

*Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Sven Mahner*

**Immunhistochemischer Nachweis von nukleären
Rezeptoren beim sporadischen Mammakarzinom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Magdalena Maria Kailuweit
aus Langenhagen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Arnholdt
PD Dr. Dorit Di Gioia

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Nina Ditsch

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2019

Eidesstattliche Versicherung

Kailuweit, Magdalena Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Immunhistochemischer Nachweis von nukleären Rezeptoren beim sporadischen
Mammakarzinom“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.10.2019

Ort, Datum

Magdalena Kailuweit

Unterschrift Doktorandin

1 Inhalt

2	Einleitung	7
2.1	Epidemiologie	7
2.2	Therapie des Mammakarzinoms.....	8
2.3	Prognose und Prädiktion.....	9
2.4	Rezeptorexpression als Prognose- und Prädiktionsfaktor	11
3	Zielsetzung	14
4	Material	15
4.1	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
4.2	Verwendete Reagenzien.....	15
4.3	Primärantikörper	16
4.4	Detektionssysteme.....	16
5	Methoden	16
5.1	Formalinfixierung	16
5.2	Paraffineinbettung.....	17
5.3	Immunhistochemie.....	18
5.3.1	Entparaffinierung.....	18
5.3.2	Blockierung der endogenen Peroxidase	18
5.3.3	Demaskierung.....	18
5.3.4	Immunhistochemische Färbung: Indirekte Methode.....	19
5.3.5	Detektion.....	20
5.3.6	Dehydrierung und Eindecken.....	22
5.3.7	Blockierung	22
5.4	Auswertung	22
5.4.1	Zytoplasmatische Expression von PPAR γ	23
5.5	Statistische Analyse.....	23
6	Ergebnisse	25

6.1	Häufigkeiten	25
6.1.1	Patientinnenkollektiv	25
6.1.2	Klassifizierung des Tumors	26
6.1.3	Tumorhistologie.....	28
6.1.4	Prognostische Faktoren	28
6.1.5	Prädiktive Faktoren	33
6.1.6	Expression nukleärer Rezeptoren.....	34
6.2	Korrelationsanalysen	37
6.2.1	Korrelation der Expression der jeweiligen Rezeptoren.....	37
6.2.2	Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Tumormerkmalen	38
6.2.3	Korrelation zwischen Rezeptorexpression und prädiktiven Faktoren.....	43
6.3	Überlebenskurven.....	44
6.3.1	Gesamtüberleben.....	44
6.3.2	Rezidivfreies Überleben	46
7	Diskussion.....	48
7.1	Diskussion der Methode	49
7.2	Vitamin D3-Rezeptor (VDR).....	50
7.2.1	VDR-Expression auf malignen Mammatumoren	50
7.2.2	Regulation der VDR-Expression	50
7.2.3	VDR-Expression und Differenzierungsgrad des Tumors.....	51
7.2.4	VDR-Expression und Tumorgroße	51
7.2.5	VDR-Expression und Lymphknotenmetastasen.....	52
7.2.6	VDR-Expression und Östrogenrezeptor-Expression	52
7.2.7	VDR-Expression und Überleben	53
7.3	Retinoidrezeptor alpha (RXR α).....	55
7.3.1	RXR α -Expression und VDR-Expression	55
7.4	Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor gamma (PPAR γ).....	55
7.4.1	PPAR γ -Expression in Zytoplasma und Kern.....	56
7.4.2	Vergleich nukleärer und zytoplasmatischer PPAR γ -Expression	57
7.4.3	Nukleäre PPAR γ -Expression und Differenzierungsgrad des Tumors	57
7.4.4	Zytoplasmatische PPAR γ -Expression und Prognose.....	58
8	Zusammenfassung	61

9	Literaturverzeichnis	64
10	Abbildungsverzeichnis.....	69
11	Tabellenverzeichnis	70
12	Abkürzungsverzeichnis.....	71
	Danksagung	73

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie

Krebserkrankungen werden in unserer alternden Gesellschaft ein immer wichtigeres Krankheitsbild. In Deutschland nimmt die Zahl der Patienten, die während ihres Lebens mit der Diagnose Krebs konfrontiert werden, stetig zu. Ursächlich sind neben verschiedenen Umwelteinflüssen vor allem die steigende Lebenserwartung sowie der demographische Wandel. Laut Robert-Koch-Institut muss aufgrund des demographischen Wandels in den Jahren 2010 bis 2030 mit einem Anstieg der Krebsneuerkrankungen um 20% gerechnet werden [1]. In der Gesamtbevölkerung sind das Prostatakarzinom, das Mammakarzinom, das kolorektale Karzinom und das Lungenkarzinom die häufigsten malignen Tumore. Bei der Frau steht das Mammakarzinom mit steigender Tendenz an der Spitze der häufigsten Krebserkrankungen [1].

Nach aktuellen Zahlen erkrankt mittlerweile jede achte Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Bereits in den letzten Jahren stieg die Inzidenz: in Deutschland wurde im Jahr 2014 eine Neuerkrankungsrate von 167,7 pro 100 000 Personen registriert, während im Jahr 2018 prognostisch bereits 173 pro 100 000 Personen und somit knapp 72 000 Frauen mit der Diagnose Brustkrebs konfrontiert werden [1]. Dieser Trend lässt sich weltweit verfolgen. Die vom World Cancer Research Fund veröffentlichten Zahlen aus dem Jahr 2018 sprechen von weltweit mehr als 2 Millionen neu registrierten Brustkrebserkrankungen. Mit dieser hohen Inzidenz macht Brustkrebs bereits ein Viertel aller malignen Tumorerkrankungen der Frau aus [2]. Auch aufgrund der genetischen Komponente ist Brustkrebs nicht nur eine Erkrankung des Alters. Im Gegensatz zu vielen anderen Malignomen betrifft das Mammakarzinom häufiger auch jüngere Frauen. Fast drei von zehn Frauen sind bei Erstdiagnose unter 55 Jahre alt [1].

Obwohl im Bereich der Diagnostik und Therapie viele Fortschritte erzielt wurden, ist die Mortalität des Mammakarzinoms noch immer hoch. Aufgrund der hohen Inzidenz und des niedrigen Erkrankungsalters sterben auch heute noch, trotz einer 5-Jahres-Überlebensrate von 88%, viele Frauen an Brustkrebs. 2014 erlagen allein in Deutschland 17 670 Patientinnen ihrer Brustkrebserkrankung [1]. Auch im Vergleich

mit anderen Todesursachen ist Brustkrebs von Bedeutung. Auf dem Ranking der WHO zu den häufigsten Todesursachen der Frau in Ländern mit hohem Pro-Kopf-Einkommen (*high-income countries*) im Jahr 2016 steht Brustkrebs auf Platz 10 [3]. Das erklärt die große Bedeutung der Erkrankung auch in Deutschland und bedingt das hohe Forschungsinteresse in der Gynäkologie und Onkologie zum Thema Brustkrebs. Neben neuen Therapiestrategien um die Morbidität und Mortalität des Mammakarzinoms zu reduzieren, hat die Forschung der letzten Jahrzehnte auch im Bereich der Diagnostik und Prognoseeinschätzung viele Fortschritte erlangt. Nicht zuletzt ist es das Ziel dieser Forschung, vorhandene Therapien gezielter einzusetzen und unerwünschte Nebenwirkungen weiter zu reduzieren.

2.2 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms hat sich in den letzten Jahren dank aktueller Forschungsergebnisse stark verändert. Durch die Etablierung neuer diagnostischer Möglichkeiten zur besseren Prognosestellung und individuelleren Beurteilung der einzelnen Mammakarzinome sowie Einführung der antihormonellen Therapie und anderer *targeted therapies* konnten nebenwirkungsreiche Therapien reduziert werden. Der mittlerweile verfolgte, multimodale Therapieansatz kombiniert lokale und systemische Behandlungen, welche anhand individueller Faktoren an das Risikoprofil einer jeden Patientin angepasst werden.

Historisch wurde das Mammakarzinom operativ mittels Mastektomie und Lymphadenektomie behandelt. Als weitere lokale Therapie wurde in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts die Strahlentherapie eingeführt [4]. Wenig später wurde die systemische Chemotherapie bei vorliegender Lymphknotenmetastasierung Gegenstand der Forschung und zunehmend klinisch angewandt. Klassischerweise kam hier ein Schema mit Cyclophosphamid-Methotrexat-5-Fluorouracil zur Anwendung [5]. Diese Therapieansätze waren zwar wirkungsvoll, hatten durch ihre unspezifische Anwendung allerdings viele, teils beträchtliche Nebenwirkungen. Mammakarzinompatientinnen mussten mit einer erheblichen Einschränkung ihrer Lebensqualität rechnen. Neben dem damals unvermeidlichen Verlust der Brust ging die Therapie häufig mit einem Lymphödem am Arm der betroffenen Seite einher, die Radiatio führte zu Hautirritationen bis hin zur Strahlendermatitis und die

Chemotherapie bedingte neben den akuten Nebenwirkungen in einzelnen Fällen sekundäre Malignome wie Leukämie [5].

Heutzutage ist die Therapie sehr viel zurückhaltender und kann aufgrund neuer Erkenntnisse gezielter und somit schonender eingesetzt werden.

Standard der lokalen Therapie ist die Brusthaltende Therapie (BET) mit anschließender lokaler Radiatio [6]. Nur in wenigen Fällen ist die Indikation zur Mastektomie gegeben, dazu gehören die inkomplette Entfernung des Tumors auch nach Nachresektion, das inflammatorische Karzinom oder der Patientenwunsch. Ist eine BET nicht realisierbar, wird eine Ablatio empfohlen, die meist auch schonender und für den Wiederaufbau zugänglicher als skin-sparing Mastektomie durchgeführt werden kann [6,7]. Die axilläre Lymphadenektomie erfolgt lediglich bei klinischem Verdacht auf Lymphknotenmetastasen. Besteht kein klinischer Anhalt für eine Metastasierung, ist die Untersuchung des Sentinel-Lymphknotens indiziert [8]. Besonders im Hinblick auf die prophylaktische Entfernung axillärer Lymphknoten ist die operative Therapie in den letzten Jahren durch aktuelle Forschungsergebnisse von einem Wandel betroffen. Die Folge ist ein zurückhaltenderes Vorgehen in Bezug auf die Axilladisektion bei positiven Sentinel-Lymphknoten in Niedrigrisiko-Kollektiven bei konsekutiver Strahlentherapie [9]. Es wird bereits diskutiert, ob im Falle einer Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie die Radiatio allein ausreichend und die operative Therapie dank moderner Bildgebungen als obsolet einzustufen ist [10].

Für die Wahl der systemischen Therapie stehen heutzutage neben der klassischen Chemotherapie, welche wiederum aus einer Reihe von verschiedenen Schemata entsprechend des Risikoprofils des Mammakarzinoms ausgewählt werden kann, antihormonelle und Antikörper-Therapien zur Verfügung. Die Entscheidung für die entsprechende Therapie richtet sich nach Einschätzung des Erkrankungsverlaufs (Prognose) und der voraussichtlichen Wirkung der systemischen Therapie (Prädiktion).

2.3 Prognose und Prädiktion

Laut der aktuellen Leitlinie aus dem Jahr 2016 sollten zur Bestimmung von Prognose und Prädiktion die Tumormerkmale und die Patientensituation dokumentiert werden,

indem pTNM, Resektionsrand, histologischer Typ, Grading, Lymphgefäß- und Blutgefäßinbrüche, Alter, Hormonrezeptorstatus, Her2neu-Status und Menopausen-Status erhoben werden [11].

Für die weitere Einschätzung der Prognose können etablierte Faktoren wie Ki-67 oder uPA/PAI-1 hinzugezogen werden. In Deutschland werden zusätzlich in den letzten Jahren vermehrt Multigen-Assays eingesetzt [12]. In der klinischen Praxis wird in der Regel eine Diagnostik-Kaskade genutzt, wobei die genannten Verfahren zur Anwendung kommen, um zwischen Niedrigrisiko- und Hochrisiko-Patientinnen unterscheiden zu können [13].

Diese Praxis trägt der Annahme Rechnung, dass es sich beim Mammakarzinom nicht um eine Erkrankung in unterschiedlicher Ausprägung, sondern um verschiedene Entitäten einer Erkrankung handelt. Die in den 80er Jahren geprägte Einteilung in hormonrezeptorpositive und –negative Karzinome wurde mittlerweile um weitere histologische Merkmale wie die Her2neu- und die Ki-67-Expression ergänzt.

Für die Prognose entscheidend und damit mittlerweile im klinischen Einsatz ist die Einteilung in histologische Subtypen, die diese histopathologischen Marker berücksichtigt. Diese Klassifikation unterscheidet vier prognostisch relevante Subtypen Luminal A, Luminal B, Her2 und Basal-like (siehe Tabelle 1). Durch Genexpressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um verschiedene Entitäten des Mammakarzinoms handelt [14–17]. Die Unterteilung des Mammakarzinoms in diese Subtypen wurde von der St. Gallener Konferenz als Grundlage für Prognosebestimmung und klinische Therapieentscheidung anerkannt [18].

Intrinsic subtype	Clinico-pathologic surrogate definition
Luminal A	'Luminal A-like' all of: ER and PR positive HER2 negative Ki-67 'low' Recurrence risk 'low' based on multi-gene-expression assay (if available)
Luminal B	'Luminal B-like (HER2 negative)' ER positive HER2 negative and at least one of: Ki-67 'high'

	PR 'negative or low' Recurrence risk 'high' based on multi-gene-expression assay (if available) 'Luminal B-like (HER2 positive)' ER positive HER2 over-expressed or amplified Any Ki-67 Any PR
Erb-B2 overexpression	'HER2 positive (non-luminal)' HER2 over-expressed or amplified ER and PR absent
'Basal-like'	'Triple negative (ductal)' ER and PR absent HER2 negative

Tabelle 1: Histopathologische Entsprechung der verschiedenen Subtypen entsprechend des St Gallen Expert Consensus 2013

2.4 Rezeptorexpression als Prognose- und Prädiktionsfaktor

Bei den histopathologischen Markern, die in der oben aufgeführten Einteilung Verwendung finden, handelt es sich um prognostisch relevante Merkmale des Mammakarzinoms. Ziel der vorangegangenen Forschung war der Nachweis von Proteinen, die bei der Tumorgenese und -progression eine Rolle spielen. Etablierte Faktoren wie Ki-67 oder Östrogen- und Progesteronrezeptoren besitzen prognostische oder sogar prädiktive Aussagekraft [13].

Ki-67 ist ein genereller Marker für Zellwachstum und wird bei der Prognoseeinschätzung verschiedener Karzinome genutzt. Beim Mammakarzinom etablierte sich die Bestimmung von Ki-67 und ist heute fester Bestandteil der histopathologischen Aufarbeitung von Mammakarzinomgewebe [19]. Von Bedeutung ist die Bestimmung des Proliferationsmarkers besonders in Mammakarzinom-Subtypen, die nach der Basisdiagnostik als *intermediate risk* eingestuft werden. Da Ki-67 ein Indikator für die Proliferationsaktivität der Mammakarzinomzellen ist, kann er eingesetzt werden um die Wirksamkeit einer Chemotherapie besser einzuschätzen [13, 20].

Östrogen- und Progesteronrezeptoren gehören zu den nukleären Rezeptoren und sind Steroidhormonrezeptoren. Es sind zwei Unterklassen von nukleären Rezeptoren bekannt. Zu den nukleären Rezeptoren der Unterklasse 1 zählen neben Östrogen- und Progesteronrezeptoren auch Androgen- und Mineralokortikoidrezeptoren. Diese liegen als Monomere im Zytosol vor und wandern erst nach Bildung eines stabilen Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern, um dort als Homodimere mit ihrem Zielgen zu interagieren [21].

1973 konnte der Östrogenrezeptor erstmals an Mammakarzinomgewebe nachgewiesen werden [22]. Doch bereits 1896 beschrieb Beatson die Ovariectomie, retrospektiv gesehen die Ausschaltung der endogenen Östrogenproduktion als mögliche Therapieoption bei metastasiertem, der operativen Therapie nicht zugänglichem Mammakarzinom [23]. Der prädiktive Wert der Östrogenrezeptorexpression am Tumorgewebe wurde bereits zu Beginn der Forschung zu möglichen endokrinen Therapieansätzen beschrieben. McGuire et al. erklärten 1975, dass der Östrogenrezeptorstatus eines Tumors direkt mit dem Ansprechen einer endokrinen Therapie korreliert [24]. Die prognostische und prädiktive Bedeutung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren für Mammakarzinompatientinnen wurde in den späten 70er und frühen 80er Jahren erforscht und in den klinischen Alltag integriert [25 - 27]. Damals konnte gezeigt werden, dass das rezidivfreie Überleben von Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen durch die Anwendung endokriner Therapien signifikant verlängert werden kann [28]. Mittlerweile gehört die Bestimmung des Rezeptorstatus von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, wie oben beschrieben, zur Basisdiagnostik beim Mammakarzinom [11, 19].

Neben den etablierten Markern gibt es weitere Rezeptoren, die von Mammakarzinomzellen exprimiert werden und deren prognostische Relevanz bisher nicht abschließend geklärt ist. Dazu gehören u.a. die hier untersuchten nukleären Rezeptoren Vitamin D3-Rezeptor (VDR), Retinoid-X-Rezeptoren alpha (RXR α) und Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor gamma (PPAR γ), die der Unterklasse 2 der nukleären Rezeptoren zugeordnet werden.

Die Unterklasse 2 der nukleären Rezeptoren wird von einer heterogenen Gruppe von Rezeptoren gebildet, welche im Zellkern als Heterodimere an ihr Zielgen gebunden vorliegen und dort repressiv wirken. Erst durch Ligandenbindung wird die

Transkription aktiviert. Sie weisen alle die gleiche Struktur auf [21]: verschiedene, durch bestimmte Faltstrukturen definierte Domänen ermöglichen unter anderem die Interaktion mit ihrem Liganden und der DNA, die Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren und ihre Genspezifität [29]. Alle nukleären Rezeptoren besitzen die gleiche DNA-Erkennungssequenz, das *hormone responsive element* (HRE), welche durch eine Zinkfinger-Struktur der DNA-Bindungsdomäne gebunden wird [30].

Zu dieser Klasse der intrazellulären Rezeptoren gehören Thyroidhormonrezeptoren (THR), der Vitamin D₃-Rezeptor (VDR), die Retinoidrezeptoren (RAR, RXR), Peroxisome Proliferator-activated Rezeptoren (PPAR), der Liver X Rezeptor (LXR) und der Farnesoid X Rezeptor (FXR) [31].

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten nukleären Rezeptoren VDR, PPAR γ und RXR α wirken als Transkriptionsfaktoren [29] und werden in gesundem und maligne verändertem Brustgewebe exprimiert [32–36]. Als nukleärer Rezeptor wird PPAR γ in aktiver Form ebenfalls nukleär exprimiert. Neben der nukleären Expression konnte jedoch auch eine zytoplasmatische Expression nachgewiesen werden. Die Translokation von nukleären zu zytoplasmatischen PPAR γ wird mit Inaktivierungsprozessen in Verbindung gebracht [37, 38]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die nukleäre Expression von VDR, PPAR γ und RXR α , sowie die zytoplasmatische Expression von PPAR γ auf ihre prognostische Relevanz hin untersucht.

