren und prognostische Relevanz

Eine Überexpression von PTK7 konnte in verschiedenen soliden Tumoren, sowie malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems detektiert werden (Saha et al. 2001, Endoh et al. 2004, Prebet et al. 2010, Jiang et al. 2012). Auch in Voranalysen war eine signifikante Überexpression von PTK7 in BC Zelllinien (u.a. MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-175, MDA-MB-468, BT-474) ($p < 0.000$) nachweisbar (MPI, Daten nicht veröffentlicht). Um den klinisch-prognostischen Stellenwert von PTK7 zu untersuchen, wurde die PTK7 Expression im primären Mammakarzinom (BC) und der ipsilateralen axillären Lymphknoten (LN) analysiert. Zwischen PTK7 und der histologischen Tumorentität, wie auch den TNM-Parametern im BC und LN konnte kein Zusammenhang eruiert werden. Auch in anderen Studien zum Magen-, wie auch Prostatakarzinom ließ sich keine Korrelation zwischen PTK7 und den genannten Faktoren finden, was die Wertigkeit von PTK7 als unabhängigen Prognosefaktor in Frage stellte (Lin et al. 2012, Zhang et al. 2014).

Beim Tumorgrading dagegen zeigte sich eine signifikante Abnahme der PTK7 Level mit zunehmender Entdifferenzierung im Brustgewebe in der qrt-PCR ($p=0.039$). Während Gärtner et al. keinen Zusammenhang von PTK7 mit der histopathologischen Differenzierung im Mammakarzinom sahen, konnte in Studien beim Magen- und Ösophaguskarzinom gezeigt werden, dass PTK7 vor allem in gut differenzierten Tumoren überexprimiert ist (Lin et al. 2012, Shin et al. 2013, Gärtner et al. 2014). Lin et al. wie bei 201 Patienten nach, dass eine positive PTK7-Expression mit G1-Magentumoren ($p<0.001$), sowie mit einem besseren Gesamt- ($p=0.028$) und Krankheitsfreienüberleben ($p=0.012$) korreliert (Lin et al. 2012). Im Mammakarzinom könnte dieser Zusammenhang die These der tumorfördernden Wirkung von PTK7 gerade in frühen Stadien der Tumorerkrankung stützen (Muller-Tidow et al. 2004).

Desweiteren wurde untersucht ob die PTK7-Überexpression in ER-negativen BC Zelllinien sich in humanem BC und LN Gewebe bestätigen lässt (Gärtner et al. 2014). Dazu wurde der Hormonrezeptorstatus (ER/PR) und HER2-Rezeptorstatus mit den PTK7-Level korreliert. Während sich im BC kein Zusammenhang nachweisen lies, ergab sich ein Zusammenhang zwischen der PTK7-Expression und dem ER (qrtPCR, $p=0.007$), PR (qrtPCR, $p=0.06$) und HER2-Status (qrtPCR, $p=0.066$) in der LN Metastase. Da der Hormonrezeptorstatus, insbesondere im Bezug auf den ER, ein wichtiger prognostischer Faktor beim Mammakarzinom ist (Marks et al.1994, von Minckwitz et al. 2005), ergeben sich daraus therapeutische Konsequenzen. In der Regel haben HR-negative Tumore jedoch eine schlechtere Prognose, wahrscheinlich weil diese bereits von vornherein stärker entdifferenziert sind als HR-positive Karzinome (Fisher et al. 1988) Deshalb wird bei bei TNBC Tumoren eine Chemotherapie empfohlen (Goldhirsch et al. 2013). Neben dem signifikanten Zusammenhang der PTK7-Expression und Rezeptornegativität in TNBC Zelllinien (Speers et al. 2009, Gärtner et al. 2014), konnte in der immunhistochemischen Arbeit von Ataseven et al. eine PTK7-Expression in 28.6% der TNBC gezeigt werden (Ataseven et al. 2013). Die Korrelation des gruppierten Rezeptorstatus (ER-/PR-/HER2- vs. ER+/PR+/HER2+) ergab widererwarten keine signifikante Korrelation mit der PTK7 Expression im BC (qrtPCR, $p=0.156$) und LN (qrtPCR, $p=0.219$). Erklärbar ist diese Diskrepanz durch die geringe Anzahl der eingeschlossenen TNBC-Fälle im Gesamtkollektiv. Während der immunhistochemische Nachweis einen

möglichen Zusammenhang der PTK7-Level und Rezeptorstatus (ER-/PR-/HER2-) in LN-Gewebe ($p=0.095$) andeutet.

Hinsichtlich der prognostischen Kraft wurden die ipsilateralen LN in Subgruppen (tumorfrei/LN- und tumorinfiltriert/LN+) unterteilt. Dabei wurden im Mammakarzinomgewebe der LN- Patienten keine signifikanten unterschiedliche PTK7- Level im Vergleich zu Patienten mit axillären Lymphknotenmetastasen gemessen. In der Analyse des Lymphknotengewebes ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede, so war bei Patienten mit LN+ höhere PTK7-Werte als in der LN-Vergleichsgruppe zu verzeichnen (rtPCR/qrtPCR, $P<0.001$). Zudem korrelierte die Höhe der PTK7 Expression bei LN+ Patienten mit der Anzahl der befallenen axillären LN (pN) (rtPCR, $p=0.060$) und war prognostisch ungünstig. Eine hohe PTK7 Expression im LN war sowohl im Gesamtkollektiv (rtPCR Log-Rank, $p=0.067$), wie auch im Chemo-naiven Kollektiv (Gruppe C, $p<0.001$) mit einem kürzeren DFS assoziiert. Dies deckt sich mit der Arbeit von Zhan et al., der in seiner Arbeit die These vertritt, dass PTK7 ein wichtiger Faktor der Tumorprogression ist. Er konnte mittels molekularbiologischen Methoden (PCR, Western Blot) und IHC in 180 Prostatakarzinomproben zeigen, dass eine PTK7-Überexpression signifikant häufiger mit dem Nachweis von LN-Metastasen beim Prostatakarzinom in Zusammenhang steht. Außerdem hatten Prostatakarzinom-Patienten mit hohen PTK7 Level ein signifikant schlechteres DFS ($p=0.004$), wie auch OS ($p<0.001$) (Zhang et al. 2014). Zudem war im Gesamtkollektiv ein schlechteres OS (qrtPCR, $p=0.084$) und signifikant schlechteres DFS (qrtPCR, $p=0.048$) von Patienten mit PTK7-Überexpression im BC assoziiert. Immunhistochemisch lies sich kein Unterschied im OS und DFS bezüglich der PTK7-Expression nachweisen. Dies beruht am ehesten auf unserer niedrigen IHC-Fallzahl ($n=35$) und heterogenen Zusammensetzung der Kohorte, da die eingeschlossenen Fälle hauptsächlich TNBC ($n=12$) waren.

