

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-
Maximilians-Universität München.

Direktor: Prof. Dr. med Klaus Friese

**Immunhistochemische Visualisierung
von
Cathepsin D und Glycodelin
am Mammakarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von

Elisabeth Barthell

aus

Nürnberg

Jahr

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat
Priv. Doz. Dr. Stephan Irler

Mitbetreuung durch den Dr. med. habil. Ioannis Mylonas
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
2.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	7
2.2	Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren	7
2.2.1	Steroidhormonrezeptorstatus	8
2.2.2	Grading	10
2.2.3	Nodalstatus.....	10
2.2.4	Histologische Tumortypen	11
2.3	Tumorbiologie	12
2.3.1	Neue Prognosefaktoren	12
2.3.2	Tumorproteasen	14
2.3.3	Cathepsine und Cathepsin D	15
2.3.3.1	Historisches und biochemische Grundlagen	15
2.3.3.2	verschiedene Isoformen.....	16
2.3.3.3	Synthese.....	16
2.3.3.4	Funktionen und Wirkungen. Bezug zur Onkogenese.....	16
2.3.4	Glycodelin A.....	22
2.3.4.1	Historisches und Biochemische Grundlagen von Glycodelin.....	22
2.3.4.2	Lipocaline.....	22
2.3.4.3	Vorkommen, Stimulierbarkeit und Wirkungen	23
2.3.4.4	Bezug zur Onkogenese	24
3	Fragestellung	27
4	Material und Methoden.....	28
4.1	Tumorpräparate	28
4.1.1	Altersverteilung	28
4.1.2	Menopausenstatus	29
4.1.3	Histologie	29
4.1.4	Differenzierung.....	29
4.1.5	Nodalstatus.....	31
4.1.6	Rezeptorstatus	31
4.2	Immunhistochemie	33

4.2.1	Prinzipielle Durchführung	33
4.2.2	Antikörper	36
4.2.3	Bewertung nach IRS	37
4.3	Photodokumentation	38
4.4	Statistische Auswertung	38
5	Ergebnisse.....	39
5.1	Cathepsin D.....	39
5.1.1	Histologie	39
5.1.2	Grading	40
5.1.3	Nodalstatus.....	41
5.1.4	Steroidhormonrezeptorstatus	42
5.1.5	Fotodokumentation	44
5.2	Glycodelin A.....	46
5.2.1	Monoklonaler Antikörper gegen Glycodelin A	46
5.2.1.1	Histologie.....	46
5.2.1.2	Grading	47
5.2.1.3	Nodalstatus	48
5.2.1.4	Steroidhormonrezeptorstatus	50
5.2.1.5	Fotodokumentation	51
5.2.2	Polyklonaler Antikörper gegen Glycodelin A	53
5.2.2.1	Histologie.....	53
5.2.2.2	Grading	54
5.2.2.3	Nodalstatus	56
5.2.2.4	Steroidhormonrezeptorstatus	57
5.2.2.5	Fotodokumentation	58
6	Diskussion.....	61
6.1	Cathepsin D.....	61
6.2	Glycodelin A.....	64
7	Literaturverzeichnis	67
	Lebenslauf	77
	Danksagung	80

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Expression der Tumorprotease Cathepsin D und des Lipocalins Glycodelin -einem Transportprotein und Marker der endothelialen Differenzierung- an Mammakarzinomen. Es wird geprüft, ob Assoziationen mit der Differenzierung und anderen bekannten Prognosefaktoren bestehen und ob es Unterschiede in der Expression abhängig von der Histologie gibt.

Dies ist unter anderem im Hinblick auf die potentielle Wertigkeit dieser zwei Proteine als Tumormarker interessant.

Es handelt sich um eine retrospektive immunhistochemische Analyse von 121 Tumorpräparaten aus dem Zeitraum von 1991 bis 2001. Die Frauen waren bei Erkrankung im Mittel 62 Jahre alt und zu 85% postmenopausal. 69% waren invasiv duktales, 31% invasiv lobuläre Mammakarzinome, 19,8% G1, 56,3% G2, 30,6% G3 (4 Präparate wurden bezüglich der Differenzierung nicht beurteilt). Es waren 49,6% der Tumore nodalpositiv, 56,2% hormonrezeptorpositiv. Die mit drei verschiedenen Antikörpern (Glycodelin-A, monoklonal und polyklonal sowie Cathepsin-D) nach ABC-Methode gefärbten Präparate wurden gemäß dem Immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner eingeteilt und auf Assoziationen mit bekannten Prognosefaktoren untersucht. Zur statistischen Auswertung wurde das Softwareprogramm SPSS, Version 13 verwendet.

Für Cathepsin fand sich ein signifikant höherer Färbescore bei den invasiv duktales Typen und bei den nodalpositiven Karzinomen. Eine nichtsignifikant stärkere Färbung zeigte sich bei den hormonrezeptornegativen Tumoren.

Für die Glycodelinfärbung mit dem monoklonalen Antikörper war einzig der Unterschied des Färbescores bei den Hormonrezeptoren signifikant. (invasiv duktal>invasiv lobulär), (G3>G1<G2>G3), (N0<N1), (ER/PRpos>ER/PRneg).

Mit dem polyklonalen Antikörper fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten Parameter (invasiv duktal> invasiv lobulär), (G1>G2>G3), (N0<N1), (ER/PR+ > ER/PR-).

Sowohl Cathepsin D als auch Glycodelin werden von Mammakarzinomen exprimiert. Bezüglich Glycodelin gibt es dazu noch wenige Untersuchungen. Bemerkenswert ist die hier gezeigte – und mit Teilen der Literatur übereinstimmende- unterschiedliche Ausprägung für die zwei histologischen Typen. Die Zunahme der Cathepsin D-Expression bei acinärem Be-

fall wurde auch von anderen Autoren gefunden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des Cathepsin D am Abbau der extrazellulären Matrix im Zuge des malignen Geschehens.

Die Glycodelinexpression beim Mammakarzinom scheint unabhängig von der (Ent)differenzierung zu sein. Die Tatsache, dass die Expression von Glycodelin A bei rezeptorpositiven Tumoren stärker ist, legt eine Abhängigkeit der Glykosilierung von Estrogen und/oder Progesteron nahe.

Prinzipiell spricht die großteils fehlende Assoziation der untersuchten Proteine mit bekannten Prognosefaktoren nicht gegen eine Verwendung als solcher.