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die nukleären Rezeptoren VDR, RXR α und PPAR γ , sowie die zytoplasmatische Expression des nukleären Rezeptors PPAR γ bei einer Mammakarzinom-Erkrankung prognostisch relevante Tumormerkmale darstellen. Die untersuchten Rezeptoren sind Wachstumsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie in Mammakarzinomgewebe exprimiert werden. Die nukleäre Expression von VDR, RXR α und PPAR γ , sowie die zytoplasmatische Expression von PPAR γ wurde an Mammakarzinompräparaten eines ausgewählten und unten näher beschriebenen Patientinnenkollektivs untersucht und mit bekannten Daten aus dem Bayerischen Tumorregister korreliert. Dazu wurde Brustkrebsgewebe von 306 Patientinnen, bei denen zwischen 1990 und 2002 ein Mammakarzinom diagnostiziert und operiert wurde, immunhistochemisch gefärbt und gemäß dem IRS (Immunreactive Score v. Remmele und Stegner) analysiert. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet.

Es wurde untersucht, inwiefern die Rezeptorexpression mit bekannten prognostischen und prädiktiven Faktoren korreliert. Dieses Vorgehen ermöglicht eine detaillierte Beschreibung VDR-, RXR α - und PPAR γ -positiver Mammakarzinome und liefert Hinweise auf ihre prognostische Relevanz.

Zusätzlich wurde die Abhängigkeit zwischen der Rezeptorexpression und den Überlebensdaten der Patientinnen untersucht.

Ausblick

Durch die Analyse verschiedener Tumormerkmale kann die Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen besser eingeschätzt und nebenwirkungsreiche Therapien teilweise vermieden werden. In den letzten Jahren wurden viele Fortschritte erzielt, die immer differenziertere und somit schonendere Therapien ermöglichten. Die Identifizierung weiterer prognostisch relevanter Tumormerkmale unterstützt diese Entwicklung. Hierbei sind von Mammakarzinomzellen exprimierte Rezeptoren von besonderem Interesse, da diese auch als Ausgangspunkt für neue Therapieansätze dienen können. Somit kann die Expression von VDR, PPAR γ und RXR α nicht nur als prognostischer, sondern gegebenenfalls auch als prädiktiver Faktor dienen.

4 Material

4.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger Superfrost Ultra Plus®	Menzel GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kochfeld Typ THL 2597	Rommelsbacher, Dinkelsbühl, Deutschland
Schnellkochtopf vitafit®	Fissler GmbH, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz, Diaplan	Leitz, Wetzlar, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.2 Verwendete Reagenzien

Name	Hersteller
Aqua destillata	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
Methanol	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
Xylol	J.T. Baker, Dventer, Holland
30%iges H ₂ O ₂	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Na-Citrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ -	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄ -	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Carboxylol	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
Peroxidase	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Power Block	BioGenex, Fremont, USA
DAB	Dako North America, Carinteria, USA

Saures Hämalaun nach Mayer	Apotheke, Klinikum Innenstadt der LMU München
Eukitt	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

4.3 Primärantikörper

Name	Hersteller	Bestellnummer	Lot.-Nummer
Anti VDR Klon 2F4 (mouse IgG2a)	Serotec	MCA3543Z	
Anti PPAR γ (rabbit polyclonal)	Abcam	ab27649-100	635684
Anti RXR α Klon K8508 (mouse IgG2a)	Perseus Proteomics	PP-K8508-10	A1F1

Tabelle 4: Primärantikörper

4.4 Detektionssysteme

Name	Hersteller
Vectastain Elite mouse-IgG-Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Vectastain Elite rabbit-IgG-Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

Tabelle 5: Detektionssysteme

5 Methoden

5.1 Formalinfixierung

Das frisch entnommene Tumorgewebe wird im ersten Schritt Formalin-fixiert. Die Formalinfixierung dient der Stabilisierung und Konservierung von dem Körper entnommenem Gewebe und wirkt der Autolyse und Schädigung des Gewebes entgegen.

Formalin ist eine wässrige Lösung und enthält 37 – 40% Formaldehyd. Unter Lichteinfluss wird Formaldehyd zum einen zu Methanol reduziert, zum anderen zu Ameisensäure oxidiert. Deswegen sollte Formalin dunkel und kühl gelagert werden.

Der saure pH-Wert der Lösung wird durch die Zugabe eines Puffers neutralisiert und stabilisiert.

Nach der Entfernung des Gewebes aus dem Körper muss das Gewebe innerhalb von 30 Minuten in Formalin eingelegt werden um dem autolytischen Prozess entgegenzuwirken. Die Fixationszeit richtet sich nach der Größe des entnommenen Gewebestücks. Große Gewebestücke werden zunächst 24 Stunden eingelegt. Es werden anschließend relevante Gewebeteile herausgeschnitten und für weitere 24 Stunden fixiert. Bei kleinen Gewebestücken ist eine 24-stündige Fixierung ausreichend.

Formalin reagiert vor allem mit Proteinen und führt zu Quervernetzungen. Es wirkt wenig denaturierend. Viele Reaktionen sind reversibel und können beispielsweise durch Hitzebehandlung wieder zurückgeführt werden.

5.2 Paraffineinbettung

Zur weiteren Bearbeitung des Gewebes erfolgt die Paraffineinbettung. Zunächst wird das Formalin mit Leitungswasser aus dem Gewebe herausgelöst. Bei der anschließenden Paraffineinbettung wird das im Gewebe befindliche Wasser komplett durch Paraffin ersetzt.

Da Paraffin hydrophob ist, wird das im Gewebe befindliche Wasser zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe durch Alkohol ersetzt. Um Alkoholverunreinigungen durch Methanol zu verhindern, wird das Gewebe während des so genannten *Clearings* mit Xylol durchtränkt und aufgehellt. Xylol ist mit Alkohol und Paraffin mischbar. Anschließend wird das Gewebe mit Paraffin durchtränkt. Bei der Einbettung wird das Präparat in Form eines Blocks gegossen. Zur Aushärtung wird der Block gekühlt.

In dieser konservierten Form kann das Gewebe jahrelang gelagert und bei Bedarf weiterverarbeitet werden.

Um eine immunhistochemische Untersuchung durchführen zu können, muss das Gewebe auf Objektträger aufgezogen werden. Dazu werden die Blöcke mit Hilfe des Schlittenmikrotoms in 2-3 μm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte werden anschließend aus dem Wasserbad heraus auf Objektträger aufgezogen. Durch die Beschichtung der Objektträger mit Adhäsiven haften die Schnitte besser.

Anschließend werden die Schnitte über Nacht bei 56 – 58 °C im Brutschrank getrocknet. Die getrockneten Gewebeschnitte können dann für die Immunhistochemie verwendet werden.

5.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiges Verfahren, bei dem zelluläre Strukturen durch Kopplung an einen Farbstoff sichtbar gemacht werden. Bei diesem Verfahren macht man sich die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung zu Nutze.

Das Ziel der hier durchgeführten Immunhistochemie ist es, die in maligne verändertem Brustgewebe exprimierten Rezeptoren VDR, PPAR γ und RxR α nachzuweisen.

Das der Färbung zugrunde liegende Protokoll wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jeschke erarbeitet und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Das Färbeprotokoll wurde bereits für verschiedene Arbeiten, unter anderem die Studien von Ditsch et al. [39], [40], [41] verwendet.

5.3.1 Entparaffinierung

Im ersten Schritt wird das zum Fixieren verwendete Paraffin aus den Gewebeschnitten herausgewaschen. Dazu werden die Schnitte 20 Minuten in Xylol eingelegt.

5.3.2 Blockierung der endogenen Peroxidase

Anschließend werden die Schnitte für 20 Minuten mit einer dreiprozentigen Wasserstoffperoxidlösung in Methanol behandelt. Dies führt zu einer kompetitiven Hemmung der endogenen Peroxidasen durch Substratüberschuss. So wird verhindert, dass die endogene Peroxidase während der Substrat-Chromogen-Färbung unspezifisch Farbstoff bindet und es zu einer Hintergrundfärbung kommt.

5.3.3 Demaskierung

Nachdem die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe auf Wasserbasis gebracht wurden, wird eine Hitzebehandlung im Schnellkochtopf durchgeführt. Die Schnitte werden in der kochenden Pufferlösung für fünf Minuten erhitzt und anschließend im Wasserbad abgekühlt. Durch die Hitzebehandlung in saurer Citratpuffer-Lösung (pH

6,0) kommt es zur Antigendemaskierung. Die Proteinvernetzungen, die während der Formalinfixierung entstanden sind, werden aufgebrochen. Die Epitope werden freigelegt und sind so für die Antikörperbindung besser zugänglich. Die Schnitte werden zur Neutralisierung zweimal zwei Minuten in PBS-Puffer (pH 7,2) gewaschen. Anschließend werden die Gewebeschnitte für drei Minuten mit dem Blockiermedium Power Block behandelt.

5.3.4 Immunhistochemische Färbung: Indirekte Methode

Bei der hier angewandten indirekten Methode (auch „Zwei-Schritt-Methode“) wird das Gewebe zunächst mit einem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert.

Primärantikörper

Antikörper werden aus Versuchstieren (häufig Maus, Ratte, Kaninchen oder Ziege) gewonnen und entstehen während einer induzierten Entzündung mit einem Antigen. Das verwendete Antigen trägt spezifische Epitope, die das Target der Immunhistologie darstellen. Man unterscheidet polyklonale und monoklonale Primärantikörper. Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wird das Serum der Versuchstiere nach Induktion der Entzündungsreaktion gewonnen. Das Serum mehrerer Versuchstiere einer Spezies wird gepoolt und anschließend gereinigt. Die gewonnenen Antikörper sind polyklonal, da sie von verschiedenen, während der Entzündungsreaktion aktivierten Plasmazellen produziert werden.

Monoklonale Antikörper gewinnt man aus einer isolierten Plasmazelle. Diese wird aus dem Versuchstier isoliert und in Zellkultur gebracht. Durch Fusion mit einer Myelomzelle wird eine Hybridzelle hergestellt, die in Zellkultur jahrelang überlebt und nur einen spezifischen, also monoklonalen, Antikörper produziert. Diese Methode ist aufwändiger und teurer, garantiert aber eine reproduzierbare, hohe Qualität.

Die in der Immunhistochemie eingesetzten Antikörper sind meist IgG-Antikörper. Sie sind Y-förmig und bestehen aus einem konstanten Fc-Fragment, das den Fuß des Y bildet, und zwei variablen Fab-Fragmenten, die die Arme des Y darstellen. Das Fc-Fragment ist für eine Tierspezies spezifisch. Das Fab-Fragment ist für ein Epitop des Antigens spezifisch.

In einem zweiten Schritt wird ein konjugierter Sekundärantikörper hinzugegeben.

Sekundärantikörper

Bei der Herstellung von Sekundärantikörpern macht man sich die Eigenschaften des Primärantikörpers zu Nutze. Wie oben beschrieben, besteht der Primärantikörper aus zwei variablen Fab-Fragmenten und einem konstanten Fc-Fragment, das spezifisch für eine Tierspezies ist. Dieses konstante Fc-Fragment fungiert in einer anderen Tierspezies als Antigen und induziert dort eine Entzündungsreaktion. Es entstehen Sekundärantikörper, die sich spezifisch gegen bestimmte Primärantikörper richten. Das restliche Prozedere entspricht dem oben beschriebenen Ablauf für die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern.

Bei den hier verwendeten Sekundärantikörpern handelt es sich um Pferd-anti-Maus-Antikörper für den Nachweis von VDR und RXR α . Für den Nachweis von PPAR γ wurden Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet.

Durchführung

Die vorbereiteten Gewebeschnitte werden je Schnitt mit 100 μ l Antikörperserum bedeckt und je nach Rezeptor eine Stunde bei Raumtemperatur (VDR) oder sechzehn Stunden bei 4 °C (PPAR γ , RXR α) inkubiert. In dieser Zeit findet die Bindung zwischen dem im Gewebe exprimierten Epitop und dem Antikörper statt.

Nach der vorgegebenen Zeit werden die Schnitte zweimal zwei Minuten in PBS gewaschen.

Anschließend wird der konjugierte Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten. Mehrere Sekundärantikörper binden an das Fc-Fragment eines Primärantikörpers. Dadurch kommt es zur Signalverstärkung (s. Abbildung 1). Nach 30 Minuten werden die Schnitte zweimal zwei Minuten in PBS gewaschen.

5.3.5 Detektion

ABC-Methode

Bei der hier angewandten ABC-Methode handelt es sich um eine Zwei-Schritt-Methode, bei der biotinylierte Sekundärantikörper und ABC-Komplexe (Avidin-Biotin-Complex) eingesetzt werden. Der ABC-Komplex stellt eine makromolekulare Struktur aus Avidin, Biotin und Peroxidase dar. Die Affinität zwischen Avidin und Biotin ist sehr hoch. Avidin, ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, besitzt vier Untereinheiten, die je ein Molekül Biotin binden können. Biotin ist ein Coenzym, das

im Körper hilft, Carboxylgruppen zu transferieren. Der ABC-Komplex kann durch die Biotinylierung der Sekundärantikörper an diese binden. Durch die Struktur von Biotin binden pro Antikörper drei Avidin-Moleküle. So kommt es zur Signalverstärkung (s. Abbildung 2).

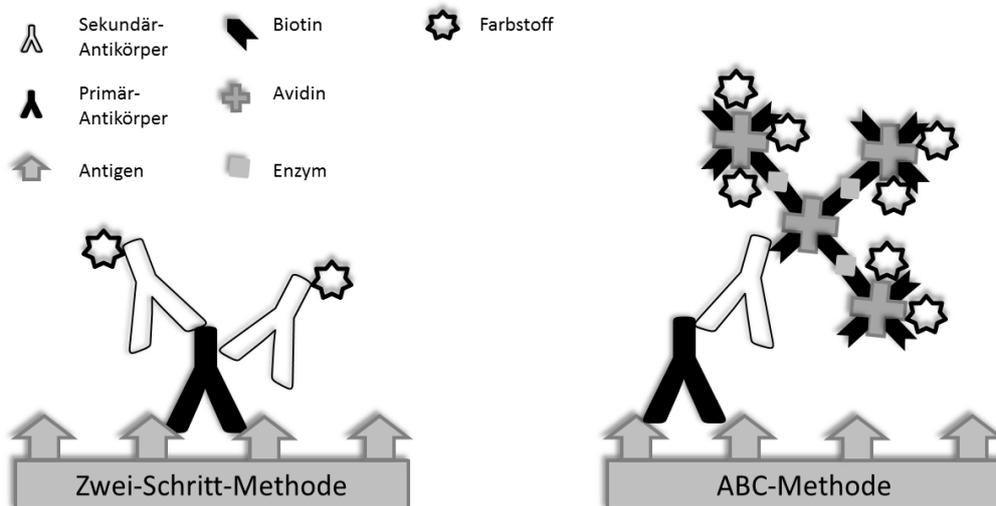


Abbildung 1: Zwei-Schritt-Methode mit Primär- und Sekundär-Antikörper

Abbildung 2: ABC-Methode mit Avidin-Biotin-Komplex zur Signalverstärkung

Die Schnitte werden für 30 Minuten mit dem ABC-Komplex inkubiert. Anschließend werden sie zweimal zwei Minuten in PBS gewaschen.

Peroxidase-Darstellung mit Diaminobenzidin (DAB)

Um die markierten Strukturen sichtbar zu machen, werden die Schnitte für 30 Sekunden (VDR), eine Minute (RXR α) oder zwei Minuten (PPAR γ) mit dem Chromogen 3,3 Diaminobenzidin (DAB) bedeckt. DAB reagiert mit Wasserstoffperoxid und wird in eine unlösliche, braune Substanz umgesetzt. Als Katalysator wirkt die im ABC-Komplex enthaltene Peroxidase.

Nachdem die Schnitte zweimal zwei Minuten in Aqua destillata gewaschen wurden, werden die Hintergrundstrukturen mit Hämalaun angefärbt.

Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer

Hämalaune eignen sich zur Kernfärbung, da sie durch ihre positive Ladung vornehmlich an negativ geladenes Kernchromatin binden.

Nach zwei Minuten in der sauren rot-braunen Hämalaun-Lösung werden die Schnitte fünf Minuten mit Leitungswasser gespült. Hierbei wird der pH-Wert neutralisiert und es kommt zur typischen Blaufärbung der Kerne und zu einer leichten Blaufärbung des Gewebes.

Die braun angefärbten Strukturen, die das detektierte Epitop enthalten, setzen sich deutlich von der blauen Gegenfärbung ab.

5.3.6 Dehydrierung und Eindecken

Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Gewebeschnitte entwässert und durch Xylol aufgehellt. Anschließend werden die Schnitte mit dem hydrophoben Einschlussmittel Eukitt und einem Deckglas bedeckt.

In diesem Zustand sind die Gewebeschnitte jahrelang haltbar.

5.3.7 Blockierung

In Geweben wie Bindegewebe und Fettgewebe kommen häufig hydrophobe Gewebeproteine vor. Da Antikörper häufig ebenfalls hydrophob sind, würde es zu einer unspezifischen Bindung und dadurch zu einer Hintergrundfärbung kommen. Durch die Behandlung mit einem Blockiermedium wird der pH optimiert. Die hydrophoben Ladungen an Membranen und Fettgewebe werden gesättigt und dadurch die hydrophobe Wechselwirkung verhindert. So wird erreicht, dass der Primärantikörper spezifisch an sein Target-Protein binden kann.

5.4 Auswertung

Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte mittels Lichtmikroskop. In einer kleinen Vergrößerung (10x) wurde das maligne veränderte Gewebe aufgesucht und dann in einer größeren Vergrößerung (25x) bewertet.

Die Bewertung erfolgte mittels IRS (Immunreactive Score v. Remmele und Stegner). Diesem Score liegt das Produkt zweier Parameter zugrunde. Zunächst wird die Farbintensität der positiven Zellkerne bewertet. Die Intensität kann mit den Zahlenwerten 0 – 3 bewertet werden, wobei 0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = mäßige Färbung, 3 = starke Färbung entspricht. In einem zweiten Schritt wird die Anzahl der positiven Zellkerne in Prozent geschätzt. Hierbei können Werte von 0 – 4 vergeben werden. 0 = keine positiven Zellkerne, 1 = < 10% positive

Zellkerne, 2 = 10 – 50% positive Zellkerne, 3 = 50 – 80% positive Zellkerne, 4 = > 80% positive Zellkerne.

Der IRS kann daher minimal 0 und maximal 12 betragen. Ein Score von 0 entspricht „keiner Expression“, 1 – 3 entspricht einer „geringen Expression“, 4 – 8 einer „mäßigen Expression“ und 8 – 12 einer „starken Expression“.

5.4.1 Zytoplasmatische Expression von PPAR γ

Wie bei nukleären Rezeptoren zu erwarten und in der Literatur bereits beschrieben, wurde beim Nachweis von VDR, PPAR γ und RXR α eine nukleäre Expression der Rezeptoren beobachtet [32, 35, 42], welche Grundlage der mikroskopischen Auswertung darstellte.

Neben der nukleären Expression der Rezeptoren wird in der Literatur auch eine zytoplasmatische Expression nukleärer Rezeptoren beschrieben, deren Wertigkeit nicht abschließend geklärt ist. Im Fall von PPAR γ gibt es verschiedene Arbeiten, die eine Verschiebung von nukleärer zu zytoplasmatischer Expression beschreiben [37, 43–45]. In aktiver Form wirkt PPAR γ als Transkriptionsfaktor, der nukleär lokalisiert vorliegt [46, 47]. Verschiedene Mechanismen können zu einem Transport vom Kern in das Zytoplasma führen [38, 48]. Hierbei geht die Translokation des Rezeptors mit einer Inaktivierung und somit Downregulation einher, deren Bedeutung bisher weitgehend unbekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zusätzlich zur nukleären auch die zytoplasmatische Expression von PPAR γ berücksichtigt und die Auswertung der zytoplasmatischen PPAR γ -Färbung mittels IRS in die hier präsentierten Ergebnisse aufgenommen. Im Folgenden wird die nukleäre PPAR γ (nuclear PPAR γ = n-PPAR γ) von der zytoplasmatischen PPAR γ (cytoplasmatic PPAR γ = c-PPAR γ) Expression unterschieden.