Ein ungünstiger prognostischer Einfluss einer PTK7 Überexpression wird in der Literatur auch bei weiteren Malignomen beschrieben. In der Arbeit um Jin et al. wurden mittels IHC-Bestimmung die PTK7-Expression in 194 intrahepatischen Cholangiokarzinom Proben gemessen. Eine hohe PTK7-Expression war dabei letztlich mit einem schlechten DFS und OS assoziiert (Jin et al. 2014). Auch 34% der Kolorektalen Karzinome zeigten eine PTK7-Überexpression, die mittels Tissue MicroArray (TMA) von 192 Patienten gemessen wurde. Nichtmetastasierte Kolorektaletumore, die eine hochregulierten PTK7-Expression aufwiesen, waren

zudem mit einem reduzierten Metastasen-freien Überleben assoziiert (Lhoumeau et al. 2015). Die tumorfördernde Wirkung und Invasivität von PTK7 konnte dabei in vitro bestätigt werden. Wurde PTK7 herunterreguliert, führte dies zu reduziertem Tumorwachstum, wohingegen bei einer Überexpression von PTK7 die Invasion und Tumorprogression zunahm (Gobble et al. 2011, Lhoumeau et al. 2015). Diese Resultate entsprechen den Ergebnissen von Meng et al., welche in Kolonkarzinom Zelllinien eine anti-apoptotische Funktion von PTK7 nachweisen konnten (Meng et al. 2010).

In der Literatur werden jedoch auch kontroverse Ergebnisse beschrieben, die möglicherweise auf malignomspezifische Unterschiede hinweisen können. So wirken sich eine PTK7 Überexpression beim Magen-, Ovarial- und bronchialen Adenokarzinom eher günstig auf das Überleben aus (Endoh et al. 2004, Lin et al. 2012, Wang et al. 2014). Daher ist eine umfangreiche Untersuchung erforderlich, bevor PTK7 als ein Prognosemarker für das Mammakarzinom klassifiziert werden kann. Generell gibt sich die Problematik der Vergleichbarkeit sämtlicher Studien durch intermethodische Differenzen zur Bestimmung von PTK7. Ein direkter Vergleich zwischen den Arbeiten ist deshalb nur schwer möglich. Mit unserer Arbeit wurde die Rolle von PTK7 beim Mammakarzinom erstmalig untersucht.

PTK7 als prädiktiver Marker für die adjuvante Chemotherapie

Um den Einfluss von PTK7 auf die adjuvante Chemotherapie und von Prebet et al. proklamierte Anthrazyklin-Resistenz zu evaluieren, wurde die prädiktive Bedeutung der PTK7 Expression untersucht (Prebet et al. 2010). Sie beobachteten in ihrem Kollektiv vom AML-Patienten, die eine anthrazyklinhaltige Therapie erhalten hatten, ein signifikant kürzeres AML-freies Überleben bei hoher PTK7 Expression. Ergänzt und unterstützt wurde ihre Hypothese der PTK7 induzierten Anthrazyklinresistenz durch Zelllinienversuchen, da Zellen die kein PTK7 exprimierten diese Resistenz nicht zeigten (Prebet et al. 2010).

In unserer Arbeit konnten wir die von Prebet et al. aufgestellte Hypothese der Anthrazyklin-Resistenz unterstützen. Patienten mit hoher PTK7 Expression, die ausschließlich eine Anthrazyklin-basierte CTX (Gruppe A) erhielten zeigten im Vergleich zu Chemo-naiven (Gruppe C) Gruppe keinen Chemotherapie-Benefit ($p=0.06$). Im Gegensatz hierzu profitierten Patienten mit hoher PTK7 Expression von einer CTX, die Taxane/andere Substanzen enthielt ($p<0.000$). Während sich für

Patienten mit niedriger LN PTK7 Expression kein Unterschied im DFS bezüglich der adjuvanten CTX (Gruppe A oder B) versus CTx naiv (Gruppe C) feststellen ließ. Diese mögliche Therapielimitation der Anthrazyklinbasierten CTx in der Patientengruppe mit hohen PTK7-Werten gibt Aufschluss über klinisch relevante Fragen bezüglich chemotherapeutischer Wirksamkeit und unterstützt die Hypothese, dass eine PTK7 Expression zu einer Anthrazyklinresistenz führen könnte und wäre damit ein potentieller prädiktiver Marker.