Cathepsin findet in Gen arrays, zusammen mit anderen Markern bereits Anwendung als Prognoseparameter. Zu Glycodelin stehen Untersuchungen zu Zusammenhängen mit dem Überleben noch aus.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit und in Deutschland. In Deutschland erkranken jährlich über 55.100 Frauen daran. Nach den Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und dem Robert Koch Institut sind 26,8% aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen insgesamt durch das Mammakarzinom bedingt und sogar 40% bei Frauen unter 60 Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren – 7 Jahre weniger als das für bösartige Erkrankungen insgesamt. (Bertz et al. 2006)

Während die Inzidenz seit 1970 in Deutschland stetig ansteigt, sinkt die Mortalität seit Mitte der 1990er Jahre leicht. Seit Einführung des Mammographiescreenings konnte in Bayern eine signifikante Verschiebung zur Diagnose kleinerer Tumoren registriert werden. Diese haben eine bessere Prognose. (Engel 2006)

Im Jahr 2003 wurde in den USA ein deutlicher Abfall der Brustkrebsinzidenz um 7% registriert. Dies betrifft vor allem hormonrezeptorpositive Tumore. Ein Zusammenhang mit der geringeren Verordnung von Östrogenpräparaten postmenopausal wird diskutiert. (Ravdin et al. 2006)

2.2 Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren

Prognose bezeichnet die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder des durch die Erkrankung bedingten Todes (Mortalität).

Prädiktive Faktoren sagen die Wahrscheinlichkeit für das Ansprechen bzw. die Wirksamkeit einer Therapie voraus.

Tumorbiologische Eigenschaften, die darüber unabhängige Aussagen treffen, können zur Individualisierung der Therapie dienen.

Damit ein Prognose- oder prädiktiver Faktor in der klinischen Routine nützlich sein kann muss er nach Mc Guire (McGuire et al. 1990) eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen:

- Es sollte eine biologische Hypothese zu dem Parameter vorliegen.
- Um eine weite Verbreitung zu erfahren, sollte eine einfache, robuste und validierte Labormethode zur Anwendung kommen.
- Eine Zusatzinformation zu den bekannten, traditionellen Risikofaktoren kann ein neuer Marker nur bringen, wenn seine Information anders lautend ist. Er sollte also nicht mit diesen korrelieren.
- Schließlich muss er seine Wertigkeit bzgl. Prognose und Therapieplanung bei Überschreiten eines zu definierenden Schwellenwertes in prospektiven Studien beweisen.

Etablierte und traditionelle Prognosefaktoren sind Alter (hohes Risiko bei Erkrankungsalter unter 35 Jahren), Tumorgröße, Nodalstatus, Hormonrezeptorstatus, grading und histologischer Typ. Diese Faktoren werden routinemäßig bestimmt und fließen in die Therapieplanung mit ein.

Als orientierende Ziffer kann die relative 5-Jahresüberlebensrate insgesamt, d.h. über alle Stadien betrachtet, angegeben werden. Sie beträgt für das Mammakarzinom 79%. (Bertz, Giersiepen et al. 2006)

Beim metastasierten Mammakarzinom liegt die mittlere Überlebenszeit seit 20 Jahren unverändert bei circa 20 Monaten. (Schlesinger-Raab et al. 2005) Es gilt als chronisch verlaufende Erkrankung.

2.2.1 Steroidhormonrezeptorstatus

Der wichtigste prädiktive Faktor ist der Nachweis von Hormonrezeptoren und damit die Vorhersage des Ansprechens auf die endokrine Therapie mit Tamoxifen, Aromatasehemmern oder GnRH-Analoga.

Bei endokrin unempfindlichen Mammakarzinomen wird generell eine adjuvante Chemotherapie empfohlen.

Estrogenrezeptor α (ER α) Expression ist mit besserer Differenzierung und einer besseren Prognose assoziiert. Dies ist wahrscheinlich auch für Estrogenrezeptor β (ER β) der Fall. (Herynk and Fuqua 2004) Auf dem ER α -Gen (ESR1) sind einige „single-nucleotide polymorphisms“ identifiziert, die mit erhöhtem –teils auch erniedrigtem- Brustkrebsrisiko einhergehen. Für das ER β -Gen (ESR2), das auf einem anderen Chromosom liegt, ist dies weniger klar. (Cai et al. 2003)

Gemäß der Arbeit von Harvey et al (Harvey et al. 1999) gilt beim immunhistochemischen Nachweis von Hormonrezeptoren bereits ein schwacher Nachweis bei 1% der Zellen für Östrogenrezeptor (ER) und/oder Progesteronrezeptor (PR) als positiv. In seiner Arbeit mit 1982 Mammakarzinompräparaten waren 71% rezeptorpositiv.

Nach Kaufmann (Kaufmann et al. 2005) gibt es keine eindeutige Definition, wann bei positivem Rezeptornachweis der Tumor tatsächlich hormonempfindlich und wann er nur fraglich empfindlich ist. Entsprechend der Konsensuskonferenz St. Gallen 2005 und 2007 wird ein Brustkrebstumor dann als positiv für Steroidhormonrezeptoren bezeichnet, wenn mehr als 10% der Zellen im immunhistochemischen oder quantitativen Nachweis Rezeptoren für Estrogen oder Progesteron exprimieren. Darunter gilt er als „unsicher“ bezüglich der endokrinen Empfindlichkeit, aber auch dann, wenn er für Progesteronrezeptoren alleine negativ ist oder HER2neu oder UPA/PAI1 überexprimiert oder eine große Anzahl von regionären Lymphknoten befallen ist. (Goldhirsch et al. 2005)

Die Abwesenheit von Progesteronrezeptoren (aber auch die Überexpression von Progesteronrezeptor A) ist assoziiert mit schlechterem Ansprechen auf Tamoxifen, sowohl in der adjuvanten als auch in der metastasierten Situation. Das Ansprechen auf Aromatasehemmer ist dagegen hiervon nicht beeinträchtigt. Als Erklärung nimmt man derzeit an, dass dieses Fehlen des Progesteronrezeptors ein Surrogatmarker für eine Störung in der Signaltransduktion des Estrogenrezeptors ist und es einen „cross talk“ mit Wachstumsrezeptor Thyrosinkinasepathways gibt. (Osborne et al. 2005)

Da Steroide lipophil und damit membrangängig sind, befinden sich diese Rezeptoren meist intrazellulär oder sogar im Zellkern, wo sie die Transkription von bestimmten Proteinen induzieren. Sowohl α - als auch β -Estrogenrezeptoren fungieren als Transkriptionsfaktoren mit wahrscheinlich unterschiedlichen physiologischen Funktionen. Erstere werden eher von Endometrium, Mammatumorzellen und Stroma der Ovarien exprimiert. Der 1996 entdeckte β -Rezeptor (Kuiper et al. 1996) findet sich dagegen eher in Granulosazellen, Spermatozyden, Nieren, Darmmucosa, Lunge, Knochen und Knochenmark sowie Gehirn, Endothelzellen und Prostata. Beide besitzen zum Teil große biochemische Homologien und bilden - auch untereinander- Dimere. Estradiol bindet gleich gut an beide Rezeptortypen. Selektive Estrogen-Rezeptor Modulatoren (SERM) tun dies unterschiedlich. Zusätzlich existieren noch diverse Koaktivatoren und Korepres-

soren, die in den Gewebearten verschieden verteilt sind. Auch diese werden von SERMs in unterschiedlichem Ausmaß angesprochen. Je nach Ligand ändert sich die Konformation des Rezeptors unterschiedlich und es werden dadurch die koregulatorischen Proteine unterschiedlich aktiviert.