5.5 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Einteilung in keine, geringe, mäßige und starke Expression eine weitere Unterteilung der Präparate in Rezeptor-negative und Rezeptor-positive Präparate unternommen. Angelehnt an das bei den Hormonrezeptoren (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor) etablierte Verfahren, wurde hierzu ein Score nach dem IRS

definiert, der als Trennwert zwischen den Rezeptor-negativen und den Rezeptor-positiven Präparaten fungiert. Um diesen Score zu finden wurden alle Präparate nach dem IRS bewertet und der Median aus den erhaltenen Scores errechnet. Der Median der IRS-Scores der auf VDR-Expression hin untersuchten und bewerteten Präparate lag bei 2, der für RXR α bei 3, der für nukleär exprimierte n-PPAR γ bei 0 und der für nukleär exprimierte n-PPAR γ bei 3.

Alle Präparate, die diesen oder einen geringeren Score erreichten, wurden von uns als Rezeptor-negativ definiert. Präparate, die einen höheren Score erreichten, als Rezeptor-positiv.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (Version 22.0; SPSS Inc., Chicago, USA). Für die Analyse zweier unabhängiger Stichproben wurde der Mann-Whitney-Test, bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Korrelationsanalysen wurden mittels Spearman Korrelationstest durchgeführt. Zur Analyse des Überlebens in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven erstellt.

Als signifikant wurde ein p-Wert ≤ 0.5 definiert. P-Werte $\leq 0,01$ wurden als hochsignifikant definiert.

6 Ergebnisse

6.1 Häufigkeiten

6.1.1 Patientinnenkollektiv

Das untersuchte Patientinnenkollektiv beinhaltet 320 Patientinnen der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, die in den Jahren 1990 bis 2002 mit Mammakarzinom erstdiagnostiziert und operiert wurden. In die Erhebung aufgenommen wurden ausschließlich Patientinnen mit anamnestisch sporadischem Mammakarzinom.

Von 306 (95,6 %) der 320 Patientinnen konnte durch unsere Untersuchung ein Follow-Up erhoben werden.

Die wiedergegebenen Patientendaten und Tumormerkmale der untersuchten Gewebe stammen aus dem Tumorregister Bayerns sowie aus der direkten Patientenbefragung und wurden mittels SPSS ausgewertet. Diese Auswertung diente als Basis für die weitere statistische Analyse.

Aufgrund der Übersichtlichkeit werden im Folgenden nur statistisch signifikante oder für das Verständnis wichtige Ergebnisse und deren Illustrationen in Abbildungen dargestellt.

Alter bei Erstdiagnose und zum Todeszeitpunkt

Das Durchschnittsalter der Patientinnen bei Erstdiagnose lag bei 60 Jahren, wobei die Erstdiagnose der jüngsten Patientin im Alter von 26 Jahren und bei der ältesten Patientin im Alter von 95 Jahren gestellt wurde.

98 (32,0%) der 306 Patientinnen waren zum Zeitpunkt des letzten Follow-Up (27.02.2013) verstorben. Das durchschnittliche Alter zum Todeszeitpunkt lag bei 69 Jahren. Die jüngste verstorbene Patientin war zum Todeszeitpunkt 38 Jahre alt, die älteste Patientin verstarb im Alter von 92 Jahren.

Überleben

In Abbildung 3 ist das Überleben in Jahren abgebildet. Zum Zeitpunkt 0 waren 100 % des Patientinnenkollektivs am Leben (1,0). Der Beobachtungszeitraum betrug 12,5 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 80 %.

Gesamtzahl	306
Anzahl der Ereignisse (Tod)	98
Zensiert (n)	208
Zensiert (%)	68,0

Tabelle 6: Sterbefälle im Gesamtkollektiv

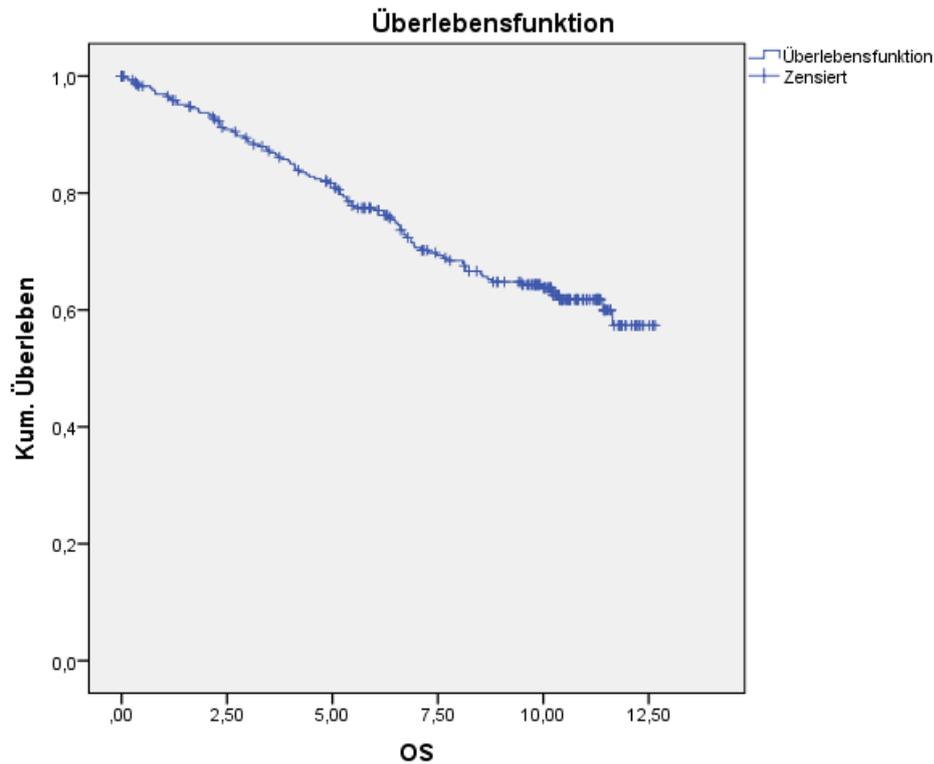


Abbildung 3: Überleben des Gesamtkollektivs (n = 320) in Jahren im untersuchten Zeitraum von 12,5 Jahren;
Kum. Überleben = kumulatives Überleben, OS = Overall Survival (Gesamtüberleben)

Tumorfreiheit

Bei 169 (81,25 %) der 208 überlebenden Patientinnen bestand zum Zeitpunkt des letzten Follow-Up Tumorfreiheit, während 39 Patientinnen zu diesem Zeitpunkt unter einer Progression der Erkrankung litten.

6.1.2 Klassifizierung des Tumors

Um die Gewebeproben genauer zu klassifizieren, wurden klinisch relevante Tumormerkmale statistisch ausgewertet. Die Histologie, Grading, Tumorgöße und

Lymphknotenstatus sind in Tabelle 7 aufgeführt, während Tumormerkmale aus der Follow-Up Erhebung in Tabelle 8 abgebildet sind.

Histo-pathologische Tumormerkmale		Häufigkeit (n)	Prozent (%)
Histologie	NST	248	81,0
	invasiv lobulär	42	13,7
	invasiv medullär	10	3,3
	invasiv muzinös	4	1,3
	DCIS	2	,7
Grading	1	15	4,9
	2	104	34,0
	3	47	15,4
	unbekannt	140	45,8
Tumorgroße	pT1	197	64,4
	pT2-pT4	109	35,6
Axilläre LK	pN0	166	54,2
	≥pN1	133	43,5
	unbekannt	7	2,3

Tabelle 7: Histo-pathologische Tumormerkmale nach Häufigkeiten

Tumormerkmale (Follow-Up)		Häufigkeit (n)	Prozent (%)
Fernmetastasen	nein	239	78,1
	ja	67	21,9
Lokalrezidiv	nein	263	85,9
	ja	43	14,1
Kontralaterales Mamma-Ca	nein	299	97,7
	ja	7	2,3

Tabelle 8: Im Follow-Up erhobene Tumormerkmale nach Häufigkeiten

6.1.3 Tumorhistologie

Der histologische Tumor-Typ wurde nach aktueller Nomenklatur in NST (= Adenocarcinoma of no special type), invasiv lobuläres Karzinom, invasiv medulläres Karzinom, invasiv muzinöses Karzinom und DCIS (= duktales Carcinoma in situ) eingeteilt.

Wie in Abbildung 4 erkennbar, waren NST-Tumoren mit 81 % (n = 248) am häufigsten vertreten. Bei 13,7 % (n = 42) der untersuchten Fälle handelte es sich um invasiv lobuläre Karzinome. Invasiv medulläre Karzinome traten mit einer Häufigkeit von 3,3 % (n = 10) und invasiv muzinöse Karzinome mit einer Häufigkeit von 1,3 % (n = 4) auf. In 0,7% (n = 2) wurde ein DCIS diagnostiziert (s. Tabelle 7, Abbildung 4).

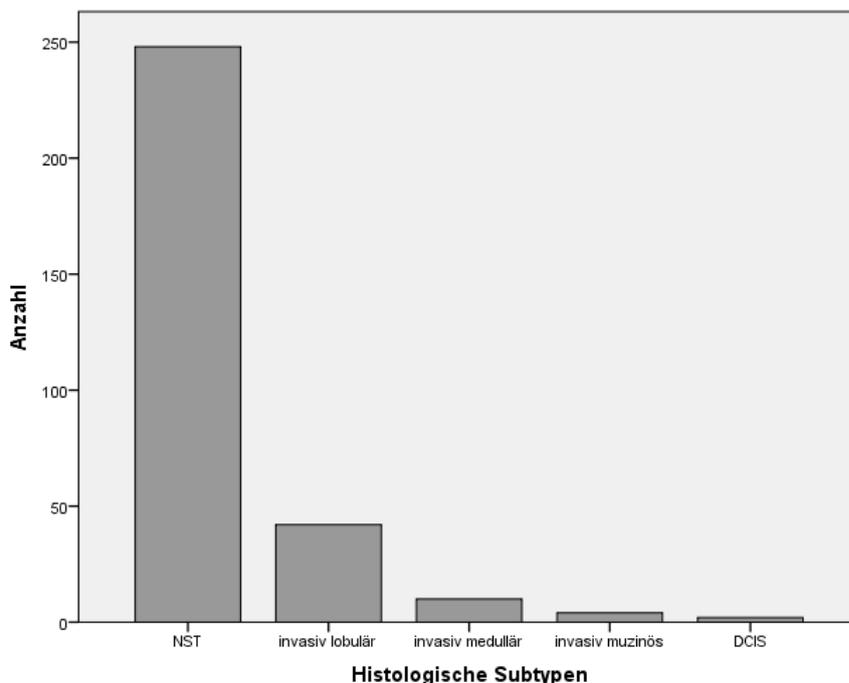


Abbildung 4: Häufigkeiten der verschiedenen histologischen Subtypen eingeteilt nach NST, invasiv lobulär, invasiv medullär, invasiv muzinös und DCIS

6.1.4 Prognostische Faktoren

Prognostische Faktoren sind Tumormerkmale, deren Analyse eine Aussage über den Verlauf der Tumorerkrankung erlauben. Zu den etablierten und hier untersuchten Prognosefaktoren gehören Grading, Tumorgöße, axillärer Lymphknotenbefall, Vorliegen von Metastasen und Rezidiven, sowie die Expression von Östrogen-, Progesteron und Her2neu-Rezeptoren (hierzu siehe auch „Prädiktive Faktoren“).

Grading

Der Entdifferenzierungsgrad der untersuchten Gewebeschnitte der 306 Mammakarzinom-Patientinnen wurde mithilfe des Nottingham Grading Systems, modifiziert nach Elston und Ellis, bestimmt [49, 50]:

Tubuläre Differenzierung	Zellkernpolymorphie	Mitoseanzahl*	Punkte
gut (meist reife Tubuli) > 75%	gering (überwiegend isomorphe Kerne)	0 – 9 Mitosen	1
mäßig (unreife Tubuli) 10-75%	mäßig (mittelgradige Form- und Größenvariation)	10 – 19 Mitosen	2
gering oder fehlend < 10%	stark (hochgradige Form- und Größenvariation)	≥ 20 Mitosen	3

Tabelle 9: Nottingham Grading Systems, modifiziert nach Elston und Ellis

*Anzahl der Mitosen in 10 HPF bei 400facher Vergrößerung

Bewertung:

3-5 Punkte = gut differenziertes Karzinom, G1

6-7 Punkte = mäßig differenziertes Karzinom, G2

8-9 Punkte = wenig differenziertes Karzinom, G3

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, lag in 4,9 % (n = 15) der Fälle ein gut differenziertes Karzinom vor (Grading 1). 34 % (n = 104) der Karzinome waren mäßig differenziert (Grading 2). Schlecht differenzierte Karzinome wurden in 15,4 % (n = 47) der Fälle diagnostiziert (Grading 3). In 45,8 % (n = 140) der Fällen war das Grading unbekannt (s. Tabelle 7).

pTNM

Die Stadieneinteilung erfolgte nach der pTNM (tumor-node-metastasis) Klassifikation, welche auf dem postoperativen histopathologischen Ergebnis (p = pathologische Klassifikation) der Gewebeprobe beruht. Hierbei werden Tumorgröße, regionärer Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung beurteilt.

Histopathologische Klassifikation [51–53]:

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (zur Untersuchung nicht entnommen oder früher entfernt)
pN0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 1–3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen Metastasen, die bei der Sentinellymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch auffällig waren
pN2	Metastasen in 4–9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch auffälligen ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Fehlen axillärer Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten; oder in klinisch auffälligen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von

	mindestens einem positiven axillären Lymphknoten; oder in mehr als 3 axillären Lymphknoten mit klinisch negativen, mikroskopischen Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna; oder in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pM	Fernmetastasen
pMX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastase

Tabelle 10: Stadieneinteilung nach pTNM-Klassifikation

Tumorgröße

Die Tumorgröße wurde entsprechend der pTNM-Klassifikation in vier Stadien eingeteilt (pT 1-4). Für die statistische Analyse wurde ein binäres System angewandt, wozu die Tumorgröße in zwei Gruppen, „kleine“ und „große“ Tumore, eingeteilt wurde. Das pT1 Stadium wurde der Gruppe der „kleinen Tumore“ zugeteilt, während die Stadien pT2 - pT4 der Gruppe „große Tumore“ (entsprechend aller Tumore ≥ 2 cm) zugeteilt wurden.

Die quantitative Auswertung ergab, dass in 64,4 % (n = 197) der Fälle ein „kleiner Tumor“ der Tumorgröße pT1 vorlag und in 35,6 % der Fälle ein „großer Tumor“ der Tumorgröße pT2 – pT4 (s. Tabelle 7).

Axilläre Lymphknotenmetastasen

Bei 133 (43,5 %) der 306 Patientinnen lagen bei Diagnosestellung axilläre Lymphknotenmetastasen vor. 166 (54,2 %) der Patientinnen präsentierten sich ohne Lymphknotenmetastasen. Bei 7 (2,3 %) der Patientinnen war der LK-Status unbekannt (s. Tabelle 8).

Fernmetastasen

Fernmetastasen wurden bei 67 der 306 Patientinnen (21,9 %) nachgewiesen. 239 von 306 Patientinnen (78,1 %) blieben bis zum Zeitpunkt des letzten Follow-Up Fernmetastasen-frei (s. Tabelle 8). Das mittlere Alter bei Erstdiagnose einer

Fernmetastase lag bei 62 Jahren. Die jüngste Patientin, bei der eine Fernmetastase nachgewiesen wurde, war 37 Jahre alt, die älteste war 85 Jahre alt. Bei 23 der 67 Patientinnen (34,3 %) mit Fernmetastasen wurden Metastasen in multiplen Organen nachgewiesen. Wie in Tabelle 11 zu sehen, waren die häufigsten unilokulären Metastasen (18 von 67; 26,9 %) ossäre Metastasen. Auch isoliert hepatische Metastasen (8 von 67; 11,9 %) und isoliert pulmonale Metastasen (7 von 67; 10,4 %) kamen häufig vor. 11 Patientinnen (16,4 %) hatten isolierte Metastasen in anderen Organen.

Art der Metastasen	Häufigkeit (n)	Prozent (%)
Nur ossäre Metastase(n)	18	26,9
Nur hepatische Metastase(n)	8	11,9
Nur pulmonale Metastase(n)	7	10,4
andere Metastase(n), unilokulär	11	16,4
Metastasen in > 1 Organ/Gewebe	23	34,3
Gesamt	67	100,0

Tabelle 11: Häufigkeit und Lokalisation von Fernmetastasen

Rezidiv

Als Rezidiv wurden das Auftreten von Lokalrezidiven sowie das Auftreten eines Rezidivs in Form einer Metastase zusammengefasst. Insgesamt 94 (30,7 %) der 306 Patientinnen erlitten während der untersuchten Zeitdauer ein Rezidiv. Dabei handelte es sich in 43 (13,4 %) Fällen um ein Lokalrezidiv. 212 (69,3 %) Patientinnen blieben bis zum letzten Follow-Up rezidivfrei (s. Tabelle 8). Das mittlere Alter bei Diagnose des Lokalrezidivs betrug 62 Jahre, die jüngste Patientin war bei Diagnose des Lokalrezidivs 39 Jahre, die älteste Patientin 85 Jahre alt.

Kontralaterales Mammakarzinom

7 (2,3 %) Patientinnen entwickelten ein kontralaterales Mammakarzinom (s. Tabelle 8). Das mittlere Alter bei Erkrankung lag bei 59 Jahren. Die jüngste Patientin war bei Diagnose des kontralateralen Mammakarzinoms 39 Jahre alt, die älteste Patientin 84 Jahre alt.

6.1.5 Prädiktive Faktoren

Prädiktive Faktoren sind Tumormerkmale, die für eine systemische Therapie zugänglich sind. Bei unserem Patientinnenkollektiv wurden der Hormonrezeptorstatus und die Expression von Her2neu untersucht.

Hormonrezeptorstatus

Die Expression von Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Anhand der Auswertung wurden die Gewebeproben in Rezeptor-positive und Rezeptor-negative Tumore eingeteilt.

Östrogenrezeptoren

Tabelle 12 zeigt, dass bei 65,7 % (n = 201) der 306 Mammakarzinompräparate ein positiver Östrogenrezeptorstatus nachgewiesen wurde. 14,7 % (n = 45) der Fälle wurden als Östrogenrezeptor-negativ eingeteilt. Bei den übrigen 19,6 % (n = 60) ist der Östrogenrezeptorstatus unbekannt.

Progesteronrezeptoren

Die Expression der Progesteronrezeptoren konnte bei 50,3 % (n = 154) der Präparate nachgewiesen werden. Aus Tabelle 12 ist ersichtlich, dass 30,1 % (n = 92) der Mammakarzinom-Präparate keine Progesteron-Rezeptoren exprimierten. Bei 19,6 % (n = 60) der Fälle war der Progesteronrezeptorstatus unbekannt (s. Tabelle 12).

Expression von Her2neu

Wie in Tabelle 12 abgebildet, war der Her2neu-Status bei 61,7 % (n = 189) der 306 Fälle bekannt. In 31 % (n = 95) der Fälle lag ein positiver Her2neu-Status, in 31 % (n = 94) der Fälle ein negativer Her2neu-Status vor. Da die Bestimmung des Her2neu-Rezeptors erst ab 2000 zur Routine-Diagnostik gehörte, war bei 38,2 % (n = 117) die Her2neu-Expression unbekannt.