In vivo Daten beim TNBC untermauern die These der Anthrazyklinresistenz in PTK7 überexprimierenden Tumoren. So konnten Ataseven et al. in einem Kollektiv von 133 TNBC Patientinnen in 28,6% der Fälle eine PTK7 Expression immunohistochemisch nachweisen. Wenngleich die Autoren in der Gesamtkohorte keinen signifikanten Unterschied im DFS/OS in Anhängigkeit von der PTK7-Expression nachweisen konnten, zeigt sich jedoch in der Subgruppe der rein anthrazyklinbasiert chemotherapierten Patienten ein Trend zugunsten eines besseren DFS für Patienten mit niedriger PTK7-Expression (Ataseven et al. 2013). Aus den oben genannten Studien kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt lediglich eine Hypothese der Anthrazyklinresistenzinduktion durch eine PTK7-Expression abgeleitet werden. Weiterführende prospektiv randomisierte Untersuchungen an einem größeren und homogen therapierten Kollektiv sollten eingeleitet werden, um die klinisch sehr relevante Fragestellung weitreichend zu beantworten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in dieser vorliegenden Arbeit erstmals die Rolle von PTK7 im Mammakarzinom-Gewebe evaluiert wurde. Wenngleich aufgrund der ausgeprägten Heterogenität im Kollektiv und insgesamt kleinen Fallzahl in Subpopulationen wir nicht in der Lage waren alle Fragestellungen zur prognostischen und prädiktiven Aussagekraft dieses Markers hinreichend statistisch zu belegen, gelang es uns dennoch, wichtige Hypothesen (z.B. Induktion der Anthrazyklinresistenz) zu untermauern. Sollten diese Ergebnisse durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden, stünde mit PTK7 ein aussagekräftiger Marker zur besseren prognostischen Einschätzung und weiteren Therapie zur Verfügung, um eine differenzierte und risikoadaptierte Behandlung von Mammakarzinompatienten zu erlangen.

6 Zusammenfassung

Die Einführung von Genexpressionsanalysen, hat in den letzten Jahren das Wissen um die Bedeutung der Subtypisierung von Mammakarzinomen wesentlich vertieft. Dabei unterscheiden sich diese hinsichtlich ihrer Prognose und ihres Therapieansprechens und ermöglichen eine individualisiertere onkologische Therapie. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Rolle der Proteintyrosinkinase 7 (PTK7) beim Mammakarzinom genauer zu beleuchten.

PTK7 wurde erstmals in Kolokarziomzellen identifiziert und spielt eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen der Embryogenese, wie auch der Tumorgenese/progression. Eine Überexpression von PTK7 konnte in verschiedenen soliden Malignomen z.B dem Magen-, Bronchial- oder Kolonkarzinom, als auch Tumoren des hämatopoetischen Systems (AML, T-ALL) detektiert werden. Allerdings wird die prognostische Rolle von PTK7 in der Literatur kontrovers diskutiert. Beim Magen- und Bronchialkarzinom zeigte sich eine hohe PTK7 Expression vorteilhaft für das Überleben der Patienten. Interessant für die prognostische Rolle von PTK7 scheint zudem eine in der Arbeit zur AML proklamierte Anthrazyklinresistenz von PTK7 zu sein.

In vorliegende Arbeit wurde im Kollektiv von 126 Mammkarzinom-Patienten die Expressions von PTK7 mittels molekulargentischer Methoden (rtPCR/qrtPCR) und Immunhistochemie im Primärtumor und ipsilateraler axillären Lymphknoten (tumorfrei LN-, N=35/ tumorinfiltriert LN+, N=82) untersucht. Bei bisher ausstehender Empfehlung zum PTK7-Nachweis erfolgte eine Evaluation. Dabei erwiesen sich PCR und IHC als valide Methoden zum Nachweis von PTK7, wobei fehlende cut-off Werte eine Vergleichbarkeit mit der aktuellen Literatur erschweren. Zudem sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der PTK7 Expression und histologischen Parametern (TNM-Klassifikation, Tumordifferenzierung, Grading, Steriodhormonrezeptor-und HER2-Status), dem Überleben (OS/DFS) der Patienten und einer möglichen Anthrazyklin-Resistenzbildung besteht.

Bezogen auf die adjuvante Chemotherapie wurde das Gesamtkollektiv in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe A Patienten mit anthrazyklinhaltiger Chemotherapie (Gruppe A, N=49), Gruppe B Patienten mit Chemotherapie, welche Taxane/andere Therapeutika enthielt (Gruppe B, N= 21) und Gruppe C Patienten ohne jegliche

Chemotherapie (Gruppe C, N=54). Eine Assoziation mit der PTK7 Expression im Brustgewebe lag lediglich für das Grading vor (qRT-PCR, $p=0.039$). Für die PTK7 Expression im Lymphknoten zeigte sich eine Assoziation mit der Anzahl der LN+ (pN) (RT-PCR, $p=0.060$). Eine hohe PTK7 Expression im LN war sowohl im Gesamtkollektiv (RT-PCR, $p=0.067$), als auch im Chemo-naiven Kollektiv (Gruppe C; RT-PCR, $p<0.001$) mit einem kürzeren 3-Jahres DFS verbunden. Darüberhinaus konnten wir die Hypothese der PTK7 induzierten Anthrazyklin-Resistenz im Lymphknotengewebe stützen. Dennoch muss die Übertragbarkeit der Studienergebnisse aufgrund der relativ geringen Fallzahl (N=124) und kurzen Nachbeobachtungszeit von 73.9 Monaten kritisch betrachtet werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich um die potentielle prognostische und prädiktive Rolle von PTK7 beim Mammakarzinom zu untermauern.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin Biotin Komplex
AML	Akut myeloische Leukämie
AMV-RT	Avian Myoblastosis Virus Reverse Transkriptase
ANOVA	Varianzanalyse univariat
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APC-Gen	Adenomatous polyposis coli Gen, Tumorsuppressorgen
ATP	Adenosintriphosphat
α -Tubulin	Referenzgen, rt-PCR
BC	<i>engl. breast cancer</i> , Mammakarzinom
Bkg	<i>engl. background</i> , Hintergrund
BRCA	<i>engl. breast cancer related genes</i> , Tumorsuppressorgene
CCK4	<i>engl. colon carcinoma kinase 4</i> , PTK7
CD44	Zelloberflächen Glycoprotein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMF	Cyclophosphamid, Fluoruracil, Methotrexat
CK19	Cytokeratin 19
CTx	Chemotherapie
Δ	Differenz
DAB	Diaminobenzidin
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonatwasser
DFS	<i>engl. disease free survival</i> , Krankheitsfreies Überleben
dH ₂ O	Aqua destillata
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dsh	<i>engl. dishevelled gene</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Doxorubicin/Epirubicin, Cyclophosphamid