Das Vorhandensein von ER α ist unabdingbar für die Entwicklung und Differenzierung der Brustdrüse.

Estrogen selbst verursacht bzw. beschleunigt die Entstehung von Brustkrebs wahrscheinlich einerseits durch seine Mitogenität (Erhöhung des Risikos für Replikationsfehler und Mutationen) und andererseits durch die Produktion genotoxischer Nebenprodukte im Rahmen seines Metabolismus. (Deroo and Korach 2006)

2.2.2 Grading

Frauen über 35 Jahre mit kleinen (T1) G1 Tumoren, die gleichzeitig auch nodalnegativ sind und deren Tumor keine vaskuläre Invasion zeigt sowie HER-2/ neu nicht überexprimiert, gelten nach der St. Gallen-Konsensuskonferenz 2005 als Niedrigrisikogruppe.

Bei einer mittel- oder hochgradigen Entdifferenzierung (G2 oder G3) wird das Risiko als mittelgradig oder bei Vorliegen zusätzlicher Kriterien (Lymphknotenbefall) als hoch eingestuft

Allerdings sind 30 – 60% aller Tumoren G2-Tumoren, also von intermediärer Differenzierung und entsprechendem Risiko. (Sotiriou et al. 2006) In solchen Fällen könnten zusätzliche Parameter zur Differenzierung und Planung der Aggressivität der adjuvanten Therapie nützlich sein.

2.2.3 Nodalstatus

Der Nodalstatus ist von den etablierten Prognosefaktoren derjenige mit der größten Bedeutung. Patientinnen mit Befall von mehr als drei Lymphnoten sowie solche mit rezeptornegativen Tumoren gelten nach der St. Gallen Konsensuskonferenz 2005 als Hochrisikogruppe. (Kaufmann, Jonat et al. 2005) Insbesondere bei Lymphknotenbefall sollte eine Chemothera-

pie über sechs Monate appliziert werden. In diesem Fall werden zunehmend Taxanhaltige Schemata ausgewählt. (Kaufmann, Jonat et al. 2005)

Inzwischen hat das Sentinel-node-Konzept einen festen Stellenwert im Rahmen des axillären Stagings erlangt.

Die Invasion der regionären Lymphknoten ist ein Zeichen für die Aggressivität des Tumors. Trotzdem erleiden auch 20-30% aller nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen ein Rezidiv oder eine Metastasierung. (Spyratos et al. 1989), (www.adjuvantonline.com 2006)

2.2.4 Histologische Tumortypen

Beim invasiven Mammakarzinom handelt es sich zu 65-80% um den duktaalen Typ, der dann als solcher diagnostiziert wird, wenn keine andere Kategorie angewandt werden kann.

In 6-15% wird ein lobulärer Typ diagnostiziert – charakterisiert durch Kleinzelligkeit, diffus infiltrierendes Wachstum und begleitende Desmoplasie (Bindegewebsproliferation).

Prognostisch verhalten sich die beiden Typen gleich.

Des Weiteren kommen folgende seltenere und prognostisch günstigere Karzinome vor: das medulläre Karzinom mit einem Anteil von 3%, das hochdifferenzierte tubuläre Karzinom (1-15%, je nach Interpretation der WHO-Klassifikation), das muzinöse (1-2%) und das papilläre Karzinom (1-7%). Die letzteren drei haben eine Fünfjahres- Überlebensrate von 95%. (Bässler 1997), (Lebeau 2003)

Der Oxford Level of Evidence (LoE) ist für den histologischen Typ als Prognosefaktor aber nur 4. (Bässler 1997), (Thomssen et al. 2003)

2.3 Tumorbiologie

Um Mammakarzinompatientinnen eine besser individualisierte Therapie anbieten zu können, versucht man weitere Eigenschaften des Tumors und seiner Fähigkeit der Invasion und Metastasierung zu analysieren. Aggressivere Tumoren böten dann eine Indikation für eine zytostatische Therapie. Umgekehrt könnten Patientinnen mit weniger aggressiven Tumoren diese nebenwirkungsreiche Behandlung erspart werden. Ideal ist es, wenn sich aus dem Nachweis eines bestimmten Faktors eine gezielte Therapiemöglichkeit ableitet.

2.3.1 Neue Prognosefaktoren

Die sogenannten neuen Prognosefaktoren spielen noch keine Rolle in der praktischen Therapieplanung. Dazu zählen:

Der Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu, Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin Like Growth Factor (IGF)1, IGF2, die Bestimmung der Proliferationsrate durch den Mitose-Index, die S-Phase-Fraktion, der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 mit dem Antikörper MIB-1 oder mit Hilfe des Thymidin Labeling Index (TLI).

Des Weiteren das Zellzyklusprotein Cyclin E, PCNA, pS2, TSP, Invasionsfaktoren bzw. Proteolysesysteme wie Cathepsin D,B und L, uPA und sein Inhibitor PAI-1, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Ep-CAM, CD-44-codierte Glykoproteine, E-Cadherin, Lamininrezeptor, Angiogenesefaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), Apoptosefaktoren wie TNF, FasL, TRAIL, bcl-2, bax, Onkogene und Tumorsuppressorgene wie p53, c-myc, BRCA 1 und BRCA 2 sowie der immunhistologische Tumorzellnachweis in Knochenmark und Lymphknoten. (Janni et al. 2005)

Mikrometastasen im Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnose erwiesen sich in einer gepoolten Analyse an 4703 Patientinnen im Vergleich zu traditionellen Prognosefaktoren neben dem Nodalstatus als einziger signifikanter Prognosefaktor bezüglich dem Gesamtüberleben. (Braun et al. 2005). Die Methodik zum Nachweis der disseminierten Zellen ist bis jetzt jedoch nicht standardisiert und die Gewinnung mit Knochenmarksaspiration relativ aufwändig. Derzeit wird in einer deutschen Multicenterstudie zur adjuvanten Mammakarzinomtherapie (SUCCESS-Studie) der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Blut mit untersucht. Dabei geht es um den

prädiktiven Wert bezüglich des Therapieansprechens und die Identifizierung genetischer Polymorphismen und ihrer Assoziation mit Therapieansprechen und Toxizität. (Janni et al. 2006)

In den letzten Jahren wurden –als Beispiel translationaler Forschung– mehrere prospektive Studien zum prognostischen und prädiktiven Wert von Genexpressionsprofilen veröffentlicht. (van de Vijver et al. 2002), (Thuerigen et al. 2006), (Paik et al. 2004). Mit den RNA-microarray Methoden konnten gute prädiktive Werte bezüglich Zehnjahresüberleben bei jungen Brustkrebspatientinnen im Stadium I oder II, bezüglich Lokalrezidivrate und Gesamtüberleben bei nodalnegativen, rezeptorpositiven Patientinnen sowie für die Rate an pathologischer Komplettremission bei neoadjuvanter Chemotherapie gezeigt werden.