Rezeptor	Status	Anzahl (n)	Prozent (%)
Östrogenrezeptor (ER)	negativ	45	14,7
	positiv	201	65,7
	unbekannt	60	19,6
Progesteronrezeptor (PR)	negativ	92	30,1

	positiv	154	50,3
	unbekannt	60	19,6
Her2neu	negativ	94	30,7
	positiv	95	31,0
	unbekannt	117	38,2

Tabelle 12: Häufigkeiten von Hormonrezeptorstatus und Her2neu-Status

6.1.6 Expression nukleärer Rezeptoren

Im Folgenden wird die Expression der nukleären Rezeptoren Vitamin D-Rezeptor (VDR), Retinoid-X-Rezeptor alpha (RXR α) und Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma (PPAR γ) beschrieben.

Beim Nachweis der VDR-Expression konnten 88,9 % der 306 (n = 272) Präparate mikroskopisch ausgewertet werden, beim Nachweis der RXR α -Expression konnten 86,6 % (n = 266) ausgewertet werden. 87,9 % (n = 269) der Präparate wurden beim mikroskopischen Nachweis von n-PPAR γ ausgewertet und 88,5 % (n = 271) beim Nachweis von c-PPAR γ .

Rezeptor	VDR	RXR α	n-PPAR γ	c-PPAR γ
ausgewertet	88,9 % (272)	86,8 % (266)	87,9 % (269)	88,5 % (271)

Tabelle 13: Anzahl der ausgewerteten Präparate pro Färbung

VDR

Wie Tabelle 14 zeigt, war bei 22,1 % (n = 60) keine Expression von VDR nachweisbar (IRS 0). Ein Score von 1 wurde in 18,4 % (n = 50) bestimmt. IRS 2 wurde in 13,2 % (n = 36) der Präparate bestimmt. Der ermittelte Median entsprach einem IRS von 2 und wurde als Trennwert (s. Methoden, statistische Analyse) verwendet. Mit IRS 3 wurden 14,7 % (n = 40) der Präparate bewertet. Die restlichen Scores kommen in abnehmender Häufigkeit vor. IRS 3 mit 14,7 % (n = 40), IRS 4 mit 14,0 % (n = 38), IRS 6 mit 8,1 % (n = 22), IRS 8 mit 6,6 % (n = 18), IRS 9 mit 1,8 % (n = 5) und IRS 12 mit 1,1 % (n = 3). Alle Präparate, für die ein IRS \leq 2 bestimmt wurde, definierten wir als Rezeptor-negativ und die Präparate, für die ein IRS $>$ 2 bestimmt wurde als

Rezeptor-positiv. Dementsprechend wurden 53,7 % (n = 146) der Präparate als VDR-negativ und 46,3 % (n = 126) der Präparate als VDR-positiv definiert.

RXR α

Bei der mikroskopischen Untersuchung der zum Nachweis von RXR α gefärbten Präparate wurde am häufigsten ein IRS von 4 bestimmt. In Tabelle 14 ist zu sehen, dass 30,6 % (n = 81) der Präparate eine Rezeptorexpression entsprechend einem Score von IRS 4 aufweisen. 17,3 % (n = 45) der Präparate exprimierten RXR α häufiger. Bei 1,5 % (n = 4) wurde ein IRS Score von 6 bestimmt und der maximale IRS von 8 bei 15,8 % (n = 42). Bei 52,1 % (n = 138) der untersuchten Präparate zeigte die Quantifizierung der Rezeptorexpression einen IRS \leq 3. IRS 3 wurde bei 17,0 % (n = 45) der Präparate bestimmt, IRS 2 bei 13,2 % (n = 35), IRS 1 bei 12,8 % (n = 34). Keine Rezeptorexpression zeigten 9,1 % (n = 24) der Präparate. Die Verteilung ist in Abbildung 5 abgebildet. Der Median lag bei IRS 3, sodass die Präparate mit einer Rezeptorexpression \leq 3 für die weitere statistische Analyse als Rezeptor-negativ (52,1 %, n = 138) definiert wurden, solche mit einer Rezeptorexpression $>$ 3 als Rezeptor-positiv (47,9 %, n = 128).

PPAR γ

Abbildung 5 zeigt, dass ein Großteil (81,8 %, n = 220) der auf die nukleäre Expression von n-PPAR γ untersuchten Präparate keine Rezeptoren exprimiert, mit einem IRS von 0 bewertet und damit als Rezeptor-negativ definiert wurde. Der als Trennwert fungierende Median lag bei IRS 0. 11,5 % (n = 31) der Präparate zeigten eine geringe Expression (IRS 1), wenige Präparate zeigten eine Expression, die mit IRS 2 (5,6 %, n = 15) oder IRS 3 (1,1 %, n = 3) bewertet wurde. Die Zahlen sind in Tabelle 14 abgebildet.

Die zytoplasmatische Expression von c-PPAR γ war ausgeprägter. Hier lag der Median (Trennwert) bei IRS 3. Die Präparate, die eine geringe Rezeptorexpression (IRS \leq 3) zeigten, wurden im Folgenden als Rezeptor-negativ definiert. In dieser Gruppe wurde die Rezeptorexpression am häufigsten mit IRS 3 bewertet (17,7 %, n = 48). Die anderen Präparate wurden in 9,6 % (n = 26) der Fälle mit IRS 2, in 10,7 % (n = 29) mit IRS 1 und in 12,5 % (n = 34) mit IRS 0 bewertet. 49,4 % (n = 134) der Präparate wurden als Rezeptor-positiv definiert. 25,8 % (n = 70) der als Rezeptor-positiv definierten Präparate entsprachen einem IRS von 4. Wie in Abbildung 5 zu

sehen ist, kam in abnehmender Häufigkeit eine stärker ausgeprägte Expression vor. Ein IRS 6 wurde in 11,1 % (n = 30) bestimmt, IRS 8 in 10,7 % (n = 29), IRS 9 in 0,7 % (n = 2) und IRS 12 in 1,1 % (n = 3) der Präparate.

Rezeptor	IRS 0	IRS 1	IRS 2	IRS 3	IRS 4	IRS 6	IRS 8	IRS 9	IRS 12	Median
VDR (n)	60	50	36	40	38	22	18	5	3	2
VDR (%)	22,1	18,4	13,2	14,7	14,0	8,1	6,6	1,8	1,1	
RXRα (n)	24	34	35	45	81	4	42	0	0	3
RXRα (%)	9,1	12,8	13,2	17,0	30,6	1,5	15,8	0	0	
n-PPARγ (n)	220	31	15	3	0	0	0	0	0	0
n-PPARγ (%)	81,8	11,5	5,6	1,1	0	0	0	0	0	
c-PPARγ (n)	34	29	26	48	70	30	29	2	3	3
c-PPARγ (%)	12,5	10,7	9,6	17,7	25,8	11,1	10,7	0,7	1,1	

Tabelle 14: Häufigkeit der Rezeptorexpression nach IRS für VDR, RXRα, n-PPARγ und c-PPARγ

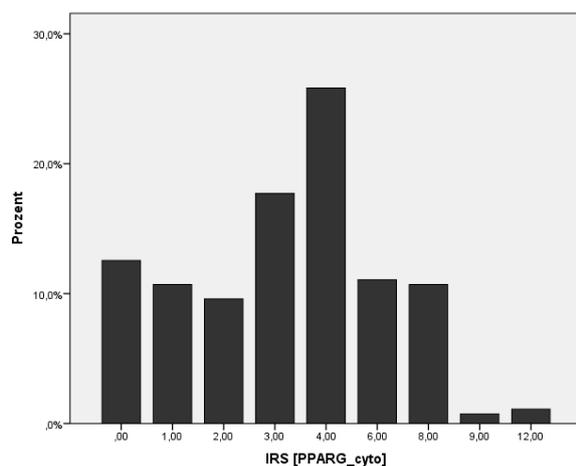
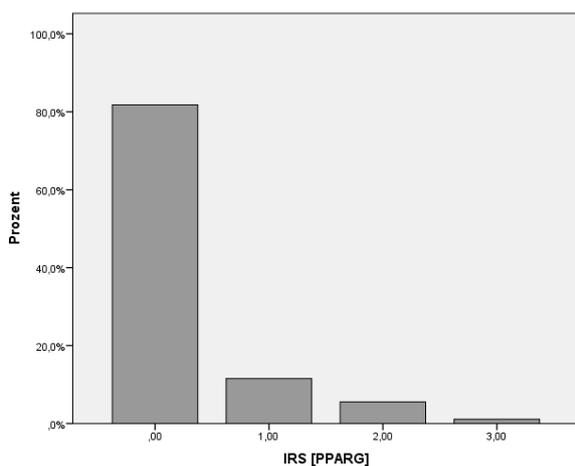
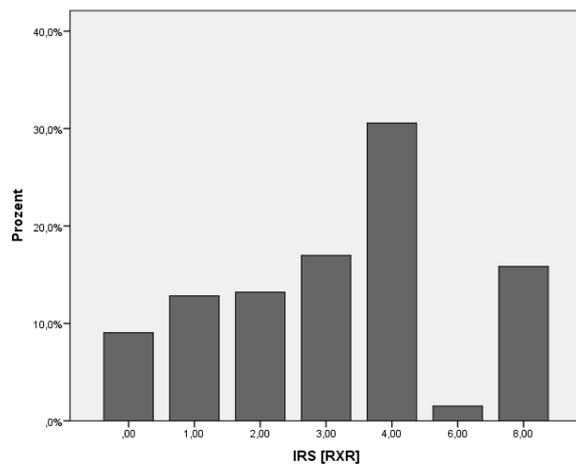
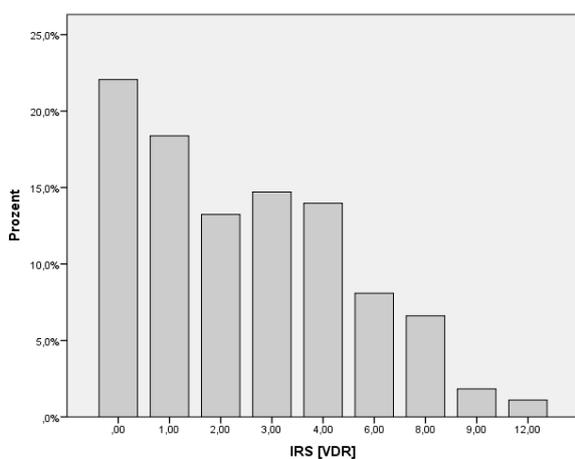


Abbildung 5: Häufigkeit der Rezeptorexpression in Prozent nach IRS für VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ

6.2 Korrelationsanalysen

6.2.1 Korrelation der Expression der jeweiligen Rezeptoren

Die Korrelationsanalyse, welche in Tabelle 15 aufgelistet ist, ergab, dass VDR positiv mit RXR α korreliert ($p = 0,002$), ebenso wie mit nukleär exprimierten n-PPAR γ ($p = 0,002$). Zwischen der Expression der beiden Rezeptoren, RXR α und n-PPAR γ , besteht eine negative Korrelation ($p = 0,047$). Die hohe Expression von c-PPAR γ korreliert mit einer niedrigen n-PPAR γ -Expression ($p < 0,001$). Alle weiteren Korrelationen zeigten, wie in Tabelle 15 dargestellt, keine signifikanten Ergebnisse.

Rezeptor		VDR	RXR α	n-PPAR γ	c-PPAR γ
VDR	Korrelationskoeffizient	1,000	,192	,192	,025
	p-Wert		,002	,002	,691
RXR α	Korrelationskoeffizient	,192	1,000	-,125	,162
	p-Wert	,002		,047	,010
n-PPAR γ	Korrelationskoeffizient	,192	-,125	1,000	-,249
	p-Wert	,002	,047		,000
c-PPAR γ	Korrelationskoeffizient	,025	,162	-,249	1,000
	p-Wert	,691	,010	,000	

Tabelle 15: Korrelation der intrazellulären Rezeptoren VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ

6.2.2 Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Tumormerkmalen

Wie die statistische Auswertung der Expression der Rezeptoren VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ zeigt, wurden diese in unterschiedlichem Maße von Mammakarzinomzellen exprimiert. Im Folgenden wurden die Ergebnisse aus der statistischen Auswertung der Rezeptorexpression mit den klinischen Daten korreliert.

Korrelation zwischen Expression von VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ und Tumorhistologie

Zunächst wurde getestet, ob die Expression der untersuchten Rezeptoren mit den etablierten Faktoren der Tumorhistologie korreliert. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, konnte für die Expression von VDR mithilfe des Kruskal-Wallis-Test gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation ($p = 0,028$) zwischen histologischem Subtyp und Expression besteht. In einem zweiten Schritt wurde diese Korrelation mittels Mann-Whitney-Test genauer untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass eine hohe VDR-Expression signifikant häufiger mit invasiv lobulären Karzinomen korreliert, als mit anderen histologischen Subtypen ($p = 0,033$). Dieses Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt.

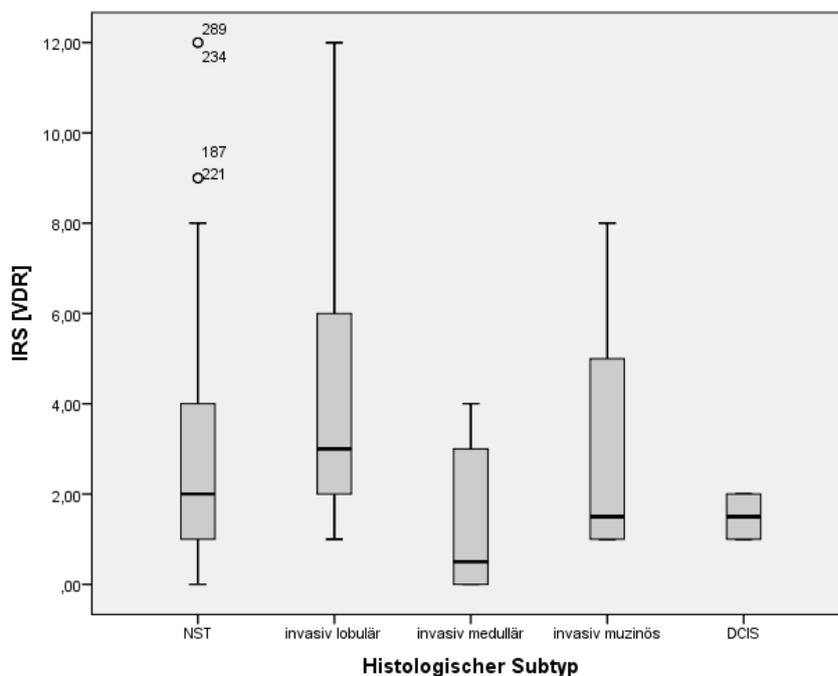


Abbildung 6: Histologischer Subtyp in Abhängigkeit von VDR-Expression

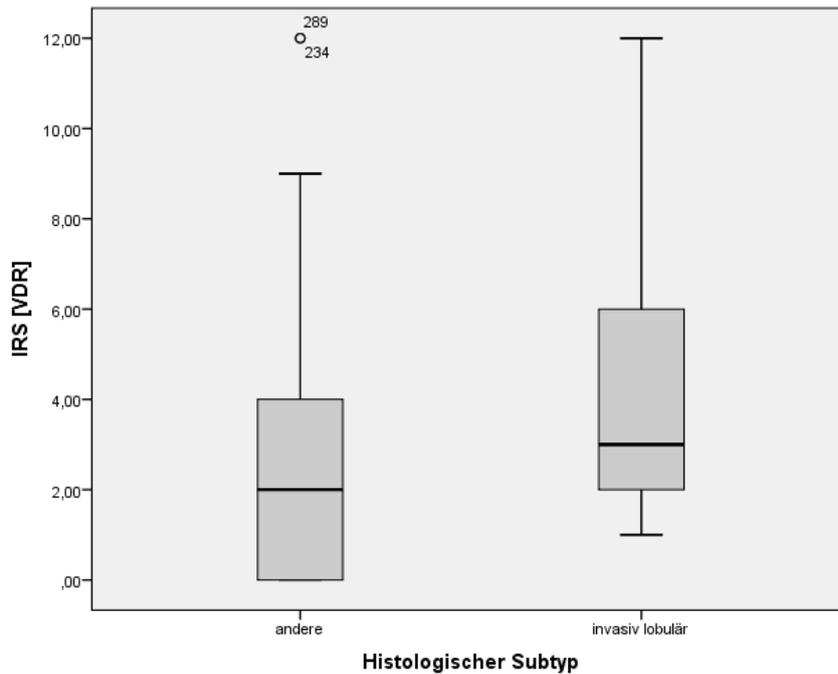


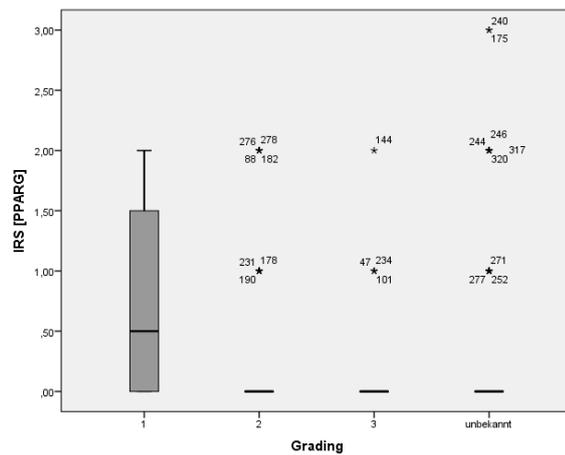
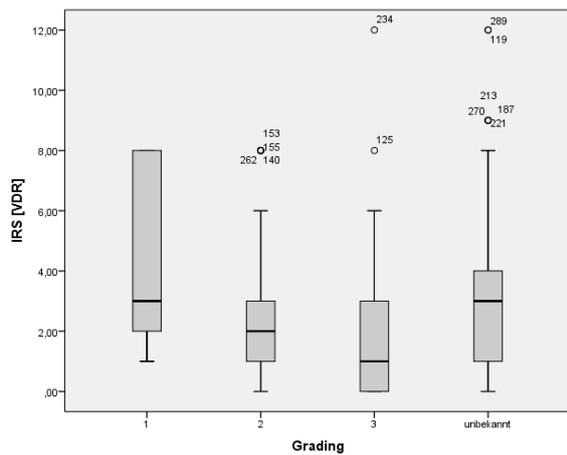
Abbildung 7: VDR-Expression bei invasiv lobulären Karzinomen und Tumoren anderer histologischer Subtypen

Zwischen dem histologischem Subtyp und der Expression von RXR α ($p = 0,283$), n-PPAR γ ($p = 0,475$) oder c-PPAR γ ($p = 0,321$) gab es keine signifikante Korrelation.

Korrelation zwischen Expression von VDR, RXR α , n-PPAR γ , c-PPAR γ und Grading

Wir konnten zeigen, dass G1-Tumore, also gut differenzierte Tumore, mit einer höheren Expression von VDR, n-PPAR γ und c-PPAR γ einhergehen. In Abbildung 8 ist dargestellt, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von VDR ($p = 0,01$) und dem Grading des Tumors bestand. Abbildung 9 zeigt dies für die Expression von n-PPAR γ ($p = 0,001$). Die Expression von RXR α ($p = 0,844$) oder c-PPAR γ ($p = 0,502$) zeigte keine signifikante Korrelation.

In Abbildung 10 und Abbildung 11 ist dargestellt, dass es G1-Tumore sind, die signifikant häufiger hohe VDR-Expression ($p = 0,003$), sowie n-PPAR γ -Expression ($p < 0,001$) aufweisen.