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>engl. epidermal growth factor receptor</i>
EMT	<i>engl. epithelial-mesenchymal-transition</i>
Eph	Epinephrin
EPOS	<i>engl. enhanced polymer one step staining</i>
ER	Östrogenrezeptor
FEC	Fluoruracil, Doxorubicin, Cyclophosphamid
FISH	Floureszenz in situ Hybridisierung
FRET	Floureszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Fzd	<i>engl. frizzled receptor</i>
G	Grading
GTC	Guanidinisothiocyanat
HCL	Chlorwasserstoff
HER2	<i>engl. human epidermal growth factor receptor 2, c-erbB2</i>
HER3	erbB-3
HIER	<i>engl. heat-induced epitope retrieval</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	Steroidhormonrezeptor
HRP	<i>engl. horseradish peroxidase</i>
IHC	Immunhistochemie
Ig	Immunglobulin
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
kB	Kilo-Basenpaar
kDa	Kilo Dalton
Ki-67	MKI6, Protein
KLG	<i>engl. kinase like-gene</i>
KRAS	<i>engl. kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
LN	Lymphknoten
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
MIB-1	Monoklonaler Antikörper Ki-67
min	Minute
mRNA	<i>engl. messenger Ribonukleinsäure</i>

n	Anzahl
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OS	<i>engl. overall survival</i> , Gesamtüberleben
OTK	<i>engl. off track</i> , Drosophila PTK7
OT	Objektträger
PAI1	Urokinasetyp Plasminogenaktivator-inhibitor 1
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
PAR 1	<i>engl. protease-activated receptor</i>
PCP	planare Zellpolarität
pH	negative dekadische Logarithmus der H-Aktivität
PR	Progesteronrezeptor
PTK7	Pseudotyrosinkinase 7, CCK4
qRT-PCR	<i>engl. quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RET	Rezeptortyrosinkinase, Protoonkogen
RNA	Ribonukleinsäure
RS	<i>engl. recurrence score</i>
RT	Raumtemperatur
rtPCR	<i>engl. semiquantitative real time polymerase chain reaction</i>
RTx	Radiotherapie
RTKs	Rezeptortyrosinkinasen
TAC	Docetaxel, Doxorubicin, Cyclophosphamid
TAE	Tris Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
T-ALL	T-Zell Akute lymphatische Leukämie
TNBC	<i>engl. triple negative breast cancer</i>
TNM	Tumor, Node (Lymphknoten), Metastasen
Tris-Puffer	Trishydroxymethylaminomethanpuffer
uPA	Urokinasetyp Plasminogenaktivator
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGFR	<i>engl. vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wnt	Signaltransduktionsweg

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klassisches Stufenmodell der Kanzerogenese (IHC_Bilder BC3,BC 187, BC 355, nach Agnatis et al. 2004)	Seite 7
Abb.2: Therapiekonzepte beim frühen Brustkrebs (adaptiert nach Harbeck et al.2017)	Seite 15
Abb 3: Übersicht Patientenmaterialien und Methoden	Seite 18
Abb. 4: Assoziation Chemotherapiewahl im Kollektiv der untersuchten Primärtumore (BC) (A) und Lymphknoten (LN) (B).	Seite 34
Abb. 5: Korrelation PTK7 Expression in den molekulargenetischen PCR-Methoden im Lymphknoten.	Seite 38
Abb. 6: Korrelation der PTK7 Expression im Mammakarzinom (BC) und Lymphknoten (LN tumorfrei/Metastase) in der semiquantitativen (A) und realtime (B) PCR.	Seite 39
Abb. 7: PTK7 Expression in der PCR-Gelelektrophorese	Seite 39
Abb. 8: Zusammenhang PTK7 Expression und Steroidhormonrezeptorstatus (ER/PR) im LN+ gemessen mittels rtPCR.	Seite 42
Abb. 9: Zusammenhang histopathologische Beurteilung der Lymphknoten (tumorfrei/infiltriert) und PTK7-Level (high/low) in der rtPCR.	Seite 44
Abb 10: PTK7 Verteilung im Lymphknotengewebe bei Patienten mit tumorfreien im Vergleich zu tumorinfiltrierten Lymphknoten in der rt-PCR.	Seite 44
Abb.11: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der PTK7 Werte im Lymphknoten (LN), rtPCR.	Seite 45
Abb. 12: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der Therapieentscheidung und PTK7 im Lymphknoten (LN).	Seite 46
Abb. 13: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der Kohorten A+C (A) versus B (B) und PTK7 im Lymphknoten (LN).	Seite 47
Abb. 14: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit high PTK7 und der Kohorten C versus B (A) und Kohorten C versus A (B) im Lymphknoten (LN), rtPCR.	Seite 48