Außerdem wurden mehr Patientinnen der low risk- Gruppe zugeordnet als nach St-Gallen oder National-Institute-of-Health-Kriterien. (40 vs 15 vs 7%). Die nach gene profile als Niedrig-Risiko-Gruppe eingestuften Frauen bzw. Tumoren hatten zusätzlich eine bessere Prognose. (gerundet 20 versus 50% Fernmetastasierung + Mortalität im 8-Jahres-follow up) Diese Methode könnte also auch das Potential haben, Übertherapie zu vermeiden.

Das gene-profiling wird an schockgefrorenem Tumorgewebe durchgeführt und kann zehntausende Gene mit quantitativer Auswertung umfassen. In den erwähnten Untersuchungen wurden um 70 Gene für die Bestimmung der sogenannten Gensignatur ausgewählt.

Solche microarrays sind inzwischen auch kommerziell erhältlich (MammaPrint™)

Auf der 9. internationalen Konsensuskonferenz in St. Gallen 2005 wurde erstmals die HER2/neu-Überexpression für das nodalnegative Karzinom als prognostischer Faktor anerkannt – und nicht nur als prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer Therapie mit Herceptin (Trastuzumab). Außerdem wurde neu auch das Vorhandensein einer Gefäßinvasion bei nodalnegativen Tumoren Risiko erhöhend wie Lymphknotenbefall gewertet.

Andere von den oben genannten Faktoren wurden vom Expertenpanel nicht für ausreichend etabliert gehalten um in die Risikoeinstufung einer Patientin mit Mammakarzinom mit einbezogen zu werden.

Dies gilt auch noch nicht für den Biomarker Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp uPA und seinen Inhibitor PAI-1. Obwohl für diese Faktoren Studien entsprechend Oxford LoE 1 vorliegen, stehen noch die Zehnjahres-Überlebensdaten prospektiver Studien aus. Sie könnten nützlich sein, um das individuelle Risiko von nodalnegativen Patientinnen und solchen mit intermediärem Grading zu spezifizieren und das Ansprechen auf Chemotherapie vorauszusagen. Nodalnegative Patientinnen ohne Überexpression dieser Tumorproteasen haben wenig oder keinen benefit von einer zytostatischen Therapie. Dieser ist deutlich größer bei Überexpression. Dafür profitieren diese Frauen wenig von einer Hormontherapie. (Look et al. 2002). Genannte Marker können mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISAs bestimmt werden.

Cyclin E beschleunigt den Übergang von der G1 zur S-Phase und führt zu chromosomaler Instabilität. Zu diesem Zellzyklusprotein existiert eine retrospektive Studie, die bei einer mit Western blot nachgewiesenen Überexpression eine 5-Jahresüberlebensrate unter 30% versus über 95% bei niedriger Konzentration zeigte. Dieser Parameter ist aber aufgrund der Methodik sowie fehlender prospektiver Daten ebenfalls noch nicht reif für den klinischen Einsatz außerhalb von Studien. Außerdem brachten immunhistochemische Untersuchungen andere Ergebnisse. (Keyomarsi et al. 2002).

Die Proliferationsrate – und damit die angenommene Aggressivität des Tumors – korreliert mit der Menge des von kultiviertem Tumorfrischgewebe aufgenommenen radioaktiven Thymidin. In prospektiven Studien wurde der Wert des Thymidin-Labeling Index (TLI) als prognostischer Marker für das krankheitsfreie Fünf- bzw. Achtjahresüberleben sowie als prädiktiver Marker bezüglich des Ansprechens auf CMF und FEC gezeigt. (Paradiso et al. 2001), (Silvestrini et al. 1995), (Volpi et al. 2000)

2.3.2 Tumorproteasen

Zur Gewebsinvasion und Metastasierung müssen Tumorzellen nach Ablösung die Basalmembran überwinden, nach Invasion in Blut- und Lymphgefäße an entferntem Gewebe adhärent werden, dort in Parenchym penetrieren und wieder proliferieren. Dies und die Bildung des Primärtumors über 2 mm Größe ist entscheidend mit der Fähigkeit zur Neoangiogenese verbunden. Die anderen Schritte beruhen zum Teil auf der Wirkung ver-

schiedener Tumorproteasen (oder -proteinasen). Zunächst kommt es zu einem durch Oberflächenrezeptoren vermittelten Kontakt zwischen Tumorzelle und Basalmembran. Dann lösen proteolytische Enzyme aus der Tumor- oder der Wirtszelle extrazelluläre Matrix, Basalmembranen – eine Matrix aus Kollagen, Glykoproteinen und Proteoglykanen- und Bindegewebe auf. Dazu tragen extrazellulär sezernierte Matrix-Metalloproteinasen wie MMP-1 und MMP-9 oder Serinproteinasen wie t-Plasminogenaktivator bei, aber auch die Cystein- und Aspartatproteasen Cathepsin B, L und D. Die Proteasen haben jeweils Inhibitoren als Gegenspieler und können je nach den entsprechenden Konzentrationsverhältnissen wirken. Dieses Gleichgewicht wird auch durch Zytokine beeinflusst. (Loeffler et al. 2006)

Ein interessanter indirekter therapeutischer Aspekt zur Minderung bzw. Umgehung von Anthrazyklintoxizität ist, dass versucht wird sogenannte prodrugs einzusetzen, die durch ebendiese proteolytische Aktivität in Tumornähe aktiviert werden. (Kruger and Wojnowski 2006)

2.3.3 Cathepsine und Cathepsin D

2.3.3.1 Historisches und biochemische Grundlagen

Cathepsine (von griechisch: „verdauen“) wurden 1936 von Max Bergmann als einer der ersten in der Zeitschrift „science“ beschrieben. Dieser war als jüdischer Wissenschaftler zunächst in Dresden und ab 1933 an der Rockefeller University in New York tätig.

Die ersten Beschreibungen von Cathepsinen beziehen sich auf Kalbsthymus und Rindermilz.