Grading: 1 = gut, 2 = mäßig, 3 = schlecht

Abbildung 8: VDR-Expression in Abhängigkeit vom Grading

Abbildung 9: n-PPAR γ -Expression in Abhängigkeit vom Grading

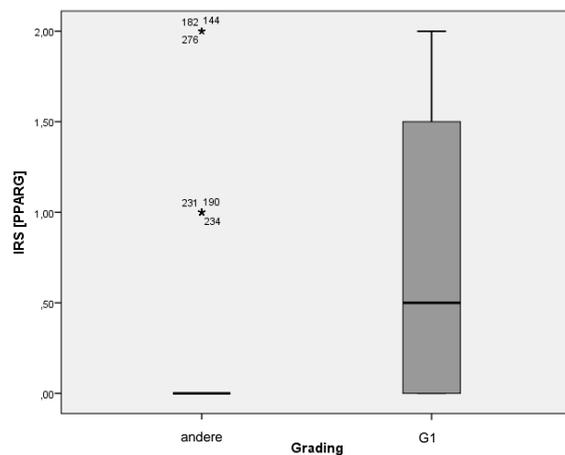
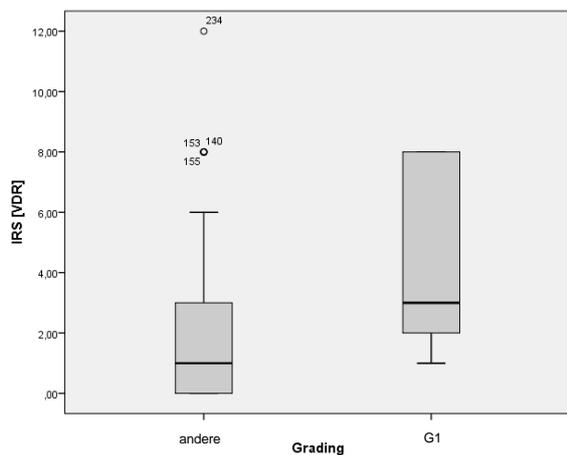


Abbildung 10: VDR-Expression bei G1-Tumoren im Vergleich zu G2/G3 Tumoren

Abbildung 11: n-PPAR γ -Expression bei G1-Tumoren im Vergleich zu G2/G3 Tumoren

Korrelation zwischen Expression von VDR, RXR α , n- PPAR γ , c-PPAR γ und Tumorgröße

Weitere wichtige Prognosefaktoren sind jene, die in der TNM-Stadieneinteilung Ausdruck finden. Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen Tumorgröße (T) und Expression von VDR, RXR α , n- PPAR γ und c-PPAR γ untersucht. Die Tumorgröße wurde für die statistische Berechnung in ein binäres System umgewandelt, wobei kleine und große Tumoren unterschieden wurden. Im Mann-Whitney-Test zeigte sich, dass VDR auf kleinen Tumoren (pT1) signifikant höher exprimiert ist, als in großen Tumoren (pT2-4) ($p = 0,038$), was in Abbildung 12 zu sehen ist. Bei der Korrelation

von RXR α mit der Tumorgröße zeigte sich zudem die Tendenz, dass pT1-Tumoren RXR α stärker exprimieren als pT2-4-Tumore ($p = 0,051$) (s. Abbildung 13). Dagegen war die nukleäre ($p = 0,330$) sowie die zytoplasmatische ($p = 0,229$) Expression von PPAR γ unabhängig von der Tumorgröße.

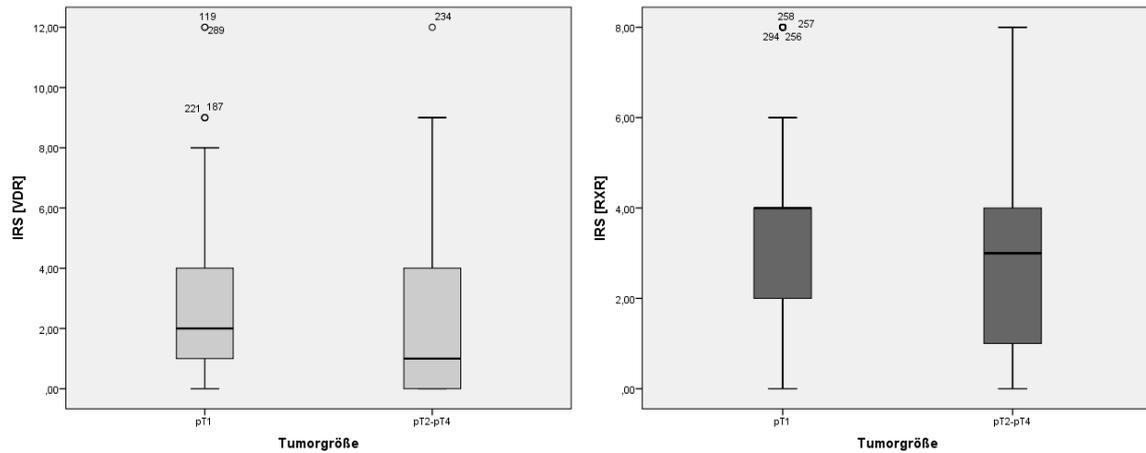


Abbildung 12: Tumorgröße in Abhängigkeit von VDR-Expression

Abbildung 13: Tumorgröße in Abhängigkeit von RXR α -Expression

Korrelation zwischen Expression von VDR, RXR α , n-PPAR γ , c-PPAR γ und axillären Lymphknotenmetastasen

Ein weiterer Prognosefaktor ist das Vorliegen axillärer Lymphknotenmetastasen. Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastasen und Rezeptorexpression. Bei der statistischen Analyse mittels Mann-Whitney-Test konnte ein Zusammenhang zwischen Lymphknoten-Status und VDR-Expression nachgewiesen werden. Wie Abbildung 14 zeigt, bestand eine positive Korrelation zwischen Tumoren ohne axilläre Lymphknotenmetastasen und Tumoren mit hoher VDR-Expression ($p = 0,046$).

Zwischen der Expression von RXR α ($p = 0,544$), n-PPAR γ ($p = 0,440$) oder c-PPAR γ ($p = 0,516$) und dem Vorliegen axillärer Lymphknotenmetastasen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

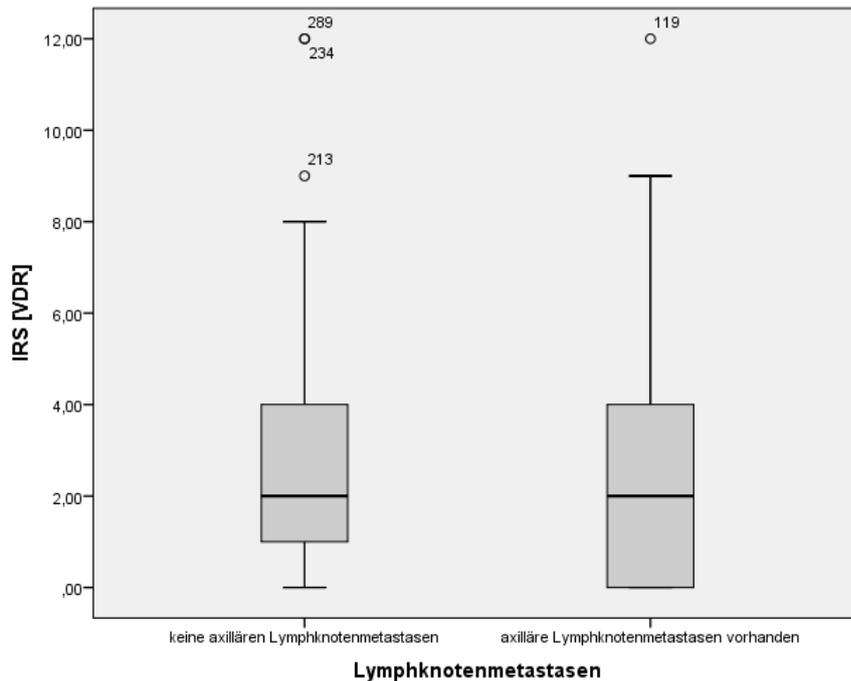


Abbildung 14: Auftreten von axillären Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit der VDR-Expression

Korrelation zwischen Expression von VDR, RXR α , n-PPAR γ , c-PPAR γ und Fernmetastasen

Nach Tumorgröße und LK-Status wurde die Korrelation mit dem Vorliegen von Fernmetastasen untersucht. In der statistischen Analyse zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Fernmetastasen und der Expression von VDR ($p = 0,096$), RXR α ($p = 0,808$), n-PPAR γ ($p = 0,572$) und c-PPAR γ ($p = 0,097$).

Korrelation zwischen Expression von VDR, RXR α , n-PPAR γ , c-PPAR γ und Lokalrezidiv

Wie oben beschrieben, erlitten 13,4 % der Patientinnen ein Lokalrezidiv. Ein Zusammenhang zwischen Lokalrezidivrate und der Expression von VDR ($p = 0,326$), RXR α ($p = 0,185$) oder n-PPAR γ ($p = 0,817$) konnte nicht nachgewiesen werden. Für c-PPAR γ konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen eines Lokalrezidives mit einer hohen zytoplasmatischen Expression von c-PPAR γ korreliert ($p = 0,013$) (s. Abbildung 15).

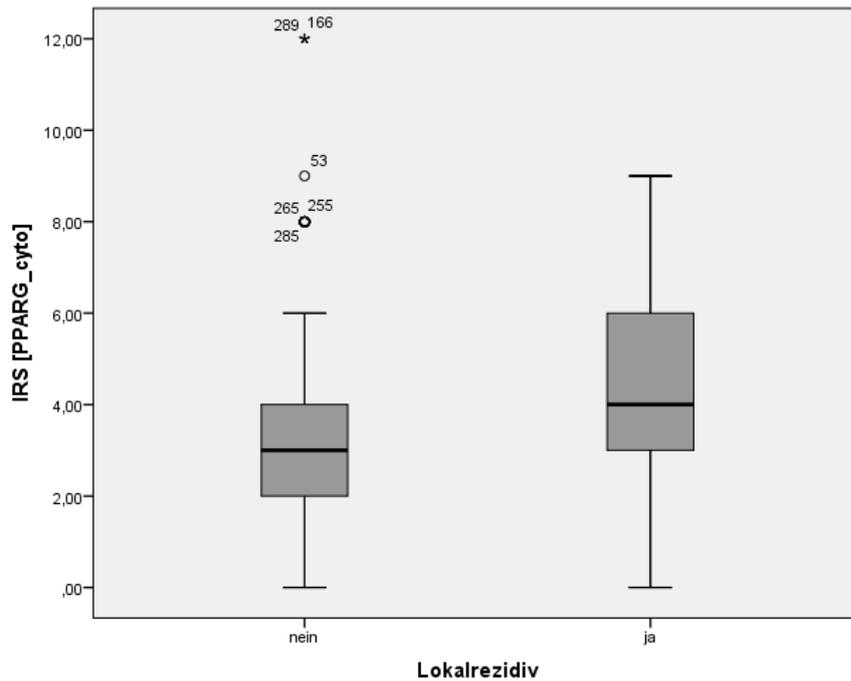


Abbildung 15: Auftreten von Lokalrezidiven in Abhängigkeit von c-PPAR γ -Expression

6.2.3 Korrelation zwischen Rezeptorexpression und prädiktiven Faktoren

Im Folgenden werden die Ergebnisse der statistischen Analyse in Bezug auf den Östrogenrezeptorstatus dargelegt. Die statistische Analyse des Zusammenhangs zwischen Progesteronrezeptorstatus und Expression der Rezeptoren VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ ergab keine signifikanten Ergebnisse. Ebenso wenig konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Her2-Status und der Expression der Rezeptoren VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ nachgewiesen werden.

Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Östrogenrezeptorstatus

Die Expression der Östrogenrezeptoren korrelierte sowohl mit der Expression von VDR als auch mit der c-PPAR γ -Expression.

Im Mann-Whitney-Test zeigte sich ein hoch-signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) zwischen hoher Östrogenrezeptorexpression und hoher VDR-Expression, welcher in Abbildung 16 abgebildet ist. Für RXR α zeigte sich kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,480$). Bei der c-PPAR γ -Expression konnte gezeigt werden, dass eine niedrige zytoplasmatische Rezeptorexpression mit einer hohen Östrogenrezeptorexpression korreliert ($p = 0,033$). Dies ist in Abbildung 17 zu sehen.

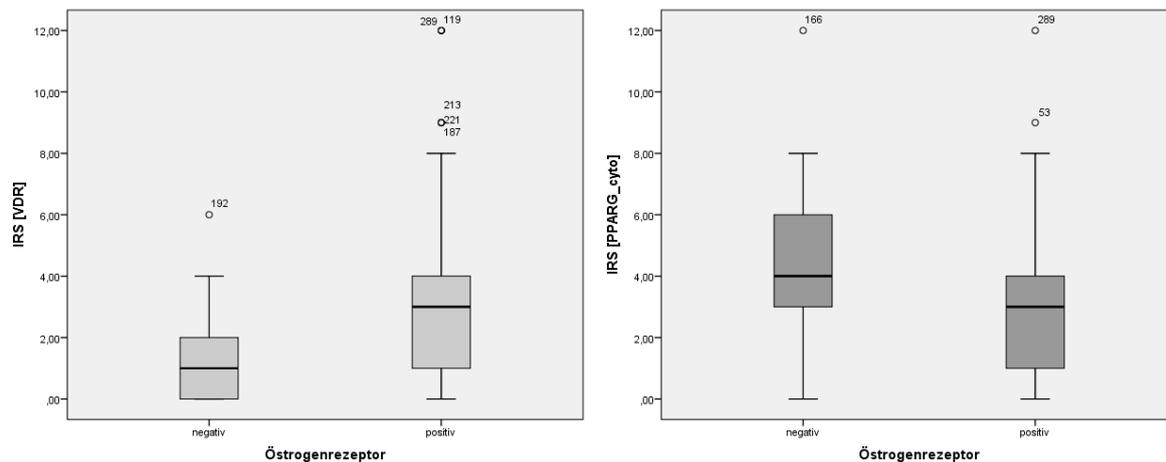


Abbildung 16: Östrogenrezeptor-Status in Abhängigkeit von VDR-Expression

Abbildung 17: Östrogenrezeptor-Status in Abhängigkeit von c-PPAR γ -Expression

Die Analyse zu n-PPAR γ wurde aufgrund der unzureichenden Streuung und der dadurch überbewerteten Ausreißer trotz des signifikanten Ergebnisses ($p = 0,007$) aus der Bewertung ausgenommen.

6.3 Überlebenskurven

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Berechnungen mittels Kaplan-Meier-Kurven vorgestellt. In diesem Abschnitt werden sowohl signifikante, als auch nicht-signifikante Berechnungen dargelegt.

6.3.1 Gesamtüberleben

Überleben in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus

Zunächst wurde der in der Literatur bereits beschriebene und in der Klinik etablierte Zusammenhang zwischen Östrogenrezeptorexpression und Überleben untersucht. Wie in Abbildung 18 zu sehen, zeigt die Überlebenskurve, dass ein positiver Östrogenrezeptorstatus mit einem längeren Überleben korreliert ($p = 0,001$).

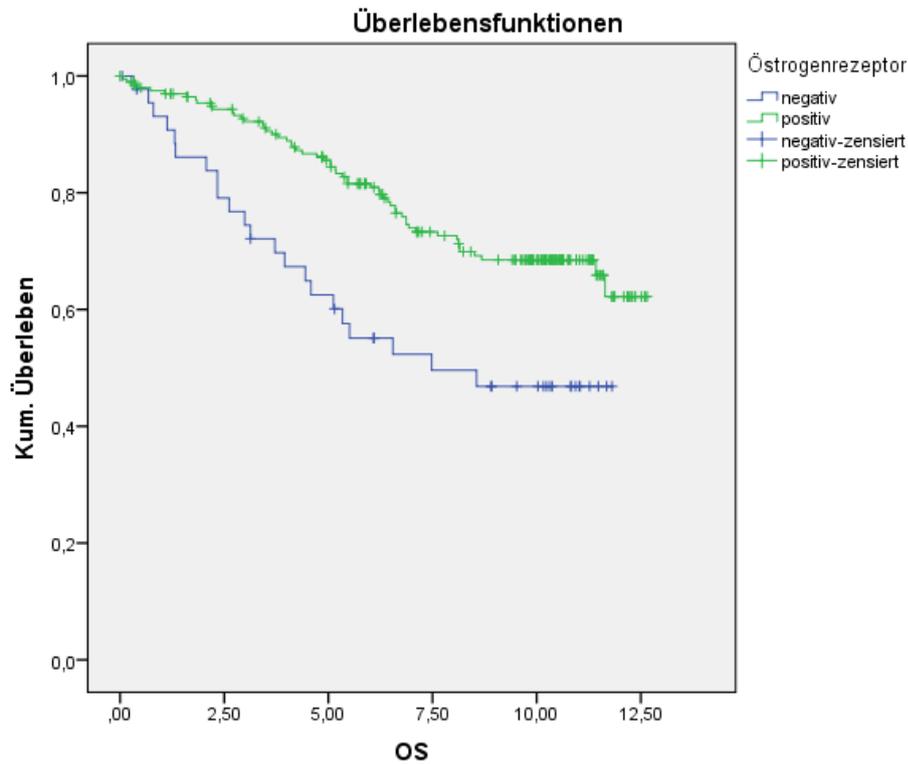
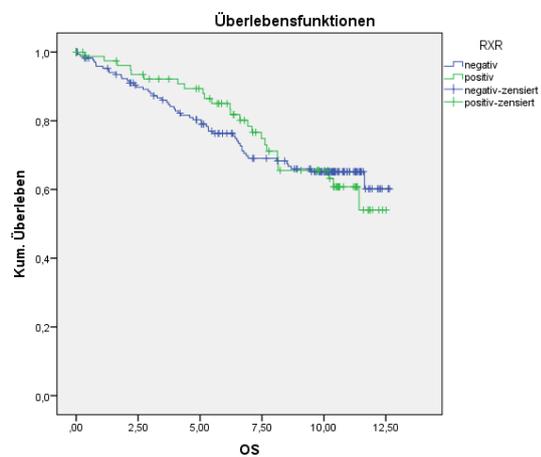
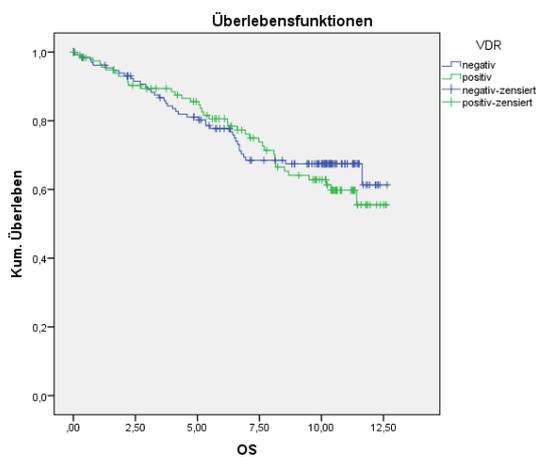


Abbildung 18: Überleben in Jahren in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptor-Status, OS = Overall Survival (Gesamtüberleben)

Überleben in Abhängigkeit von VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ

Die Überlebensfunktionen, die das Überleben des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit von der Expression der Rezeptoren VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ untersuchten, zeigten keine signifikanten Ergebnisse.