Abb. 15: Zusammenhang histopathologische Beurteilung der Lymphknoten (tumorfrei/infiltriert) und PTK7-Level (high/low) in der qrtPCR	Seite 51
Abb. 16: Expressionslevel von PTK7 im Vergleich infiltrierter und tumorfreier Lymphknoten in der qrt-PCR	Seite 52
Abb. 17: DFS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der PTK7 Werte im BC, qrtPCR	Seite 53
Abb. 18: OS nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der der PTK7 Werte im LN, qrtPCR	Seite 53
Abb. 19: Schwache zytoplasmatische Expression (1+) von PTK7 im Mammakarzinom	Seite 54
Abb. 20: Mittlere zytoplasmatische Expression (2+) von PTK7 im Mammakarzinom	Seite 55
Abb. 21: Starke zytoplasmatische Expression (3+) von PTK7 im Mammakarzinom	Seite 55
Abb. 22: Anzahl der Mammakarzinome (BC) mit dem erreichten Score (0-3+) in der immunhistochemischen Färbung von PTK7	Seite 56
Abb.23: Anzahl TNBC Mammakarzinompatienten mit dem erreichten Grading (0 bis 3+) in der immunhistochemischen Färbung von PTK7	Seite 57
Abb.24: Anzahl Mammakarzinompatienten mit dem erreichten Score (0 bis3+)im Lymphknoten (LN) in der immunohistochemischen Färbung von PTK7	Seite 57
Abb.25: Anzahl TNBC Mammakarzinompatienten mit dem erreichten Score (0 bis3+) im Lymphknoten (LN) in der immunhistochemischen Färbung von PTK7	Seite 58
Abb. 26: Kaplan-Meier-Kurve: Einfluss von PTK7 IHC im Lymphknoten (LN) auf das Gesamtüberleben (OS)	Seite 61

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten prognostischen (Prog.) und prädiktiven (Präd.) Faktoren beim Mammakarzinom (nach Tumormanual, Tumorzentrum München 2013)	Seite 12
Tabelle 2: Zusammensetzung der Denaturierungslösung.	Seite 18
Tabelle 3: Zusammensetzung des 1% Agarosegels.	Seite 19
Tabelle 4: Substanzen zur cDNA-Synthese.	Seite 20
Tabelle 5: Zusammensetzung Mastermix.	Seite 21
Tabelle 6: Schritte klassische semiquantitative PCR.	Seite 22
Tabelle 7: Primersequenzen der klassischen semiquantitativen PCR.	Seite 22
Tabelle 8: Reaktionsmix der real time quantitativen PCR.	Seite 23
Tabelle 9: Schritte der real time quantitativen PCR	Seite 23
Tabelle 10: Primersequenzen der real time quantitativen PCR.	Seite 24
Tabelle 11: Zusammensetzung des Citratpuffer der IHC.	Seite 26
Tabelle 12: Zusammenfassung der klinischen und histologischen Daten der 126 Mammakarzinompatienten	Seite 31
Tabelle 13: Histologische und klinische Daten der 124 Mammakarzinompatienten der rtPCR.	Seite 35
Tabelle 14: Histologische und klinische Daten der 78 Mammakarzinompatienten der qrtPCR.	Seite 36
Tabelle 15: Histologischen und klinischen Daten der 35 Mammakarzinompatienten der IHC	Seite 37
Tabelle 16: Korrelation der PTK7 Expression in der rtPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor (BC), t-Test.	Seite 41
Tabelle 17: Korrelation der PTK7 Expression in der rtPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), ANOVA.	Seite 41
Tabelle 18: Korrelation der PTK7 Expression in der rtPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), t-Test.	Seite 43

Tabelle 19: Korrelation der PTK7 Expression in der qPCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), ANOVA.	Seite 43
Tabelle 20: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor (BC), t-Test.	Seite 49
Tabelle 21: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern im Primärtumor (BC), ANOVA.	Seite 49
Tabelle 22: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern in Lymphknoten Metastasen (LN+), t-Test.	Seite 50
Tabelle 23: Korrelation der PTK7 Expression in der qrt-PCR mit den klinisch-pathologischen Parametern in LN-Metastasen (LN+), ANOVA.	Seite 51
Tabelle 24: Zusammenhang der immunhistochemischen PTK7 Werte und klinisch-pathologischen Parameter im Primärtumor (BC), t-Test.	Seite 59
Tabelle 25: Korrelation der immunhistochemischen PTK7 Werte mit den klinisch-pathologischen Parametern im Mammakarzinom (BC), ANOVA.	Seite 59
Tabelle 26: Korrelation der immunhistochemischen PTK7 Werte mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), t-Test.	Seite 60
Tabelle 27: Korrelation der immunhistochemischen PTK7 Werte mit den klinisch-pathologischen Parametern im Lymphknoten (LN), ANOVA.	Seite 60

7.4 Literaturverzeichnis

Agnatis NJ, Fatouros M, Arampatzis J, Briasoulis E, Ignatiadou EV. 2004 Carcinogenesis of Breast Cancer: Advances and Applications. *Gastric Breast Can* 3 (1): 13-22

Allred DC, Clark GM, Molina R, Tandon AK, Schnitt SJ, Gilchrist, KW, Osborne, CK, Tormey, DC, McGuire WL. 1992. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum. Pathol* 23 (9):974-79

Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, Schmitt F. 2011. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* 64 (6): 493-7

Ataseven B, Angerer R, Kates R, Gunesch A, Knyazev P, Högel B; Becker C; Eiermann W; Harbeck N. 2013. PTK7 Expression in Triple-negative Breast Cancer. *Anticancer Res.* 33 (9):3759-63

Azambuja E de, Cardoso F, Castro G de, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. 2007. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br. J. Cancer* 96 (10):1504-13

Bauernfeind I, ed. 2011. *Mammakarzinome*. München, Wien, New York: Zuckschwerdt. 13th ed.