Es handelt sich um lysosomale Proteasen, die im dort herrschenden sauren pH-Milieu (pH 4,8, Cathepsin D bis pH 6,2 in vitro) aktiviert werden. (Capony et al. 1987; Nomura and Katunuma 2005) Einige Cathepsine, die auch sezerniert werden können, sind jedoch auch bei neutralem pH-Wert aktiv. Lysosomen sind die im Golgiapparat produzierten Verdauungsorganellen der Zellen. Außer Proteasen finden sich dort u.a. auch Lipasen, Nucleasen und Carbohydrasen. Die Enzyme selbst werden im Zytosol und im endoplasmatischen Reticulum produziert und dann in den Lysosomen akkumuliert. Lysosomen verdauen phagozytierte Makromoleküle oder auch verbrauchte Reste der Zellstrukturen selbst wie z.B. Rezeptoren, sind auch bei der Reparatur von Zellmembranen beteiligt und spielen eine Rolle bei der Apoptose. Fehlfunktionen der digestiven Enzyme können den

Zellmetabolismus stören und verschiedene Speicherkrankheiten verursachen.

Die lysosomale Ausstattung mit Proteasen und Cathepsinen variiert je nach Gewebeart.

2.3.3.2 verschiedene Isoformen

Inzwischen sind 12 Cathepsinformen aus tierischen und menschlichen Zellen identifiziert. In pflanzlichen Zellen scheinen sie eine geringere Bedeutung zu haben.

Sie gehören mit ihren jeweils eigenen Spezifitäten, Substraten und Inhibitoren zu verschiedenen Gruppen und „Klanen“.

Cathepsin B, C, H, F, K, L, O, S, V und W sind Cystein-Proteinasen. Cathepsin A und G gehören zur Gruppe der Serin-Proteinasen. Hingegen bezeichnet man Cathepsin D und E – wie unter anderen auch Pepsin, Renin und eine HIV-1-Proteinase – als Aspartatproteinase, weil sie im aktiven Zentrum 2 Asparaginsäurereste besitzen. (de Duve 1983)

2.3.3.3 Synthese

Cathepsin D wird im endoplasmatischen Retikulum als Proenzym synthetisiert. Dies ist dem Pepsinogen genetisch verwandt. Es wird über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und andere unbekannte Rezeptoren in Lysosomen – aber auch in Krebszellen und Fibroblasten – endozytotisch aufgenommen. Im sauren Milieu wird unter anderen der die Substratbindungsstelle blockierende Proteinrest abgespalten. Interessanterweise sind daran auch Cathepsin B und L beteiligt. (Wille et al. 2004) Außerdem folgt noch eine Glykosylierung. (Loeffler, Petrides et al. 2006) (Liaudet-Coopman et al. 2006)

Sein Gen liegt auf dem äußeren Ende von Chromosom 11p. (Faust et al. 1985).

2.3.3.4 Funktionen und Wirkungen. Bezug zur Onkogenese

Die Funktionen und Wirkungen der Cathepsine sind multipel:

Cathepsin B scheint eine protektive Rolle bei Morbus Alzheimer zu spielen, nämlich bei der Spaltung der amyloiden Plaques A β . Auch Cathepsin D

wird diesbezüglich diskutiert. (Hook et al. 2005; Mueller-Steiner et al. 2006; Riemenschneider et al. 2006).

Cathepsin L hat eine spezifische Funktion bei der Antigenpräsentation in Thymuszellen. (Nakagawa et al. 1998)

Cathepsin D wurde kürzlich auch im menschlichen Schweiß nachgewiesen und scheint dort die Immunabwehr der Haut zu modulieren. (Baechle et al. 2006)

Mäuse, die durch Gen-knock-out kein Cathepsin D bilden, sterben nach 3-4 Wochen unterernährt und bewegungsarm mit Atrophie der Ileummuco-sa, intestinaler Nekrose sowie apoptotischer Gewebszerstörung des Thy-mus und der Milz bei T- und B-Zell-Mangel. Die Lysosomenfunktion war unbeeinträchtigt. Auch die Retina wird atrophisch. Die Interpretation ist eine Cathepsin-D-Defizienz-induzierte Apoptose. Bei Cathepsin B oder -L knock out trat dies nicht auf. (Saftig et al. 1995; Koike et al. 2003)

Es ist sowohl die Verhinderung der Apoptose unter physiologischen Um-ständen als auch deren Induktion z.B. nach oxidativem Streß oder unter Einfluß von Zytostatika, beschrieben. Dabei wird Cathepsin zusammen mit seinem Transkriptionsfaktor p53 in das Zytosol abgegeben. (Kagedal et al. 2001; Roberg et al. 2002; Johansson et al. 2003; Liaudet-Coopman, Beaujouin et al. 2006)

Ein Inhibitor für Cathepsin D ist bei Säugetieren nicht bekannt.

Insbesondere Cathepsin D, B und L sind in Zusammenhang mit Progres-sion und Metastasierung von Karzinomen gebracht worden. (Koblinski et al. 2000; Liaudet-Coopman, Beaujouin et al. 2006, Joyce, 2004)

Bei maligne transformierten Zellen sind diese normalerweise intrazellulä-ren Proteinase auch membranständig in aktivierter Form nachweisbar. (Loeffler, Petrides et al. 2006) Um maligne Tumore herum herrscht nor-malerweise ein etwas saurerer pH-Wert als physiologisch. (Griffiths 1991) Dies ist allerdings nicht die einzige Erklärung für ihre extrazelluläre Wirk-samkeit. (s.u.)

Cathepsine zeigen eine erhöhte Expression bei verschiedenen Krebsarten. Magen-, Prostata- und Brustkrebs sind in diesem Zusammenhang erwäh-nenswert und zwar insbesondere die aggressiveren Tumore. (Nomura and Katunuma 2005). Cystein-Proteasen sind auch bei HPV-16 induzierten Zervixkarzinomen hochreguliert. (Joyce et al. 2004)

Procathepsin D wurde in Bezug auf Brustkrebs zuerst als von MCF-7 Zellen sezerniertes 52 kDa großes, durch Estrogen stimulierbares Glykoprotein beschrieben. Es gibt zusätzlich eine intermediäre Form (M_r 48 kDa) und reife Formen (M_r 34 und 14 kDa).