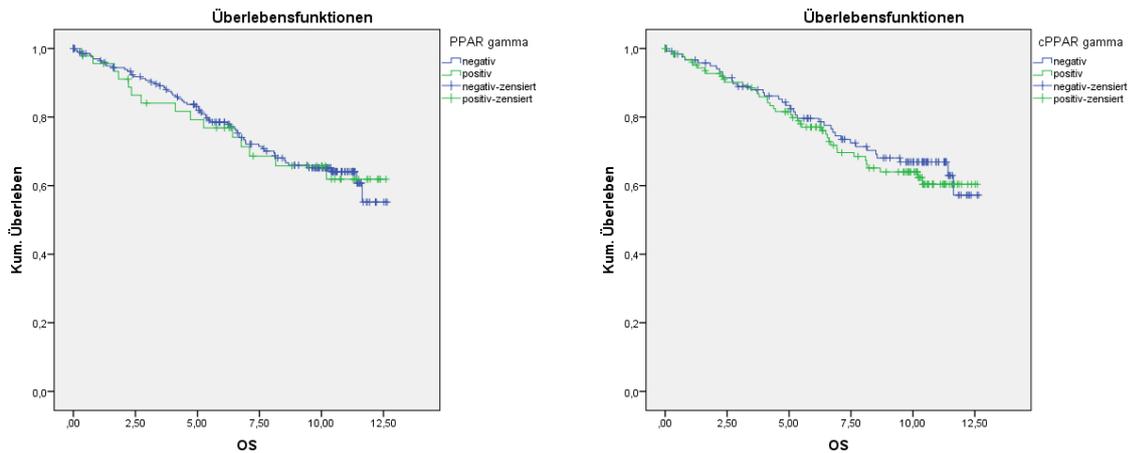


Abbildung 19: Überleben in Jahren in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression (negativ = \leq Median, positiv = $>$ Median), OS = Overall Survival (Gesamtüberleben)

6.3.2 Rezidivfreies Überleben

Das rezidivfreie Überleben (disease free survival, DFS) in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression, dargestellt in Abbildung 20, zeigt, dass die VDR-Expression invers mit der Rezidivfreiheit der Patientinnen korreliert ($p = 0,024$). Dabei lag die Rezidivfreiheit bei Patientinnen mit VDR-negativen (IRS ≤ 2) Tumoren zwischen 7,3 und 9,2 Jahren und bei Patientinnen mit VDR-positiven Tumoren zwischen 5,9 und 7,8 Jahren. Zwischen c-PPAR γ -Expression und Rezidivfreiheit besteht ebenfalls eine inverse Korrelation. Patientinnen mit hoher c-PPAR γ -Expression (IRS > 3) erlitten signifikant früher ein Rezidiv, zwischen 5,8 und 7,6 Jahren, als Patientinnen mit geringer c-PPAR γ -Expression ($p = 0,006$), welche zwischen 7,7 und 9,6 Jahren ein Rezidiv erlitten.

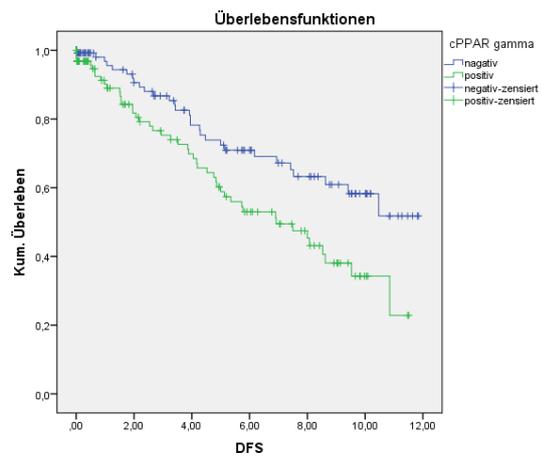
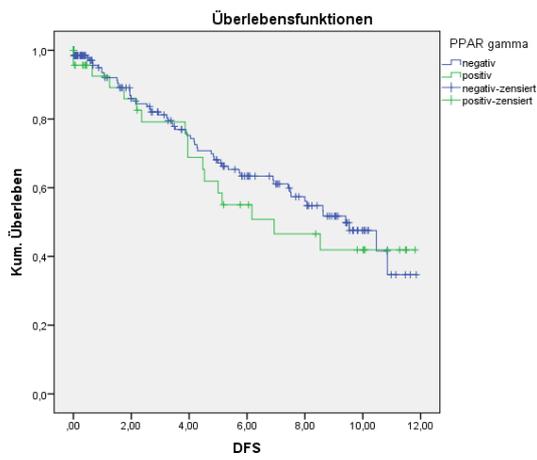
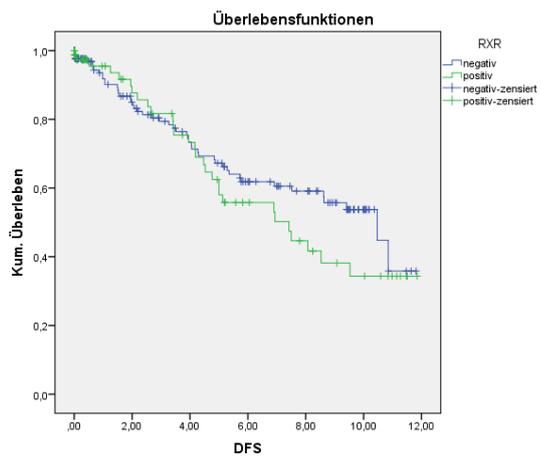
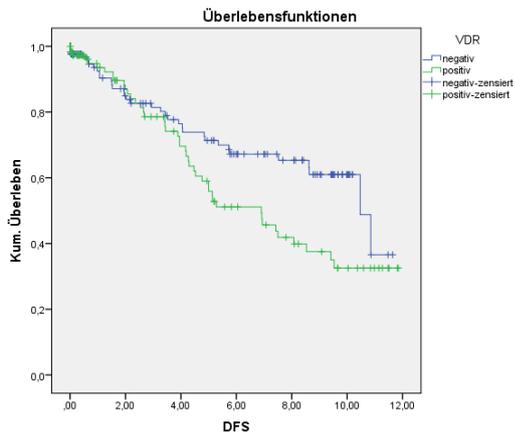


Abbildung 20: Rezidivfreies Überleben in Jahren in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression (negativ = \leq Median, positiv = $>$ Median), DFS = Disease Free Survival

7 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der immunhistochemische Nachweis des Vitamin D3-Rezeptors (VDR), des Retinoidrezeptors alpha (RXR α) sowie des nukleär und zytoplasmatisch exprimierten Peroxisome Proliferator-activated Rezeptors gamma (n-PPAR γ und c-PPAR γ) auf sporadischen Mammakarzinomen untersucht und mit bekannten prognostischen und prädiktiven Faktoren korreliert. Insgesamt lagen Daten von 306 Patientinnen vor, die mit primärem Mammakarzinom diagnostiziert und operiert wurden. Vergleichbar mit der Allgemeinbevölkerung in Deutschland lag das mittlere Erkrankungsalter im Patientinnenkollektiv bei 60 Jahren. Das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben von 80 % im Kollektiv deckt sich mit den Daten der vom Robert-Koch-Institut erhobenen Brustkrebsstatistik [1].

Anhand der vorliegenden Daten konnten VDR-, RXR α -, n-PPAR γ und c-PPAR γ -positive Tumore näher beschrieben werden. Die Ergebnisse liefern Hinweise auf die prognostische Relevanz dieser nukleären Rezeptoren.

So ist die Expression von VDR besonders mit bekannten positiven Prognosefaktoren wie geringer Tumorgroße, guter Differenzierung und der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen assoziiert. Das Expressionsmuster von RXR α entspricht dessen regulatorischem Einfluss auf die Transkriptionsaktivität anderer intrazellulärer Rezeptoren. Die Expression von n-PPAR γ ist mit gut differenzierten Tumoren assoziiert, die Expression von c-PPAR γ hingegen korreliert positiv mit der Lokalrezidivrate. Patientinnen deren Tumore eine hohe c-PPAR γ -Expression aufweisen, hatten in der statistischen Auswertung ein kürzeres rezidivfreies Überleben.

7.1 Diskussion der Methode

Das von uns angewandte immunhistochemische Verfahren der ABC-Methode ist eines der validesten Verfahren um Unterschiede in der Expression von Rezeptoren der Steroidfamilie zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe darzustellen [54], während Analysen auf mRNA-Ebene bisher kein zuverlässiges Abbild der tatsächlichen Rezeptorexpression liefern [32]. Gegenüber dem Western Blot zeigt die Methode den Vorteil, dass eine Bewertung des Expressionsmusters der Rezeptoren möglich ist. Für die Auswertung der gefärbten Präparate steht mit dem IRS ein standardisiertes Auswertungsverfahren zur Verfügung, welches in Anlehnung an die Auswertung von Östrogenrezeptorexpression und Progesteronrezeptorexpression bereits breite Anwendung findet [55].

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen statistische Korrelationen zwischen Rezeptorexpression und klinisch bedeutsamen prognostischen und prädiktiven Markern zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme. Fragen, die sich aus den vorgestellten Ergebnissen ergeben, wie beispielsweise Analysen der Wirkweise oder Regulation der Rezeptoren, müssen in weiteren Studien untersucht werden.

7.2 Vitamin D3-Rezeptor (VDR)

Der Vitamin D3-Rezeptor (VDR) ist ein nukleärer Rezeptor, der in verschiedenen Geweben exprimiert wird. VDR ist vor allem in Knochen, Niere und Darm exprimiert, aber auch in anderen Geweben wie Brust- und Prostatagewebe sowie im Blut [56]. In Mammakarzinomgewebe zeigt sich eine Überexpression von VDR gegenüber gesundem Brustgewebe [32]. Sein Ligand ist das lipophile Hormon 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D3). Die Hauptwirkung von Vitamin D3 ist die Regulierung der Calciumhomöostase. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die VDR-abhängige Vitamin D3-Wirkung bei Prozessen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt [33].

7.2.1 VDR-Expression auf malignen Mammatumoren

VDR wird in Mammakarzinomgewebe exprimiert. Wie in verschiedenen Studien bereits beschrieben, werden Vitamin D3-Rezeptoren in gesundem Brustgewebe, benignen Mammatumoren und Mammakarzinomen exprimiert [32–34]. Ein erster immunhistochemischer Nachweis von VDR in Mammakarzinomzellen gelang 1987 [42, 57]. Vergleichbar mit den Ergebnissen vorheriger Studien zeigten 77,9 % der von uns untersuchten Tumorpräparate eine Expression von VDR [57, 58].

7.2.2 Regulation der VDR-Expression

Die Expression von VDR kann direkt über seinen Liganden, Vitamin D3, reguliert werden. Diese sogenannte homologe Hochregulation ist Resultat intrazellulärer Vitamin D3-Anreicherung. Die Hochregulation von VDR induziert wiederum eine erhöhte Sensibilität des Brustgewebes gegenüber Vitamin D3 [32]. Zusätzlich wirkt VDR möglicherweise als *carrier protein* für Vitamin D3 aus dem Zytosol in den Nucleus, entsprechend einem Regulationsmechanismus durch Translokation und Aktivierung des VDR [59].

Cytokine und andere Entzündungsmediatoren können die Regulation von VDR in Tumorzellen im Sinne einer heterologen Hochregulation stimulieren [32]. In ER-positiven Zellen kann die VDR-Expression durch Östrogene über Phosphorylierungsprozesse reguliert werden. Gliad et al. konnten in ER-positiven Zellen einen Ras-ERK-abhängigen Signalweg zeigen, welcher über Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zu einer Steigerung der Transkription und

Expression von VDR führt [60]. Welsh et al. konnten zeigen, dass in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 die Transkription und Expression des VDR östrogenabhängig über die Aktivität des Exon 1c des hVDR Promoters induziert wird. Kommt es zu einer Östrogen-abhängigen VDR-Hochregulation, induziert der Vitamin D3-VDR-Komplex als Signalantwort Gene wie p21, die effektiv die Zellproliferation hemmen [61].

7.2.3 VDR-Expression und Differenzierungsgrad des Tumors

In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p = 0,003$) zwischen hoher VDR-Expression und gut differenzierten Tumoren.

Brustgewebe verliert während der Tumorgenese und -progression zunehmend die Fähigkeit VDR zu synthetisieren. Dies beschrieben Lopes et al. in einer Studie, in der normales Brustgewebe, benigne Läsionen, duktales Carcinomata in situ und Mammakarzinome bezüglich ihrer VDR-Expression verglichen wurden [34]. Die genauen Wirkmechanismen, die zu dieser Downregulation führen sind nicht abschließend geklärt. Es bestehen verschiedene Erklärungsansätze. Kemmis et al. konnten beispielsweise zeigen, dass durch Oncogene hervorgerufene Gewebeveränderungen zu einer Abnahme der VDR-Expression in humanem Brustgewebe führt [62].

Friedrich et al zeigten zusätzlich, dass VDR-positive Zellen in der luminalen (differenzierten) Zellschicht vorkommen, nicht aber in proliferierenden, Ki67-positiven Zellen [32], welche sich zunehmend in schlecht differenzierten Mammakarzinomen finden. Darüber hinaus stellt ein entstandener VDR-Verlust ein protumorgenetisches Umfeld dar. Ist die Expression von VDR reduziert, kommt es zu übermäßigem Wachstum, unzureichender Differenzierung und zu verzögertem Abbau des Gewebes [63].

7.2.4 VDR-Expression und Tumorgroße

In der Untersuchung konnte außerdem gezeigt werden, dass kleine Tumore (pT1) mit einer höheren VDR-Expression korrelieren. Dieses Ergebnis bestätigt das Resultat unserer Vorläuferstudie [41].

Zum einen können die bereits beschriebenen Mechanismen der Entdifferenzierung, die mit einem Verlust der VDR-Synthese- und Expressionsfähigkeit einhergehen, Grund für die abnehmende VDR-Expression bei Tumorstadium sein. Desweiteren

konnte in Studien gezeigt werden, dass eine geringe oder fehlende VDR-Expression das Tumorstadium begünstigt [60, 64, 65]. In einer in-vivo Studie zeigte sich, dass VDR Knock-out-Mäuse nach 30 Tagen signifikant größere Tumore aufweisen als Wildtyp-Mäuse. Grund hierfür scheint die ungehemmte Tumorangio-genese zu sein [66]. Neben verstärktem Tumorstadium durch ungehemmte Angio-genese konnte außerdem gezeigt werden, dass Vitamin D3 über VDR einen Apoptose-induzierenden Signalweg aktiviert [67]. Nimmt die VDR-Expression ab, so nimmt auch die Apoptose-induzierende Wirkung des Vitamin D3 ab und begünstigt das Tumorstadium.

7.2.5 VDR-Expression und Lymphknotenmetastasen

Eine hohe VDR-Expression konnte signifikant häufiger in Mammakarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Ergebnisse der vorangegangenen Studie [41].

Die beobachtete positive Korrelation zwischen hoher VDR-Expression und geringer Inzidenz von Lymphknotenmetastasen ergänzt die bereits beschriebene Korrelation der VDR-Expression mit Tumorstadium und Grading. Wie bereits beschrieben hemmt eine hohe VDR-Expression das Tumorstadium und es sind vor allem die gut differenzierten Tumore, die eine hohe VDR-Expression zeigen. Voraussetzung für die Entstehung von Metastasen sind Einbrüche von Tumorzellen in Lymphgefäße, deren Risiko mit zunehmender Tumorstadium steigt [68]. Ebenso nötig für die Metastasierung ist die Entwicklung einer Migrationsfähigkeit, die mit der Entdifferenzierung der Zellen einhergeht [69]. Das geringe Auftreten von Lymphknotenmetastasen kann als Effekt der niedrig malignen Eigenschaften VDR-positiver Tumore gedeutet werden.

7.2.6 VDR-Expression und Östrogenrezeptor-Expression

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen Vitamin D3- und Östrogenrezeptor(ER)-Expression nachgewiesen werden. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten beobachtet [34, 70]. Zwei in-vitro Studien konnten nachweisen, dass ER-abhängige Regulationsmechanismen die VDR-Expression erhöhen [60, 71]. Entsprechend konnte hier gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen den beiden Rezeptoren besteht. Einen daraus abgeleiteten Überlebensvorteil für Patientinnen mit VDR-positivem Mammakarzinom konnten wir nicht abbilden.

7.2.7 VDR-Expression und Überleben

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen hoher VDR Expression und verschiedenen prognostisch günstigen Markern. Es konnte jedoch kein Überlebensvorteil für Patientinnen mit VDR-positiven Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht dem einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der ein Kollektiv mit 1149 Mammakarzinompatientinnen untersucht wurde. Al-Azhri et al konnten eine inverse Korrelation zwischen VDR-Expression und aggressiven Tumoren feststellen, ohne einen Überlebensvorteil bei hoher VDR-Expression nachweisen zu können [72].

Es ist bekannt, dass es verschiedene VDR-Polymorphismen gibt [73]. Auch hat der VDR-Signalweg mehrere regulierende Zielgene, die Immunantwort (CD14), Differenzierung (Bmp6), Remodeling extrazellulärer Matrix (Plau) und Zellüberleben (Birc3) initiieren [74]. Durch verschiedene VDR-Polymorphismen und unterschiedliche Zielgene, wird die vielfältige Vitamin D3-vermittelte VDR-Wirkung bedingt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass der wachstumshemmende Effekt von Vitamin D3 und potenten Vitamin D3-Analoga teilweise sogar bei VDR Knock-out Mäusen auftritt. Dies lässt annehmen, dass es alternative genetische oder epigenetische Mechanismen geben muss, die zu den Vitamin D3-abhängigen Wachstumseffekten beitragen [75].

Gleichzeitig ist bekannt, dass bei in-vivo Experimenten nicht jede Mammakarzinomzelllinie gleichermaßen auf eine Therapie mit Vitamin D3-Agonisten anspricht. In einer Arbeit von Hussein et al reagierten VDR positive Zellen je nach ER-Status unterschiedlich auf die Therapie. Bei VDR- und ER-positiven Zellen wurde Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose beobachtet, während in VDR positiven und ER negativen Zellen eine erhöhte Expression von Differenzierungsmarkern nachgewiesen werden konnte [76].

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde außerdem eine Liganden-unabhängige VDR-Wirkung nachgewiesen. Nach künstlicher Akkumulation von zytoplasmatischen VDR wurde in einer MCF7-KD Mammakarzinomzelllinie Liganden-unabhängig die Stimulation des Zellwachstums beobachtet. [77]

Die beschriebene Diversität Vitamin D3 induzierter VDR-Wirkung und die Möglichkeit der ligandenunabhängigen VDR-Wirkung führt dazu, dass die VDR-Expression allein keine prognostische Relevanz bezüglich des Überlebens zeigt.

Ziel sollte es sein, die VDR-Subtypen genauer zu untersuchen und die Klassifikation von Mammakarzinomen zu erweitern, um so zugrunde liegende Pathomechanismen besser verstehen und gegebenenfalls therapeutische Optionen besser nutzen zu können [54].

7.3 Retinoidrezeptor alpha (RXR α)

Die Wirkung der Retinoidrezeptoren (RXR) besteht, häufig in Interaktion mit RARs, in der Vermittlung der durch Retinsäure ausgelösten Zellantwort. Zusätzlich wirkt RXR α als Bindungspartner für andere nukleäre Rezeptoren wie VDR und bildet Heterodimere [31, 78]. Besonders während der Differenzierungsprozesse spielt RXR α eine wichtige Rolle. In Phasen der terminalen Differenzierung von Adipozyten konnte beobachtet werden, dass die Expression von RXR α um das Fünffache ansteigt [79]. Auch in Mammakarzinomgewebe konnte eine Überexpression von RXR α nachgewiesen werden [32].

7.3.1 RXR α -Expression und VDR-Expression

Die von uns nachgewiesene Korrelation zwischen RXR α und VDR entspricht der beschriebenen Heterodimerisierung dieser beiden Rezeptoren.

Bindet RXR α an VDR, so fungiert das entstandene Heterodimer lediglich als Rezeptor für Vitamin D3 während die Interaktion von Retinsäure mit RXR α an der Liganden Bindungsdomäne verhindert wird. Dieser sogenannte *phantom ligand effect* wird durch eine, nach Heterodimerisierung ausgelöste, Konformationsänderung bewirkt. [31]

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass RXR α und VDR in maligne verändertem Brustgewebe exprimiert werden und ihre Expression im Vergleich zu gesundem Brustgewebe hochreguliert ist [32].

Durch Heterodimerisierung mit RXR α wird die VDR-vermittelte Transkription verstärkt [78, 80]. VDR-RXR α ist ein non-permissiver Heterodimer. Die VDR-Aktivität wird RXR α -abhängig erhöht.