Bernards R, Weinberg RA. 2002. Metastasis genes: A progression puzzle. *Nature* 418 (6900):823-26

Blume-Jensen P, Hunter T. 2001. Receptor tyrosine kinases: role in cancer progression *Nature* 411 (6835):355-65

Boenisch T. 2009. *Immunohistochemical (IHC) staining methods: DAKO Diagnostika GmbH*. 5.Auflage

Bonnier P, Romain S, Charpin C, Lejeune C, Tubiana N, Martin PM, Piana L. 1995. Age as a prognostic factor in breast cancer: relationship to pathologic and biologic features. *Int. J. Cancer* 62 (2):138-44

Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR. 2006. Emerging roles of pseudokinases. *Trends in Cell Biology* 16 (9):443-52

Burkhardt L, Grob TJ, 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. Treat* 123 (3):757-65

Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25(2):169-93.

Camilli TC, Weeraratna AT. 2010. Striking the target in Wnt-y conditions: Intervening in Wnt signaling during cancer progression. *Biochemical Pharmacology* 80 (5):702-11

Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. 1988. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (85):8790-94

Carter CL, Allen C, Henson DE. 1989. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63 (1):181-87

Chan DN, Azghadi SF, Feng J, Lowry WE. 2012. PTK7 marks the first human developmental EMT in vitro. *PLoS ONE* 7 (11):e50432

Chen R, Khatri P, Mazur PK; Polin M, Zheng Y, Vaka D, Hoang CD, Shrager J, Xu Y, Vicent S, Butte AJ, Sweet-Cordero EA. 2014. A meta-analysis of lung cancer gene expression identifies PTK7 as a survival gene in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 74 (10): 2892-902

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 162 (1):156-59

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 (5):403-10

Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, Konishi H, Osada H, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. 2004. Prognostic Model of Pulmonary Adenocarcinoma by Expression Profiling of Eight Genes As Determined by Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *J Clin Oncol* 22 (5):811-19

Essermann L, Thompson IM, Reid B. 2013. Overdiagnosis and Overtreatment in Cancer. *JAMA* 310 (8): 797

Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (5):759-67

Fidler IJ. 1990. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50 (19):6130-38

Fidler IJ. 2003. Timeline: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3 (6):453-58

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R. 1983. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 52 (9):1551-57

- Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R 1988. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 6: 1076-1087
- Friedrichs/Mundhenke. 2011. Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome. Prognostische und prädiktive Faktoren. AGO, Empfehlungen Gynäkologische Onkologie Arbeitsgruppe Mamma. www.ago-online.de
- Gärtner S, Gunesch A, Knyazeva T, Wolf P, Högel B, Eiermann W, Ullrich A, Knyazev P, Ataseven B. 2014. PTK 7 Is a Transforming Gene and Prognostic Marker for Breast Cancer and Nodal Metastasis Involvement. *PLoS ONE* 9 (1):e84472
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 31 (1):13-20
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamos NK. 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal* 278(1):16-27
- Gobble RM, Qin LX, Brill ER, Angeles CV, Ugras S, O'Connor RB, Moraco NH, Decarolis PL, Antonescu C, Singer S. 2011. *Cancer Res*: 71(7):2697-705
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ. 2013 Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 24: 2206-2223
- Golubkov VS, Chekanov AV, Cieplak P, Aleshin AE, Chernov AV, Zhu W, Radichev IA, Zhang D, Dong PD, Strongin AY. 2010. The Wnt/Planar Cell Polarity Protein-tyrosine Kinase-7 (PTK7) Is a Highly Efficient Proteolytic Target of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase: Implications in cancer and embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 285 (46):35740-49
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1):57-70
- Harbeck N, Thomssen C, Berger U, Ulm K, Kates RE, Höfler H, Jänicke F, Graeff H, Schmitt, M. 1999. Invasion marker PAI-1 remains a strong prognostic factor after long-term follow-up both for primary breast cancer and following first relapse. *Breast Cancer Res Treat* 54 (2):147-57
- Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. 2004. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb. Haemost* 91 (3):450-56
- Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep CG, Lisboa BW, Lux MP, Beck T, Hasmüller S, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C; Chemo-N 0 Study Group. 2013. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial

validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *European Journal of Cancer* 49 (8):1825–35

Harbeck N, Gnant M. 2017: *Breast Cancer Lancet*; 389 (10074): 1134-50

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. 2007. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol* 25 (33):5287–312

Hayes M, Naito M, Daulat A, Angers S, Ciruna B. 2013. Ptk7 promotes non-canonical Wnt/PCP-mediated morphogenesis and inhibits Wnt/ β -catenin-dependent cell fate decisions during vertebrate development. *Development* 140 (8):1807–18

Horobin RW, Kiernan JA, Conn HJ. 2002. *Conn's biological stains. A handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine.* Oxford: Published for the Biological Stain Commission by BIOS. 10th ed.

Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, Nielsen TO, Perou CM, et al. 2009. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J. Clin. Oncol* 27 (8):1168–76

Husmann G. 2010. *Krebs in Deutschland. 2005/2006 ; Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.* Berlin, Saarbrücken: Robert Koch-Inst; GEKID. 7. Ausg.