Man fand es in erhöhten Konzentrationen auch bei proliferativen und zystischen Mastopathien (Capony, Morisset et al. 1987; Rochefort et al. 1987). Auch nachfolgende Publikationen aus derselben Gruppe zeigen an Brustkrebszelllinien, dass die Cathepsin-D-Expression durch Estrogene und Wachstumsfaktoren reguliert wird. (Capony et al. 1989; Cavailles et al. 1989; Rochefort et al. 1989)

Exogene Gabe von Procathepsin-D zu einer Brustkrebszelllinie bewirkt mitogene Aktivität. Diese kann durch spezifische Antikörper gegen das Propeptid gehemmt werden, aber nicht durch Hemmung der proteolytischen Aktivität. Die Expression des Propetides wird in manchen Brustkrebszelllinien durch Estrogene stimuliert. (Fusek and Vetvicka 1994)

Durch Transfektion mit humaner Cathepsin-D cDNA lässt sich das metastatische Potential von Tumorzellen bei Nacktmäusen erhöhen. (Garcia et al. 1996)

Auch andere berichten, dass für die mitogene Wirkung die proteolytische Aktivität nicht notwendig ist. Es scheint sich eher um einen extrazellulären, evtl. rezeptorvermittelten Mechanismus zu handeln. Der Rezeptor selbst ist noch nicht identifiziert. (Glondou et al. 2001; Beaujouin et al. 2006; Liaudet-Coopman, Beaujouin et al. 2006) Für diese Interaktion wurde der Mannose-6-Phosphat/IGF2-Rezeptor vorgeschlagen. (Vetvicka et al. 1997; Vetvicka et al. 2000) Es wird vermutet, dass Cathepsin-D intrazellulär die Sezernierung von wachstumshemmenden Proteinen hemmt. In der Zellkultur verhindert es den dichteabhängigen Stopp des Zellwachstums. (Liaudet et al. 1995) Es könnte auch sein, dass Cathepsin-D die Aufnahme von Wachstumsfaktoren aus dem Extrazellularraum erleichtert. (Briozzo et al. 1991)

In Brustkrebszelllinien verhindert Cathepsin-D die *Tumorzellapoptose*. Unter zytotoxischem Einfluß scheint es die Apoptose aber – unabhängig von seiner katalytischen Aktivität- zu stimulieren. Evtl. sind hier mehrere verschiedene Mechanismen involviert. (Berchem et al. 2002; Liaudet-Coopman, Beaujouin et al. 2006)

Allerdings scheint Cathepsin D auch ein entscheidender *parakriner Faktor für endotheliale und fibroblastische Zellen* zu sein. Die unmittelbare Stromaumgebung spielt bei der Tumorgenese eine aktive Rolle. Es gibt hier einen regen Austausch von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen wie uPA oder Matrixmetalloproteinasen. (Liaudet-Coopman, Beaujouin et al. 2006)

In vitro stimuliert Cathepsin D auch die *Angiogenese* und hemmt die Tumorzellapoptose. (Berchem, Glondu et al. 2002) Ersteres ließ sich auch immunhistochemisch an 102 Mammakarzinompräparaten bestätigen. (Gonzalez-Vela et al. 1999) Andererseits gibt es auch Berichte über die Stimulierung von Angiostatin beim Prostatakarzinom (weit weniger stark beim Mammakarzinom) und über eine bestimmte Spaltung von Prolactin, also Hemmung der Angiogenese. (Morikawa et al. 2000; Tsukuba et al. 2000; Piwnica et al. 2004)

Cathepsin-D und Procathepsin-D lassen sich auch im Serum nachweisen. Bei 18 von 30 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs war dies der Fall und in keinem Fall bei karzinomfreien Patientinnen. (Brouillet et al. 1997)

Seit den 1990er Jahren haben Studien immer wieder ein schlechteres Überleben bei hohen Cathepsin D-Spiegeln gezeigt. Nachfolgend sind einige Beispiele aufgeführt:

- Bei 331 Brustkrebspatientinnen hatten diejenigen mit hohen Cath-D-Spiegeln im Tumorzytosol ein signifikant kürzeres krankheitsfreies und Gesamtüberleben. Dies war in der estrogenrezeptor-negativen Gruppe nicht signifikant. (Duffy et al. 1992)
- Pujol, Maudelonde et al verfolgten prospektiv 123 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom über 5 Jahre. Im Tumorzytosol immunoenzymatisch bestimmte Cathepsin D-Konzentrationen korrelierten nur mit dem Lymphknotenstatus. Hohe Cath D-Spiegel, negativer Progesteronrezeptorstatus und Lymphknotenbeteiligung waren die wichtigsten signifikanten prognostischen Faktoren. (Pujol et al. 1993)
- über median 4 Jahre zeigte sich bei 2810 Brustkrebspatientinnen, in deren Tumorzytosol erhöhte Cathepsin-D-Konzentrationen bestimmt wurden, eine schlechtere Prognose. (Foekens et al. 1999)

- im Falle einer hohen Cathepsin-D-Konzentration im Tumorzytosol (größer 60 pmol/mg Protein) ergab sich bei 138 Frauen mit 5 Jahren Beobachtungszeit ein signifikant höheres Risiko für frühe Rezidive oder Metastasierung (früher als 3 Jahre). Bei nodalnegativen Patientinnen gilt dies auch für die gesamte und krankheitsfreie 5-Jahres-Überlebensrate. (Scorilas et al. 1999)
- Harbeck et al untersuchten in einer multivariaten Analyse prospektiv ein Kollektiv von 276 Patientinnen mit Brustkrebs und median 109 Monaten Nachbeobachtungszeit. Neben bekannten Faktoren suchten sie nach dem prognostischen und prädiktiven Werten von uPA und PAI-1 sowie der Cathepsine B,D und L . Dabei wurden die Konzentrationen immunhistochemisch am Primärtumorgewebe bestimmt. Cathepsin-L war bei nodalpositiven Patientinnen der einzige signifikante Faktor für krankheitsfreies und Gesamtüberleben. Bei nodalnegativen Frauen waren die wichtigsten prognostischen und prädiktiven Faktoren PAI-1 und das grading. Für das Gesamtkollektiv waren nur Lymphknotenstatus, grading, PAI-1 und Cathepsin-L statistisch signifikant. (Harbeck et al. 2001)
 In einer anderen Veröffentlichung beziehen sich dieselben Autoren auf die Untersuchung der Cathepsine im Tumorzytosol und von uPA und PAI-1 in Extrakten von Auswaschungen der Tumorpräparate. Die Untersuchung bezieht sich auf die gleiche Patientinnenzahl und Nachbeobachtungszeit wie die vorgenannte.
 Hierbei ergeben sich ähnliche Ergebnisse. Aber in der Subgruppe der nodalnegativen Patientinnen zeigt sich, dass solche mit sowohl niedrigen PAI-1 als auch niedrigen Cathepsin D-Konzentrationen nur 3,2% Rezidiv-oder Metastasierungsrate („relapse“) hatten im Vergleich zu 39% bei hohen Spiegeln. (Harbeck et al. 2000)
- Bei 1033 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom, die über median 52 Monate nachverfolgt wurden, waren hohe Cath D-Spiegel im Tumorzytosol (>59 pmol/mg Protein) mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert –sowohl in der gesamten Gruppe als auch bei Lymphknotenbefall. (Rodriguez et al. 2005)

Die meisten Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Nachweis von Cathepsin D im Tumorzytosol. Dies ist aber eine relativ aufwändige Methode, die bei kleinen Tumoren in der klinischen Praxis nicht immer gut zur Anwendung kommen kann.