7.4 Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor gamma (PPAR γ)

Die Untergruppe der Peroxisome Proliferator-activated Rezeptoren (PPAR) besteht aus drei Isoformen: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ . Von diesen ist PPAR γ der am besten untersuchte Rezeptor [81]. PPAR γ reguliert wichtige biologische Stoffwechselwege durch Induktion und Hemmung von Zelldifferenzierung, Apoptose und Proliferation. Die PPAR γ vermittelte Wirkung greift in Entzündungs- und Umbauprozesse als auch in den Fettstoffwechsel ein [81, 82]. PPAR γ ist ebenfalls in maligne entartetem Brustkrebsgewebe exprimiert. Die Aktivierung von PPAR γ

induziert Apoptose und wirkt antiproliferativ. Durch die Interaktion mit RXR wird diese Wirkung potenziert [83, 84]. Auch die in Studien untersuchte Stimulation von Brustkrebszelllinien mittels PPAR γ -Liganden führt zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen und mindert ihre Malignität [85].

7.4.1 PPAR γ -Expression in Zytoplasma und Kern

In normalem Brustgewebe wird PPAR γ in geringen Mengen in den duktalem Epithelzellen exprimiert, während die PPAR γ -Expression in Mammakarzinomzellen verstärkt nachgewiesen werden kann [35, 36], ebenso in Gewebeproben von metastasierten Mammakarzinomen [85].

In der vorliegenden Untersuchung wurde in 49,4 % der Mammakarzinom-Präparate eine positive PPAR γ -Expression nachgewiesen. Dies ist vergleichbar mit Daten aus vorangegangenen Studien [37, 86]. Die Expression von PPAR γ entsprach vornehmlich einem zytoplasmatischen Verteilungsmuster, wie es schon von Papadaki et al. in Mammakarzinomgewebe beschrieben wurde [37]. In weiteren Studien wurde bei verschiedenen malignen Tumoren ebenfalls ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster, teils mit Betonung der perinukleären Expression, beschrieben [43–45].

Als Transkriptionsfaktor ist PPAR γ nukleär lokalisiert. Durch Heterodimerisierung von PPAR γ mit RXR α entsteht ein Transkriptionskomplex, der ein Peroxisome-Proliferator-Response-Element (PPRE) binden kann. Ohne Ligandenbindung bildet das Heterodimer hochaffine Komplexe mit nukleären Korepressor-Proteinen, wie dem nuclear receptor co-repressor (N-CoR), welcher am PPRE zur Repression der Transkription führt. Die Dissoziation dieser Korepressoren wird erst durch eine ligandeninduzierte Konformationsänderung herbeigeführt. Resultat der Liganden-Bindung ist der Austausch von Korepressoren gegen Koaktivatoren und damit die Aktivierung der Transkription im Zielgen [46, 47].

PPAR γ kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden, von denen einige im Folgenden vorgestellt werden. Teils geht die Downregulation mit der Translokation des Rezeptors in das Zytoplasma einher, wodurch die hier beobachtete zytoplasmatische PPAR γ -Expression erklärt wird.

Im Zellkern lokalisierte PPA-Rezeptoren γ können beispielsweise MEK(MAPK/ERK Kinase)1-abhängig, mittels inhibierender Phosphorylierung, in das Zytosol transportiert werden [38]. Weitere Transportmechanismen, die über

Phosphorylierung von PPAR γ zu einer reduzierten Transkriptionsaktivität führen, wurden in Entzündungszellen wie Monozyten und Makrophagen beobachtet. Dazu gehört die CK-II (Casein Kinase II) abhängige Phosphorylierung sowie die Protein-Protein-Interaktion zwischen PKC α und PPAR γ [48]. In einer Makrophagen-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die Nitration von PPAR γ den ligandenabhängigen (Rück-)Transport des Rezeptors in den Kern verhindert [87]. Diese in Makrophagen beobachteten Prozesse werden mit der antiinflammatorischen Wirkung von PPAR γ in Verbindung gebracht. Möglicherweise tragen diese oder ähnliche Mechanismen auch zur Translokation nukleärer zu zytoplasmatischen PPAR γ in Mammakarzinomzellen bei.

7.4.2 Vergleich nukleärer und zytoplasmatischer PPAR γ -Expression

Eine geringe nukleäre PPAR γ -Expression (n-PPAR γ -Expression) korreliert mit einer hohen zytoplasmatischen PPAR γ -Expression (c-PPAR γ -Expression). Ursächlich kann die beschriebene Translokation der Rezeptoren vom Kern in das Zytoplasma sein.

PPAR γ ist normalerweise nukleär lokalisiert. Durch Ligandenbindung wird die Lokalisation nicht verändert, lediglich die Transkriptionsaktivität des Rezeptors wird erhöht [88]. Dementsprechend wurde in gesundem Brustgewebe eine nukleäre Expression von PPAR γ (n-PPAR γ) beobachtet [35].

Wie bereits ausgeführt, gibt es verschiedene regulierende Mechanismen, die zu einer Verschiebung von n-PPAR γ in das Zytoplasma führen. Die hier beobachtete inverse Korrelation kann Ausdruck dieser Translokation sein und spricht für eine erhöhte Rate inaktiver PPAR γ (c-PPAR γ) in Mammakarzinomzellen. Studien, die zeigen konnten, dass der Verlust von PPAR γ ein protumorigenes Umfeld schafft [89], sprechen für einen Zusammenhang zwischen PPAR γ -Inaktivierung durch Translokation in das Zytoplasma und Tumorgenese oder -progression. Dies kann auch als Erklärungsansatz für die negativen Ergebnisse klinischer Studien dienen, die versuchten, PPAR γ -Agonisten in die Mammakarzinomtherapie zu integrieren [90, 91].

7.4.3 Nukleäre PPAR γ -Expression und Differenzierungsgrad des Tumors

Gut differenzierte Tumore (G1) zeigen in der vorliegenden Arbeit eine hochsignifikante Korrelation mit hoher nukleärer PPAR γ -Expression, während mäßig

und schlecht differenzierte Tumore (G2/G3) signifikant weniger nukleäre PPAR γ exprimierten.

PPAR γ spielt bei Gewebedifferenzierungen im Rahmen der Embryogenese oder der Laktation eine Rolle. Bei Differenzierungsprozessen von benignem Mammagewebe während Embryonalphase und Laktation von Mäusen wurde eine prominente PPAR γ -Expression beobachtet [92]. Differenzierung führt zu einer hohen PPAR γ -Expression.

Entsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit in gut differenzierten Tumoren (G1) eine höhere n-PPAR γ -Expression nachgewiesen werden als in schlecht differenzierten Tumoren (G2/G3). Eine Abnahme der n-PPAR γ -Expression geht mit ungehemmter Proliferation von undifferenzierten Zellen einher und begünstigt damit das Tumorwachstum. Es konnte gezeigt werden, dass n-PPAR γ -defiziente Mäuse ein dreimal höheres Risiko haben, ein Mammakarzinom zu entwickeln [93].

Eine Aktivierung von n-PPAR γ durch Behandlung mit PPAR γ -Liganden führt bei Mammakarzinomen zu einer veränderten Genexpression im Epithelgewebe. Diese Genexpression beinhaltet Marker des gesunden Brustgewebes, die mit differenzierteren Zellen und niedrigerem Tumorgrading assoziiert sind [86]. Der nukleär exprimierte, aktive PPAR γ unterdrückt Proliferation, unterstützt Differenzierung und induziert Apoptose [94].

Andererseits kann die Abnahme der nukleären PPAR γ -Expression bei mäßig und schlecht differenzierten Tumoren Folge der Rezeptortranslokalisierung vom Kern in das Zytoplasma sein, wie sie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde. Durch die Inaktivierung entfällt die differenzierende Wirkung von n-PPAR γ . Folge kann die Entdifferenzierung der Zellen sein, welche mit einem höheren Grading (G2/G3) assoziiert ist. Unsere Ergebnisse entsprechen bisherigen Studien, die ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen n-PPAR γ -Expression und Tumorgrading feststellen konnten [37, 39, 86, 95].

7.4.4 Zytoplasmatische PPAR γ -Expression und Prognose

Patientinnen, die ein Lokalrezidiv erlitten, weisen signifikant häufiger Tumore mit hoher zytoplasmatischer PPAR γ -Expression auf.

Wie bereits beschrieben, können inaktive, im Zellkern lokalisierte PPAR γ MEK-I-abhängig in das Zytoplasma transportiert werden. Dieser Vorgang findet vor allem während der mitotischen Phasen statt. Dieser MEK-abhängige Export aus dem

Nukleus in das Zytosol reduziert die transkriptionelle Aktivität von PPAR γ und stellt somit eine Downregulation von PPAR γ dar [38]. MAPK-induzierte MEK-abhängige Phosphorylierung stellt einen weiteren Regulationsmechanismus dar, der die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors reduziert [96]. Als Folge nimmt die antiproliferative, differenzierende und Apoptose-induzierende Wirkung von PPAR γ ab.

Hohe n-PPAR γ -Aktivität konnte mit der Repression von Invasivität bei Mammakarzinomen in Zusammenhang gebracht werden [97]. Somit ist die Fähigkeit einer Zelle invasiv zu wachsen und durch dieses Wachstum zum Rezidiv eines invasiven Tumors zu führen durch eine hohe Expression von aktiven PPAR γ (n-PPAR γ) gehemmt. Sinkt die n-PPAR γ -Aktivität (Inaktivierung durch zytoplasmatische Verschiebung = c-PPAR γ), so kann das Lokalrezidivrisiko steigen.

Bereits bei einer moderaten PPAR γ -Aktivität, die durch Inaktivierungsprozesse generiert wird, wurde eine erhöhte Zellproliferation und Tumorgenese beobachtet, während lediglich eine hohe PPAR γ -Aktivität Differenzierung und Apoptose induziert und das Tumorstadium inhibiert [98].

Neben der beschriebenen Aktivitätsminderung durch nukleäre Downregulation, scheint zytoplasmatisches PPAR γ Teil zytoplasmatischer Signalkaskaden zu sein. Es wurde gezeigt, dass zytoplasmatisches PPAR γ regulierend auf die Caveolin-1-Expression wirkt. Caveolin-1 ist ein Protein der Plasmamembran, das Lipide und Proteine bindet und organisiert. Die Regulationsmechanismen sind größtenteils unbekannt, doch konnte eine durch PPAR γ induzierte Geninduktion nachgewiesen werden, welche das Caveolin-Gen als Zielgen von PPAR γ identifiziert. Caveolin wird mit Tumorstadium und Metastasierung in Verbindung gebracht. Es gibt Hinweise darauf, dass PPAR γ und Caveolin-1 Komplexe bilden und Caveolin-1 als Mediator der durch zytoplasmatisches PPAR γ induzierten Zellveränderungen fungiert [99]. In einer Studie zum Prostatakarzinom wurde das metastasierte Karzinom beispielsweise mit einer erhöhten Caveolin-1-Expression assoziiert [100].

Für PPAR γ -positive Tumore wurde ein kürzeres rezidivfreies Überleben gezeigt. Dieses Ergebnis bezieht sich ebenfalls nur auf Tumore mit zytoplasmatischer PPAR γ -Expression. Ähnliche Prozesse können hier ursächlich sein.

Grund für das frühere Auftreten von Rezidiven kann somit die beschriebene Inaktivierung der Rezeptoren durch Translokation vom Nukleus in das Zytoplasma sein. Durch den Wegfall der PPAR γ -vermittelten Repression der Tumorstadium

steigt das Risiko für ein erneutes invasives Wachstum von Zellen und somit für ein Rezidiv [97]. Dementsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen PPAR γ -Expression und dem Auftreten von Lokalrezidiven nachgewiesen werden.

8 Zusammenfassung

Die Bestimmung verschiedener prognostischer und prädiktiver Faktoren ermöglicht eine immer individualisiertere Behandlung von Mammakarzinompatientinnen. Dabei bieten prognostisch relevante Tumormerkmale die Möglichkeit den Verlauf der Erkrankung besser einzuschätzen. Aktuell wird davon ausgegangen, dass verschiedene prognostisch relevante Merkmale, welche auf vier histopathologische Subtypen (Luminal A, Luminal B, Her2, Basal-like) übertragen wurden, unterschiedliche Entitäten des Mammakarzinoms darstellen. Diese Subtypen bilden die Basis für eine differenzierte Therapieplanung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nukleäre Rezeptoren auf ihre prognostische Relevanz hin zu untersuchen.

Die untersuchten Rezeptoren Vitamin D₃-Rezeptor (VDR), Retinoid-X-Rezeptoren alpha (RXR α) und Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor gamma (PPAR γ) sind Transkriptionsfaktoren, die in gesundem und maligne verändertem Brustgewebe unterschiedlich hoch exprimiert werden.

Die Vitamin D₃-vermittelte Wirkung von VDR spielt eine Rolle bei Prozessen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Ohne die Anwesenheit von VDR kommt es zu übermäßigem Wachstum, unzureichender Differenzierung und zu verzögertem Abbau des Gewebes. RXR α agiert als Bindungspartner für andere nukleäre Rezeptoren wie VDR und PPAR γ . Durch die Heterodimerisierung werden Transkriptionsrate und Affinität zur DNA gesteigert. Während Differenzierungsprozessen steigt die Expression von RXR α deutlich an und führt damit zu einer Verstärkung der durch VDR und PPAR γ vermittelten Prozesse. Die Aktivierung von PPAR γ im Zellkern (n-PPAR γ) führt zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen und mindert ihre Malignität. Außerdem vermittelt n-PPAR γ eine apoptose-induzierende und antiproliferative Wirkung. Ligandenabhängig kann PPAR γ aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden (c-PPAR γ), wodurch es zur Inaktivierung des Rezeptors kommt. Der primär nukleäre PPAR γ zeigt somit im inaktiven Zustand eine zytoplasmatische Expression.

Die Rezeptoren wurden durch eine immunhistochemische Färbung nachgewiesen und mittels IRS bewertet. Es wurde die nukleäre Expression von VDR, RXR α und PPAR γ (n-PPAR γ), sowie die zytoplasmatische Expression von PPAR γ (c-PPAR γ) ausgewertet. Wir führten eine Korrelationsanalyse der Rezeptoren untereinander

durch. Anschließend wurde die Expression der Rezeptoren mit prognostisch relevanten Tumormerkmalen korreliert, die aus dem bayerischen Tumorregister stammen. Zusätzlich erhoben wir Überlebensanalysen in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus bezüglich des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens. Unsere Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle, die die untersuchten Rezeptoren auf Zellebene in der Pathogenese des Mammakarzinoms spielen und deuten auf eine prognostische Relevanz dieser Rezeptoren hin.

Unsere Untersuchungen ergeben, dass eine positive Korrelation zwischen VDR-Expression einerseits und niedrigem Grading, kleiner Tumorgöße und pN0-Tumoren besteht. Diese Ergebnisse bestätigen eine geringere Malignität und Aggressivität VDR-positiver Tumore, die sich in der Überlebensanalyse allerdings noch nicht abbilden lässt. Ursächlich ist möglicherweise die komplexe Regulierung des Vitamin D3-VDR-Signalweges, der u.a. durch Mutationen im Rahmen der Tumorgenese gestört sein kann.

Die beobachtete Korrelation zwischen VDR- und RXR α -Expression unterstützt die aus der Literatur bekannte Beobachtung der Heterodimerisierung von RXR α mit anderen Rezeptoren, welche in diesem Fall zur Aktivitätssteigerung der VDR-vermittelten Transkription führt.

Tumore mit nukleärer PPAR γ -Expression sind mit gut differenzierten Tumoren assoziiert. Durch die Translokation des Rezeptors in das Zytosol kommt es zur Downregulation der PPAR γ -vermittelten Wirkung. Entsprechend zeigt die Korrelationsanalyse eine inverse Korrelation von nukleär und zytoplasmatisch exprimierten PPAR γ . Diese komplexen Regulationsmechanismen des PPAR γ stellen einen Erklärungsansatz für die fehlende Wirksamkeit von PPAR γ -Agonisten in Phase-II-Studien zur Mammakarzinomtherapie, als auch für die fehlende Signifikanz der Überlebensanalysen in der vorliegenden Arbeit dar.

Tumore mit zytoplasmatisch exprimierten PPAR γ weisen in unseren Untersuchungen häufiger Lokalrezidive auf und sind mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben assoziiert.

Insgesamt zeigen die untersuchten Rezeptoren eine positive Korrelation zu verschiedenen bereits etablierten prognostischen und prädiktiven Markern. Ihre Eigenschaften bieten gute Voraussetzungen um als neue Prognosefaktoren zu fungieren. Um die prognostische Relevanz von VDR, RXR α und PPAR γ weiter zu untersuchen braucht es differenzierte Studien, die den komplexen zellulären

Abläufen und den unterschiedlichen histopathologischen Subtypen des Mammakarzinoms Rechnung tragen.