Jiang G, Zhang M, Yue B, Yang M, Carter C, Al-Quran SZ, Li B, Li Y. 2012. PTK7: A new biomarker for immunophenotypic characterization of maturing T cells and T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 36(11):1347-53

Jin J, Ryu HS, Lee KB, Jang J, Ahn SH. 2014. High Expression of Protein Tyrosine Kinase 7 Significantly Associates with Invasiveness and Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *PLoS ONE* 9 (2):e90247

Jung JW, Ji AR, Lee J, Kim UJ, Lee ST. 2002. Organization of the human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule and alternative splicing of its mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1579 (2-3):153–63

Kaaks R, Berrino F, Key T, Rinaldi S, Dossus L, Chang-Claude J, Clavel-Chapelon F, Fournier A, van Gils CH, Gonzalez CA, Gurrea AB, Critselis E, Khaw KT, Krogh V, Lahmann PH, Nagel G, Olsen A, Onland-Moret NC, Overvad K, Palli D, Panico S, Peeters P, Quirós JR, Roddam A, Thiebaut A, Tjønneland A, Chirlaque MD, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tumino R, Vineis P, Norat T, Ferrari P, Slimani N, Riboli E. 2005. Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J. Natl. Cancer Inst* 97 (10):755–65

Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. 2006. Preparing the "Soil": The Premetastatic Niche. *Cancer Research* 66 (23):11089–93

- Katoh M. 2005. Wnt/PCP signaling pathway and human cancer. *Oncology Reports* 14 (6): 1583-1588
- Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386 (6627):761-63
- Ladanyi M, Hogendoorn PCW, Bombonati A, Sgroi DC. 2011. The molecular pathology of breast cancer progression. *J. Pathol.* 223 (2):308-18
- Lhoumeau AC, Martinez S, Boher JM, Monges G, Castellano R, Goubard A, Doremus M, Poizat F, Lelong B, de Chaisemartin C, Bardin F, Viens P, Raoul JL, Prebet T, Aurrand-Lions M, Borg JP, Gonçaves A. 2015. *PLoS One.* 10(5):e0123768.
- Lin Y, Zhang L, Wang X, Xing X, Cheng X, Dong B, Hu Y, Du H, Li YA, Zhu YB, Ding N, Du YX, Li JY, Ji JF. et al. 2012. PTK7 as a novel marker for favorable gastric cancer patient survival. *J Surg Oncol* 106(7):880-6
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25 (4):402-08
- Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtatos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA. 2002. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst* 94 (2):116-28
- Lu X, Borchers AGM, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. 2004. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430 (6995):93-98
- Lyons J. 1992. The polymerase chain reaction and cancer diagnostics. *Cancer.* 69:1527-1531
- Marks JR, Humphrey PA, Wu K, Berry D, Bandarenko N, Kerns BJ, Iglehart JD. 1994. Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann. Surg* 219 (4):332-41
- Masuda N, Akiyama F, Tsuda H, Noguchi S, Tsujimoto M, Inaji H, Nakamura S, Otomo Y, Matsuura N. 2015. A new one-step nucleic acid amplification (OSNA) with cytokeratin (CK) 19 mRNA for intraoperative detection of lymph node (LN) metastasis in breast cancer patients: results from the multiinstitutional clinical study. *The Breast online* DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(07\)70094-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(07)70094-2)
- Meng L, Sefah K, O'Donoghue MB, Zhu G, Shangguan D, Noorali A, Chen Y, Zhou L, Tan W. 2010. Silencing of PTK7 in Colon Cancer Cells: Caspase-10-Dependent Apoptosis via Mitochondrial Pathway. *PLoS ONE* 5 (11):e14018

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15(2):117-34

Mossie K, Jallal B, Alves F, Sures I, Plowman GD, Ullrich A. 1995. Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 11(10):2179-84.

Muller-Tidow C, Schwäble J, Steffen B, Tidow N, Brandt B, Becker K, Schulze-Bahr E, Halfter H, Vogt U, Metzger R, Schneider PM, Büchner T, Brandts C, Berdel WE, Serve H.. 2004. High-Throughput Analysis of Genome-Wide Receptor Tyrosine Kinase Expression in Human Cancers Identifies Potential Novel Drug Targets. *Clin Cancer Res* 10 (4):1241-49

Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, et al. 2010. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res* 16 (21):5222–32

Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR. 1994. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J. Clin. Oncol* 12 (5):888–94

Nowell P. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (4260):23–28

Nusse R, Varmus HE. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31 (1):99–109

Oesterreich S, Fuqua SA. 1999. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 6 (3):405–19

Oldenhuis CNAM, Oosting SF, Gietema JA, Vries EGE de. 2008. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur. J. Cancer* 44 (7):946–53

Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, et al. 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol* 27 (8):1160–67

Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. 2006. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 48 (6):702–07

Paudyal A, Damrau C, Patterson VL, Ermakov A, Formstone C, Lallane Z, Wells S, Lu X, Norris DP, Dean CH, Henderson DJ, Murdoch JN. 2010. The novel mouse mutant, chuzhoi, has disruption of Ptk7 protein and exhibits defects in neural tube, heart and lung development and abnormal planar cell polarity in the ear. *BMC Dev. Biol.* 10:87

Peradziryi H, Kaplan NA, Podleschny M, Liu X, Wehner P, Borchers A, Tolwinski NS. 2011. PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *EMBO J*. 30 (18):3729–40

Peradziryi H, Tolwinski NS, Borchers A. 2012. The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch. Biochem. Biophys.* 524 (1):71–76

Pietiläinen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma V, Syrjänen K. 1996. The important prognostic value of Ki-67 expression as determined by image analysis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 122 (11):687–92

Poste G. 1982. Cellular heterogeneity in malignant neoplasms and the therapy of metastases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 397:34–48

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, et al. 2010. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12 (5):R68

Prat A, Perou CM. 2011. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology* 5 (1):5–23

Prebet T, Lhoumeau A, Arnoulet C, Aulas A, Marchetto S, Audebert S, Puppo F, Chabannon C, Sainty D, Santoni MJ, Sebbagh M, Summerour V, Huon Y, Shin WS, Lee ST, Esterni B, Vey N, Borg JP. 2010. The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. *Blood* 116 (13):2315–23

Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ. 1997. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol* 15 (8):2894–904

Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. 1990. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5 (7):953–62

Puppo F, Thomé V, Lhoumeau A, Cibois M, Gangar A, Lembo F, Belotti E, Marchetto S, Lécine P, Prébet T, Sebbagh M, Shin WS, Lee ST, Kodjabachian L, Borg JP. 2010. Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/ β -catenin canonical signalling. *EMBO Rep* 12 (1):43–49

Robinson DR, Wu YM, Lin SF. 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19 (49):5548–57

Rosen PR, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. 1989. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J. Clin. Oncol* 7 (3):355–66

Russo J, Russo IH. 2006. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102 (1-5):89–96

Saha S. 2001. A Phosphatase Associated with Metastasis of Colorectal Cancer. *Science* 294 (5545):1343–46

S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2017, AWMF-Registernummer 032-0450L, Zuckerschwerdt Verlag

Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 2001. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 294(5545):1343-6

Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, Fritsche HA, Smith TL, Hortobagyi GN, Ayala AG. 1991. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* 68 (3):549–57

Shackney SE, Silverman JF. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol* 2003; 10: 278–290

Shin W, Kwon J, Lee HW, Kang MC, Na H, Lee S, Park JH. 2013. Oncogenic role of protein tyrosine kinase 7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 104 (8):1120–26

Shin W, Maeng Y, Jung J, Min J, Kwon Y, Lee S. 2008. Soluble PTK7 inhibits tube formation, migration, and invasion of endothelial cells and angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (4):793–98

Shnitsar I, Borchers A. 2008. PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. *Development* 135 (24):4015–24

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. 2006. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 314 (5797):268–74

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. et al. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med* 344 (11):783–92

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (19):10869–74

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, et al. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100 (14):8418–23

Speers C, Tsimelzon A, Sexton K, Herrick AM, Gutierrez C, Culhane A, Quackenbush J, Hilsenbeck S, Chang J, Brown P. 2009. Identification of Novel Kinase Targets for the Treatment of Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 15 (20):6327–40

Sund M, Kalluri R. 2009. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28 (1-2):177–83

Tumorregister München (TRM) (2013) <http://www.tumorregister-muenchen.de>

Tumorzentrum München (Bauernfeind ed) Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. Herausgeber Tumorzentrum München (2011)

Tumorzentrum München (Bauernfeind ed) Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome. Herausgeber Tumorzentrum München (2013)

van Veer LJ 't, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415 (6871):530–36

von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, Lohr A, Gerber B, Heinrich G, Eidtmann H, Kaufmann M, Hilfrich J, Jackisch C, Zuna I, Costa SD. 2005 In vivo chemosensitivityadapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: the GEPARTRIO pilot study. *Ann Oncol* 16: 56-63;

von Minckwitz G., Blohmer JU., Raab G., Lohr A., Gerber B., Heinrich G., Eidtmann H., Kaufmann M., Hilfrich J., Jackisch C., Zuna I., Costa SD. 2005. In vivo chemosensitivityadapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: the GEPARTRIO pilot study. *Ann Oncol* 16: 56-63;

Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM. 2002. Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev. Cell* 2 (6):695–706

Wang J, Hamblet NS, Mark S, Dickinson ME, Brinkman BC, Segil N, Fraser SE, Chen P, Wallingford JB, Wynshaw-Boris A. 2006. Dishevelled genes mediate a conserved mammalian PCP pathway to regulate convergent extension during neurulation. *Development* 133 (9):1767–78

Wang H, Li G, Yin Y, Wang J, Wang H, Wei W, Guo Q, Ma H, Shi Q, Zhou X, Wang J. 2014. PTK7 protein is decreased in epithelial ovarian carcinomas with poor prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(11):7881-9

Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. 1975. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* 55 (2):231–73

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. 2007. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* 318 (5853):1108-13

Zhang H, Wang A, Qi S, Cheng S, Yao B, Xu Y. 2014. Protein tyrosine kinase 7 (PTK7) as a predictor of lymph node metastases and a novel prognostic biomarker in patients with prostate cancer. *Int J Mol Sci* 15 (7):11665-77

8 Lebenslauf

9 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle

Bei Herrn Prof. Dr. med. Sven Mahner für die Möglichkeit diese Doktorarbeit an seiner Klinik durchführen zu dürfen, sowie Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die Kooperation mit der klinischen Forschungsgruppe, Molekularbiologie des Max-Planck-Instituts, Martinsried.

Bei meiner Doktormutter Frau Prof. Nadia Harbeck, für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, sowie Betreuung der Dissertation. Wie auch Herrn Dr. Pjotre Knyazev und Frau PD Dr. Beyhan Ataseven für die verlässliche Unterstützung und steten Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit, sowie Publikation der Daten.

Bei Dr. Bernhard Högel für die Möglichkeit der Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen in der pathologischen Gemeinschaftsparaxis Drs. Högel und Becker.

Bei Dr. Ronald Kates und Frau Wolf, die mich bei statistischen Auswertung und Bearbeitung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Dr. Tatjana Knyazeva und allen Mitgliedern der Molekularbiologischen Abteilung MPI für die stets kollegiale Atmosphäre, den regen Austausch und die freundschaftliche Aufnahme am Institut. Sowie meiner Mitstreiterin Regina Angerer für die lange Zusammenarbeit und die daraus entstandene Freundschaft.

Und schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, für ihre fortwährende Unterstützung und meinem Mann Thomas Malik von ganzem Herzen für den unerschütterlichen Beistand, seine Liebe und Motivation während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchung von PTK7:
Expression der Rezeptortyrosinkinase im primären Mammakarzinom und
ipsilateralen axillären Lymphknoten“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftum 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 zu Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 07.02.2019

Angela Malik