Im NSABP B20 trial wurden rezeptor-positive, nodal-negative Mammakarzinompatientinnen zusätzlich zur Tamoxifen-Therapie zu einer Chemotherapie randomisiert. Es wurde ein „recurrence score“ (RS) aus 21 Genen, u.a. in der Untergruppe Invasion CTSL2, das für Cathepsin L2 kodierende Gen, und MMP11, das für Stromolysin kodierende Gen, bestimmt. Der score konnte statistisch signifikant die Wahrscheinlichkeit von Metastasierung und benefit einer Chemotherapie vorhersagen. (Paik, Shak et al. 2004; Paik et al. 2006)

2.3.4 Glycodelin A

2.3.4.1 Historisches und Biochemische Grundlagen von Glycodelin

Das 28 kDalton große, homodimere Glykoprotein gehört zur Familie der Lipocaline. Es hat einen Kohlenhydratgehalt von 17,5% und existiert abhängig von der Art seiner Glykosylierung mit Oligosacchariden in unterschiedlichen Isoformen, nämlich Glycodelin A (Gd A) und dem im Seminalplasma gefundenen Glycodelin S.

Die Glykosylierung mit komplexen Glycanstrukturen (fucosylierten LacdiNAc) ist für Säugetiere ungewöhnlich.

Glycodelin-A wurde vermeintlich zuerst in der Plazenta nachgewiesen. Daher rührt auch ein früherer Name, nämlich placental protein 14 (PP14). Allerdings stellte sich später heraus, dass das Glykoprotein eigentlich von kontaminierender Dezidua stammte. Andere Namen waren placentares α 2-Mikroglobulin, α -uterines Protein, Progesteron-abhängiges endometriales Protein, schwangerschaftsassoziertes endometriales α 2-Globulin (α 2-PEG) und humanes β -Lactoglobulin Homolog.

Die Aminosäuresequenz wurde bereits 1988 aufgeklärt. (Julkunen et al. 1988) Damit wurde die Gleichartigkeit der oben genannten Substanzen nachgewiesen.

2.3.4.2 Lipocaline

Die Proteinfamilie der Lipocaline umfasst eine große Gruppe von extrazellulären Proteinen, die Moleküle binden und in die Zelle transportieren. Sie kommen ubiquitär in Lebewesen vor und sind in eine Reihe wichtiger physiologischer Prozesse eingebunden. Sie sind tassenförmig gebaut und können in dieser Sekundärstruktur über eine Ligandenbindungsstelle hydrophobe Substanzen aufnehmen, mit einer Art Deckel verschließen und werden nach Andocken an spezifische Rezeptorproteine mit Hilfe von Endozytose in die Zellen aufgenommen. Lipocaline sind mit rund 180 Aminosäuren verhältnismäßig klein. Die Aminosäuresequenz ist ihnen bei relativ großer Variabilität an zumindest einer, meist an 3 Arealen gemeinsam. Sie bilden Komplexe zusammen mit löslichen Makromolekülen. Es handelt sich bei den Lipocalinen aber nicht nur um bloße Transport-

proteine, sondern es ist eine breite Palette von Funktionen nachgewiesen. Diese reicht vom Retinol- und Pheromontransport über eine Rolle in der Prostaglandinsynthese und der Regulation der Zellhomöostase bis zur Modulation von Immunreaktionen, der Funktion des Geruchssinnes und bei der Pigmentierung bei wirbellosen Tieren. (Flower 1996) Der Genlocus befindet sich auf Chromosom 9q34. (Van Cong et al. 1991)

2.3.4.3 Vorkommen, Stimulierbarkeit und Wirkungen

Glycodelin A wird vom Endometrium in der Sekretions- bzw. späten Lutealphase sezerniert (Mylonas et al. 2000), beginnend 4-5 Tage nach der Ovulation und zunehmend bis zum 10. Tag postovulatorisch (Brown et al. 2000), und von Dezidua im ersten Schwangerschaftstrimester progesteronabhängig in hoher Konzentration. Die maximalen Konzentrationen werden zwischen 10-18 Schwangerschaftswochen erreicht. (Bell et al. 1986) Bei Patientinnen mit Abortus imminens fand man signifikant niedrigere Serumspiegel als bei unbeeinträchtigter Schwangerschaft. (Tomczak et al. 1996)

Es gibt Hinweise, dass auch Estradiol einen stimulierenden Effekt auf die Glycodelinsekretion hat, evtl. aber im Sinne eines „priming“ bzw. der Differenzierung der Endometriumzellen und Hochregulierung der Progesteronrezeptoren. (Seppala et al. 2002) Unter Einnahme und nach Absetzen des Antiöstrogens Clomiphen fanden sich erniedrigte Serum-Glycodelinspiegel. (Fazolebas et al. 1991) In einer anderen Arbeit waren die Glycodelinspiegel allerdings unter Tamoxifengabe erhöht (und bei gleichzeitiger Gabe von Mifepriston- einem selektiven Progesteronrezeptormodulator und zumindest in vivo hauptsächlich Gestagenantagonisten – erniedrigt. (Swahn et al. 1993))

Entsprechend seiner Sekretion aus Endometrium wurde Glycodelin A auch bei Endometriosepatientinnen – abhängig von der Invasivität der Herde – in erhöhter Konzentration in Peritonealflüssigkeit und Plasma nachgewiesen. (Koninckx et al. 1992)

Auch kontrazeptive Eigenschaften werden diesem Protein zugesprochen: Es hemmt dosisabhängig die Bindung von Spermien an die Zona pellucida der Eizellen. Dieser Effekt könnte auch eine Rolle bei der Infertilität von Endometriosepatientinnen spielen. (Oehninger et al. 1995) Mittzyklisch, im „fertilen Fenster“, lässt sich Glycodelin A tatsächlich intrauterin nicht nachweisen. Induzierung von verstärkter Glycodelinexpression durch lo-

kale oder systemische Progesterongabe vermindert deutlich die Befruchtungsfähigkeit von Spermien

Außerdem konnte Glycodelin in Brust- und Ovarialgewebe, im Eileiter, in den Samenbläschen des Mannes sowie im Seminalplasma, im Knochenmark und in ekkrinen Drüsen nachgewiesen werden. (Seppala, Taylor et al. 2002).

β -Lactoglobulin (Blg), ein zu Gd nahe verwandtes Protein, wird in der Milch von Säugetieren, speziell Rindern, sezerniert. (Flower 1996)

Glycodelin gehört auch zu den Akut-Phase Proteinen. Diese steigen in einer komplexen physiologischen Reaktion auf Stress und inflammatorische Reize im Serum an.