9 Literaturverzeichnis

- 1 *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017
- 2 *World Cancer Research Fund International*. Worldwide cancer data - Global cancer statistics for the most common cancers, <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>, (abgerufen am: 15.09.2018)
- 3 *World Health Organization*. Fact sheets - The top ten causes of death, <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, (abgerufen am: 15.09.2018)
- 4 *Brady LW, Fletcher GH, Levitt SH*. Cancer of the breast. The role of radiation therapy after mastectomy. *Cancer* 1977; 39(6): 2868 – 2874
- 5 *Levitt SH*. Primary treatment of early breast cancer with conservation surgery and radiation therapy. The effect of adjuvant chemotherapy. *Cancer* 1985; 55(9): 2140 – 2148
- 6 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Kurzversion 4.1, 2018, AWMF Registernummer: 032-045OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>, (abgerufen am: 15.09.2018)
- 7 *Agrawal A, Grewal M, Sibbering DM, Courtney C*. Surgical and oncological outcome after skin-sparing mastectomy and immediate breast reconstruction. *Clinical breast cancer* 2013; 13(6): 478 – 481
- 8 *Suyoi A, Bains SK, Kothari A et al*. When is a completion axillary lymph node dissection necessary in the presence of a positive sentinel lymph node? *European Journal of Cancer* 2014; 50(4): 690 – 697
- 9 *Giuliano AE, Ballman K, McCall L et al*. Locoregional Recurrence After Sentinel Lymph Node Dissection With or Without Axillary Dissection in Patients With Sentinel Lymph Node Metastases: Long-term Follow-up From the American College of Surgeons Oncology Group (Alliance) ACOSOG Z0011 Randomized Trial. *Annals of surgery* 2016; 264(3): 413 – 420
- 10 *van la Parra, Raquel F. D., Kuerer HM*. Selective elimination of breast cancer surgery in exceptional responders: historical perspective and current trials. *Breast Cancer Res* 2016; 18(1): 460
- 11 *Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e. V. (AGO)*, Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs. Empfehlungen AGO Kommission Mamma 2016, <https://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/april-2016/>, (abgerufen am: 15.09.2018)
- 12 *Kolberg HC, Vetter M, Till M et al*. Entscheidungsfindung beim frühen Mammakarzinom. Teil 2: Prognostische und prädiktive Faktoren als Instrumente zur Entscheidungsfindung. *Frauenarzt* 2016; 57(8): 755 – 760
- 13 *Duffy MJ, Harbeck N, Nap M et al*. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer* 2017; 75: 284 – 298
- 14 *Perou CM, Sørlie T, Eisen MB et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797): 747 – 752
- 15 *Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al*. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100(14): 8418 – 8423
- 16 *Parker JS, Mullins M, Cheang, Maggie C U et al*. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009; 27(8): 1160 – 1167
- 17 *The Cancer Genome Atlas Network*. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012; 490(7418): 61 – 70
- 18 *Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al*. 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 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013; 24(9): 2206 – 2223
- 19 *Parsa Y, Mirmalek SA, Kani FE et al*. A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology. *Electronic physician* 2016; 8(5): 2416 – 2424
- 20 *Luporsi E, André F, Spyrtatos F et al*. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast cancer research and treatment* 2012; 132(3): 895 – 915

- 21 *Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83(6): 835 – 839
- 22 *McGuire WL.* Estrogen receptors in human breast cancer. *The Journal of clinical investigation* 1973; 52(1): 73 – 77
- 23 *Beatson GT.* On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases. *Transactions Medico-Chirurgical Society of Edinburgh* 1896;15:153 – 179
- 24 *W L McGuire.* Endocrine Therapy of Breast Cancer. *Annual Review of Medicine* 1975; 26(1), 353 – 363
- 25 *Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS.* Progesterone receptors as a prognostic factor in Stage II breast cancer. *N Engl J Med* 1983; 309(22): 1343 – 1347
- 26 *Mason BH, Holdaway IM, Mullins PR, Yee LH, Kay RG.* Progesterone and estrogen receptors as prognostic variables in breast cancer. *Cancer Res* 1983; 43(6): 2985 – 2990
- 27 *Howat JM, Harris M, Swindell R, Barnes DM.* The effect of oestrogen and progesterone receptors on recurrence and survival in patients with carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1985; 51(2): 263 – 270
- 28 *Hubay CA, Arafah B, Gordon NH, Guyton SP, Crowe JP.* Hormone receptors. An update and application. *The Surgical clinics of North America* 1984; 64(6): 1155 – 1172
- 29 *Rassow, J.* Biochemie: 67 Tabellen. 3. Aufl., Stuttgart: Thieme, 2012
- 30 *Berg JM.* DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 1989; 57(7): 1065 – 1068
- 31 *Bettoun DJ, Burris TP, Houck KA et al.* Retinoid X receptor is a nonsilent major contributor to vitamin D receptor-mediated transcriptional activation. *Mol. Endocrinol.* 2003; 17(11): 2320 – 2328
- 32 *Friedrich M, Axt-Fliedner R, Villena-Heinsen C, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J.* Analysis of vitamin D-receptor (VDR) and retinoid X-receptor alpha in breast cancer. *Histochem J* 2002; 34(1-2): 35 – 40
- 33 *Gombart AF, Luong QT, Koeffler HP.* Vitamin D compounds: activity against microbes and cancer. *Anticancer Res.* 2006; 26(4A): 2531 – 2542
- 34 *Lopes N, Sousa B, Martins D et al.* Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC cancer* 2010; 10: 483
- 35 *Elstner E, Muller C, Koshizuka K et al.* Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15): 8806 – 8811
- 36 *Wang X, Southard RC, Kilgore MW.* The increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 in human breast cancer is mediated by selective promoter usage. *Cancer research* 2004; 64(16): 5592 – 5596
- 37 *Papadaki I, Mylona E, Giannopoulou I, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L.* PPARgamma expression in breast cancer: clinical value and correlation with ERbeta. *Histopathology* 2005; 46(1): 37 – 42
- 38 *Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Liscovitch M, Seger R.* Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 2007; 27(3): 803 – 817
- 39 *Ditsch N, Vrekoussis T, Lenhard M et al.* Retinoid X receptor alpha (RXRalpha) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression in breast cancer: an immunohistochemical study. *In Vivo* 2012; 26(1): 87 – 92
- 40 *Ditsch N, Mayr D, Lenhard M et al.* Correlation of thyroid hormone, retinoid X, peroxisome proliferator-activated, vitamin D and oestrogen/progesterone receptors in breast carcinoma. *Oncol Lett* 2012; 4(4): 665 – 671
- 41 *Ditsch N, Toth B, Mayr D et al.* The association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 2012; 60(2): 121 – 129
- 42 *Conde I, Paniagua R, Fraile B, Ruiz A, Arenas MI.* Expression of vitamin D3 receptor and retinoid receptors in human breast cancer: identification of potential heterodimeric receptors. *Int J Oncol* 2004; 25(4): 1183 – 1191
- 43 *Mukunyadzi P, Ai L, Portilla D, Barnes EL, Fan C.* Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in salivary duct carcinoma: immunohistochemical analysis of 15 cases. *Mod Pathol* 2003; 16(12): 1218 – 1223
- 44 *Herwig MC, Bergstrom C, Wells JR, Höller T, Grossniklaus HE.* M2/M1 ratio of tumor associated macrophages and PPAR-gamma expression in uveal melanomas with class 1 and class 2 molecular profiles. *Experimental eye research* 2013; 107: 52 – 58

- 45 *Paciello O, Borzacchiello G, Varricchio E, Papparella S.* Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) in canine nasal carcinomas. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007; 54(8): 406 – 410
- 46 *Murphy GJ, Holder JC.* PPAR- γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 2000; 21(12): 469 – 474
- 47 *Kidani Y, Bensinger SJ.* Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunol Rev* 2012; 249(1): 72 – 83
- 48 *Knethen A von, Tzieply N, Jennewein C, Brüne B.* Casein-kinase-II-dependent phosphorylation of PPARgamma provokes CRM1-mediated shuttling of PPARgamma from the nucleus to the cytosol. *Journal of cell science* 2010; 123(Pt 2): 192 – 201
- 49 *Elston CW, Ellis IO.* 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. *C. W. Elston & I. O. Ellis. Histopathology* 1991; 19: 403-410. *Histopathology* 2002; 41(3A): 151-2, discussion 152-3
- 50 *Damjanov I, Fan F.* Cancer grading manual, New York: Springer, 2007
- 51 *Wittekind C, Bootz F, Meyer H.* TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004
- 52 *Uehiro N, Horii R, Iwase T et al.* Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 2014; 21(6): 748 – 753
- 53 *Singletery SE, Allred C, Ashley P et al.* Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(17): 3628 – 3636
- 54 *Santagata S, Thakkar A, Ergonul A et al.* Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *The Journal of clinical investigation* 2014; 124(2): 859 – 870
- 55 *Remmele W, Stegner HE.* Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 1987; 8(3): 138 – 140
- 56 *Bouillon R, Okamura WH, Norman AW.* Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1995; 16(2): 200 – 257
- 57 *Berger U, Wilson P, McClelland RA et al.* Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47(24 Pt 1): 6793 – 6799
- 58 *Eisman JA, Suva LJ, Sher E, Pearce PJ, Funder JW, and Martin, T. J.* Frequency of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Receptor in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 1981; 41(21 Pt 1): 5121 – 5124
- 59 *Michigami T, Suga A, Yamazaki M et al.* Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *The Journal of biological chemistry* 1999; 274(47): 33531 – 33538
- 60 *Gilad LA.* Regulation of vitamin D receptor expression via estrogen-induced activation of the ERK 1/2 signaling pathway in colon and breast cancer cells. *Journal of Endocrinology* 2005; 185(3): 577 – 592
- 61 *Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM et al.* Impact of the Vitamin D3 receptor on growth-regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83(1-5): 85 – 92
- 62 *Kemmis CM, Welsh J.* Mammary epithelial cell transformation is associated with deregulation of the vitamin D pathway. *J. Cell. Biochem.* 2008; 105(4): 980 – 988
- 63 *Zinser GM, Welsh J.* Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed postlactational involution in vitamin D3 receptor null mice. *Mol. Endocrinol.* 2004; 18(9): 2208 – 2223
- 64 *Zinser GM, Suckow M, Welsh J.* Vitamin D receptor (VDR) ablation alters carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland, epidermis and lymphoid tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97(1-2): 153 – 164
- 65 *Zinser G, Packman K, Welsh J.* Vitamin D(3) receptor ablation alters mammary gland morphogenesis. *Development* 2002; 129(13): 3067 – 3076
- 66 *Chung I, Han G, Seshadri M et al.* Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Res* 2009; 69(3): 967 – 975
- 67 *Narvaez CJ, Welsh J.* Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276(12): 9101 – 9107
- 68 *Takaaki F, Reina Y, Hironori T, Toshinaga S, Hiroki M, Soichi, Tsutsumi and Hiroyuki, Kuwano.* Significance of Lymphatic Invasion Combined with Size of Primary Tumor for Predicting Sentinel Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. *Anticancer Res* 2015;(35): 3581 – 3584
- 69 *Norton L, Massagué J.* Is cancer a disease of self-seeding? *Nature medicine* 2006; 12(8): 875 – 878

- 70 Yao S, Ambrosone CB. Associations between vitamin D deficiency and risk of aggressive breast cancer in African-American women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2013; 136: 337 – 341
- 71 Byrne IM, Flanagan L, Tenniswood MP, Welsh J. Identification of a hormone-responsive promoter immediately upstream of exon 1c in the human vitamin D receptor gene. *Endocrinology* 2000; 141(8): 2829 – 2836
- 72 Al-Azhri J, Zhang Y, Bshara W et al. Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. *Clin Cancer Res* 2017; 23(1): 97 – 103
- 73 McCullough ML, Bostick RM, Mayo TL. Vitamin D gene pathway polymorphisms and risk of colorectal, breast, and prostate cancer. *Annu Rev Nutr* 2009; 29: 111 – 132
- 74 Matthews D, LaPorta E, Zinser GM, Narvaez CJ, Welsh J. Genomic vitamin D signaling in breast cancer: Insights from animal models and human cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1-2): 362 – 367
- 75 Keith ME, LaPorta E, Welsh J. Stable expression of human VDR in murine VDR-null cells recapitulates vitamin D mediated anti-cancer signaling. *Molecular carcinogenesis* 2014; 53(4): 286 – 299
- 76 Hussain EA1, Mehta RR, Ray R, Das Gupta TK, Mehta RG. Efficacy and mechanism of action of 1alpha-hydroxy-24-ethyl-cholecalciferol (1alpha[OH]D5) in breast cancer prevention and therapy. - PubMed - NCBI. *Recent Results Cancer Reserch* 2003;(164): 393 – 411
- 77 Trivedi T, Zheng Y, Fournier PG et al. The vitamin D receptor is involved in the regulation of human breast cancer cell growth via a ligand-independent function in cytoplasm. *Oncotarget* 2017; 8: 26687 – 26701
- 78 Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 1992; 355(6359): 446 – 449
- 79 Simicevic J, Schmid AW, Gilardoni PA et al. Absolute quantification of transcription factors during cellular differentiation using multiplexed targeted proteomics. *Nat Methods* 2013; 10(6): 570 – 576
- 80 Yu VC, Delsert C, Andersen B et al. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 1991; 67(6): 1251 – 1266
- 81 Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 2004; 5(7): 419 – 429
- 82 Han S, Roman J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: a novel target for cancer therapeutics? *Anticancer Drugs* 2007; 18(3): 237 – 244
- 83 Crowe DL, Chandraratna, Roshantha A S. A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Res* 2004; 6(5): R546-55
- 84 Suh N, Wang Y, Williams CR et al. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1999; 59(22): 5671 – 5673
- 85 Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1998; 1(3): 465 – 470
- 86 Suzuki T, Hayashi S, Miki Y et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(1): 233 – 250
- 87 Shibuya A, Wada K, Nakajima A et al. Nitration of PPARgamma inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS Lett* 2002; 525(1-3): 43 – 47
- 88 Akiyama TE, Baumann CT, Sakai S, Hager GL, Gonzalez FJ. Selective intranuclear redistribution of PPAR isoforms by RXR alpha. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 2002; 16(4): 707 – 721
- 89 Apostoli AJ, Skelhorne-Gross, Graham E A, Rubino RE et al. Loss of PPARgamma expression in mammary secretory epithelial cells creates a pro-breast tumorigenic environment. *Int J Cancer* 2014;134(5):1055 – 1066
- 90 Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79(3): 391 – 397
- 91 Fenner MH, Elstner E. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands for the treatment of breast cancer. *Expert opinion on investigational drugs* 2005; 14(6): 557 – 568
- 92 Jain S, Pullikuri S, Zhu Y et al. Differential Expression of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) and Its Coactivators Steroid Receptor Coactivator-1 and PPAR-Binding

- Protein PBP in the Brown Fat, Urinary Bladder, Colon, and Breast of the Mouse. *Am J Pathol* 1998; 153(2): 349 – 354
- 93 *Nicol CJ, Yoon M, Ward JM et al.* PPARgamma influences susceptibility to DMBA-induced mammary, ovarian and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25(9): 1747 – 1755
- 94 *Campbell MJ, Carlberg C, Koeffler HP.* A Role for the PPARgamma in Cancer Therapy. *PPAR research* 2008; 2008: 314974
- 95 *Abduljabbar R, Al-Kaabi MM, Negm OH et al.* Prognostic and biological significance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in luminal breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2015; 150(3): 511 – 522
- 96 *Vanden Heuvel, J P.* Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *The Journal of nutrition* 1999; 129(2S Suppl): 575S-580S
- 97 *Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E.* PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast cancer research and treatment* 2003; 79(1): 63 – 74
- 98 *Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Trimboli AJ, Fonteh AN, High KP, Chilton FH.* Magnitude of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation is associated with important and seemingly opposite biological responses i... - PubMed - NCBI. *J Investig Med.* 2001;(49): 413 – 420
- 99 *Burgermeister E, Tencer L, Liscovitch M.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulates caveolin-1 and caveolin-2 expression in human carcinoma cells. *Oncogene* 2003; 22(25): 3888 – 3900
- 100 *Tahir SA, Yang G, Ebara S et al.* Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer research* 2001; 61(10): 3882 – 3885

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zwei-Schritt-Methode mit Primär- und Sekundär-Antikörper	21
Abbildung 2: ABC-Methode mit Avidin-Biotin-Komplex zur Signalverstärkung.....	21
Abbildung 3: Überleben des Gesamtkollektivs (n = 320) in Jahren im untersuchten Zeitraum von 12,5 Jahren; Kum. Überleben = kumulatives Überleben, OS = Overall Survival (Gesamtüberleben).....	26
Abbildung 4: Häufigkeiten der verschiedenen histologischen Subtypen eingeteilt nach NST, invasiv lobulär, invasiv medullär, invasiv muzinös und DCIS.....	28
Abbildung 5: Häufigkeit der Rezeptorexpression in Prozent nach IRS für VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ	37
Abbildung 6: Histologischer Subtyp in Abhängigkeit von VDR-Expression	38
Abbildung 7: VDR-Expression bei invasiv lobulären Karzinomen und Tumoren anderer histologischer Subtypen.....	39
Abbildung 8: VDR-Expression in Abhängigkeit vom Grading	40
Abbildung 9: n-PPAR γ -Expression in Abhängigkeit vom Grading	40
Abbildung 10: VDR-Expression bei G1-Tumoren im Vergleich zu G2/G3 Tumoren.....	40
Abbildung 11: n-PPAR γ -Expression bei G1-Tumoren im Vergleich zu G2/G3 Tumoren	40
Abbildung 12: Tumorgroße in Abhängigkeit von VDR-Expression	41
Abbildung 13: Tumorgroße in Abhängigkeit von RXR α -Expression	41
Abbildung 14: Auftreten von axillären Lymphknotenmetastasen in Abhängigkeit der VDR-Expression	42
Abbildung 15: Auftreten von Lokalrezidiven in Abhängigkeit von c-PPAR γ -Expression.....	43
Abbildung 16: Östrogenrezeptor-Status in Abhängigkeit von VDR-Expression.....	44
Abbildung 17: Östrogenrezeptor-Status in Abhängigkeit von c-PPAR γ -Expression.....	44
Abbildung 18: Überleben in Jahren in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptor-Status, OS = Overall Survival (Gesamtüberleben).....	45
Abbildung 19: Überleben in Jahren in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression (negativ = \leq Median, positiv = $>$ Median), OS = Overall Survival (Gesamtüberleben)	46
Abbildung 20: Rezidivfreies Überleben in Jahren in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression (negativ = \leq Median, positiv = $>$ Median), DFS = Disease Free Survival	47

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histopathologische Entsprechung der verschiedenen Subtypen entsprechend des St Gallen Expert Consensus 2013	11
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 3: Verwendete Reagenzien	16
Tabelle 4: Primärantikörper	16
Tabelle 5: Detektionssysteme	16
Tabelle 6: Sterbefälle im Gesamtkollektiv	26
Tabelle 7: Histo-pathologische Tumormerkmale nach Häufigkeiten	27
Tabelle 8: Im Follow-Up erhobene Tumormerkmale nach Häufigkeiten	27
Tabelle 9: Nottingham Grading Systems, modifiziert nach Elston und Ellis	29
Tabelle 10: Stadieneinteilung nach TNM-Klassifikation	31
Tabelle 11: Häufigkeit und Lokalisation von Fernmetastasen.....	32
Tabelle 12: Häufigkeiten von Hormonrezeptorstatus und Her2neu-Status.....	34
Tabelle 13: Anzahl der ausgewerteten Präparate pro Färbung	34
Tabelle 14: Häufigkeit der Rezeptorexpression nach IRS für VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ ...	36
Tabelle 15: Korrelation der intrazellulären Rezeptoren VDR, RXR α , n-PPAR γ und c-PPAR γ	37

12 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
BET	Brusterhaltende Therapie
BMI	Body-Mass-Index
CD-14	Cluster of Differentiation-14
CK-II	Casein Kinase II
c-PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor, zytoplasmatisch exprimiert
DAB	Diaminobenzidin
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DFS	Disease Free Survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Östrogenrezeptor
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase, Signalprotein der MAP-Kaskade
fab-Fragment	Antigen-bindendes Fragment
fc-Fragment	Fragment crystallizable
FXR	Farnesoid-X Rezeptor
G0-Phase	Ruhephase
G1-Phase	Ergänzungsphase
G 1/2/3	Grading 1/2/3
HER2neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HRE	Hormone Responsive Element
IgG	Immunglobulin G
IRS	Immunreactive Score von Remmele und Stegner
LK	Lymphknoten
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LXR	Liver-X Rezeptor
MAP	Mitogen-activated Protein
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase, Signalprotein der MAP-Kaskade
MEK-I	MAPK/ERK Kinase, Signalprotein der MAP-Kaskade
mRNA	messenger RNA
N-Cor	Nuclear Receptor Co-Repressor
NST	Adenocarcinoma of No Special Type
n-PPAR γ	Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor, nukleär exprimiert
OS	Overall Survival
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated Rezeptor
PPRE	Peroxisome-Proliferator-Response-Element
PR	Progesteronrezeptor

(p)TNM-Klassifikation	(pathologische) Tumor-Node-Metastasis Klassifikation
RAR	Retinoic Acid Rezeptor
RXR	Retinoid-X Rezeptor
Ras	Protoonkogen
S-Phase	Synthesephase
THR	Thyroidhormonrezeptor
uPA/PAI-1	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ und sein Inhibitor
USA	United States of America
VDR	Vitamin D3-Rezeptor
WHO	World Health Organization

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke für das Thema und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe danken, sowie für die fachkundige Unterstützung bei auftretenden Fragen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Nina Ditsch, die mir während der gesamten Zeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und im Rahmen der Ausarbeitung und der Korrektur eine große Hilfe war. Vielen Dank für die kompetente Betreuung.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Immunhistologischen Labors der Frauenklinik Maistraße für die fachliche Hilfe und die ausgezeichnete Betreuung danken, insbesondere Christina Kuhn und Simone Hofmann für die sehr gute Einarbeitung, die professionelle Unterstützung und die herzliche Atmosphäre im Labor.

Des Weiteren möchte ich Dr. Dr. Sabine Heublein für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums und meiner Promotion unterstützte.

Zuletzt möchte ich meiner Biologielehrerin Ingrid Erz für ihre wissenschaftliche Leidenschaft und ihr pädagogisches Engagement, sowie meiner Gastmutter Ina Griffin für ihre Begeisterungsfähigkeit für den Arztberuf danken, durch die ich den Weg zum Medizinstudium gefunden habe.