Bereits 1994 wurden seine immunsuppressiven Eigenschaften an hämatopoetischen Zellen demonstriert. (Morrow et al. 1994). Es unterdrückt auch die Aktivität natürlicher Killerzellen und T-Zell-Aktivität. (Okamoto et al. 1991). Glycodelin A – nicht GdS- induziert die Apoptose aktivierter T-Zellen. (Mukhopadhyay et al. 2004) Dies könnte auch an der fetomaternalen Grenzzone einen natürlichen Sinn erfüllen, indem es die Abstoßung des Embryos als semipaternales Allograft behindert oder verhindert. (Seppala, Taylor et al. 2002)

Analysen von Genexpressionsprofilen mit Nachweis interferoninduzierbarer Gene bei 40% der Mammakarzinome lieferten Hinweise darauf, dass die Immunantwort sowohl bei Brustkrebs als auch beim Ovarialkarzinom einen kontrollierenden Einfluss auf Progression und Metastasierung zeigt. Die Autoren sehen darin einen Hinweis auf entweder eine immunologische Rolle oder sogar auf eine virale Ursache bei der Tumorgenese. Der Nachweis infiltrierender T-Zellen korreliert mit besserem Gesamtüberleben und progressionsfreiem Intervall bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen. (Zhang et al. 2003; Einav et al. 2005)

In vitro wird Glycodelin als Marker der endothelialen Differenzierung von Endometrium benutzt. (Arnold et al. 2001)

2.3.4.4 Bezug zur Onkogenese

Bei Versuchen an einer Brustkrebszelllinie induzierte die Transfektion von Glycodelin-cDNA (complementary DNA ohne introns) eine Hochregulation von Markern der epithelialen Differenzierung wie Zytokeratinen und E-

Cadherin (ein Membranprotein, dass auf der Zelloberfläche mit anderen Proteinen in Wechselwirkung tritt und somit Zell-Zellkontakt herstellt) sowie einer veränderten intrazellulären Verteilung von β -Catenin (lat. catena, die Kette; Verbindungsprotein zwischen Zelladhäsionsmolekülen wie Cadherin und dem Zellzytoskelett; gleichzeitig intrazelluläres Signalmolekül und Komponente eines Transkriptionsfaktors; erhöht bei manchen Tumoren (Loeffler, Petrides et al. 2006)). Außerdem sah man auch morphologisch eine stärkere Ausdifferenzierung, eine verringerte Proliferation und vermehrte Apoptose. (Kamarainen et al. 1997)

2003 fanden Jeschke et al andererseits, dass Gd A aus Fruchtwasser und aus mütterlichem Serum in vitro E-Selectin vermittelte Zelladhäsion inhibiert. Dieser Mechanismus könnte auch eine Rolle bei der Karzinogenese und bezüglich der Fähigkeit der Metastasierung von Tumorzellen spielen. (Jeschke et al. 2003)

An Mammakarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen ließ sich sowohl mit in situ Hybridisierung als auch immunhistochemisch eine stärkere Glycodelin-A-Expression zeigen als an solchen mit axillärem Lymphknotenbefall. Duktale carcinoma in situ-Tumoren der Mamma wiesen sogar in 100% eine Expression auf. (Jeschke et al. 2005), (Shabani et al. 2005)

Bischof et al beschreiben andererseits signifikant erhöhte Glycodelin-A-Konzentrationen bei Ovarialkarzinomen bzw. deren Zystenflüssigkeit im Vergleich mit benignen Zysten. Das gleiche ergab sich in dieser Untersuchung für die Serumwerte derselben Patientinnen. (Bischof et al. 2005) Riittinen hatte 1992 solche Unterschiede bei einer ähnlichen Arbeit an Zystenflüssigkeiten nicht gefunden. (Riittinen 1992)

In einer retrospektiven Untersuchung an 460 serösen Ovarialkarzinomen gelang der immunhistochemische Nachweis im Zytosol der Tumorzellen in 79% der G1-Tumore und signifikant weniger häufig in nur 51% der G3-Tumore. Das Oberflächenepithel normaler postmenopausaler Ovarien war in 4 von 5 Fällen negativ für Glycodelinfärbung. Glycodelin wurde also häufiger bei gut differenzierten Karzinomen und auch häufiger in Tumoren früher Stadien exprimiert. Zusätzlich korrelierte das Vorhandensein der Glycodelinexpression –unabhängig vom Stadium- auch mit einem längeren progressionsfreien Intervall und einer längeren 5-Jahresüberlebensrate, bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen auch der 10-Jahresüberlebensrate. Allerdings war dies nicht konsistent in allen Tu-

moren und keine unabhängige Variable. Unter Paclitaxel-Therapie fand sich hier auch kein Unterschied mehr. (Mandelin et al. 2003)

Sowohl an normalem, als auch an dysplastischem und malignem plattenepitheliale Gewebe der Cervix uteri ließ sich zum Teil eine starke Glycodelinexpression nachweisen. (Connor et al. 2000)

Es liegen also widersprüchliche Ergebnisse zur Frage vor, ob Glycodelin eine Rolle bei der Karzinogenese und Metastasierung von Brustkrebs und anderen Malignomen spielt.

3 Fragestellung

In vorliegender Arbeit sollte die Expression von Glycodelin A und Cathepsin D im Mammakarzinom immunhistochemisch an Paraffinschnitten untersucht werden.

Es wird geprüft, ob Assoziationen mit bekannten Prognosefaktoren bestehen und ob es Unterschiede in der Expression abhängig von der Histologie gibt.

Zur Expression von Glycodelin beim Mammakarzinom liegen erst wenige Arbeiten vor. Erste in vitro Untersuchungen an Mammakarzinomzelllinien zeigten, dass Glycodelin die Differenzierung dieser Zellen beeinflusst. Obwohl gezeigt wurde, dass fortgeschrittenere Brustkrebstumore niedrigere Glycodelin messenger-RNA-Konzentrationen aufweisen, ist noch unbekannt, ob die Expression von diesem Glykoprotein hier auch- wie beim Ovarialkarzinom gezeigt- mit der Differenzierung (grading) assoziiert ist.

Zusätzlich zu diesem immunsuppressiven und eher an der Tumorentstehung beteiligten Antigen wird mit Cathepsin D eine Protease untersucht, die eine Rolle bei der Metastasierung und Angiogenese spielt. Hierbei wird postuliert, dass Cathepsin D bei der Lyse der extrazellulären Matrix und der zellulären Umgebung und somit der Fähigkeit zur Invasion losgelöster Zellen des Primärtumors eine Rolle spielt. Hierzu gibt es zwar zahlreiche Arbeiten mit Messungen der Cathepsin-D Konzentrationen im Tumorzytosol, aber widersprüchliche Ergebnisse in älteren immunhistochemischen Untersuchungen.

4 Material und Methoden

4.1 Tumorpräparate

In der Universitätsfrauenklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München existiert ein Tumorarchiv mit allen Paraffinblöcken der dort bis zum Jahr 2002 von Gynäkopathologen oder Gynäkologen mit pathologischer Zusatzausbildung befundeten Karzinome.

Für die vorliegende Untersuchung wurden im Jahr 2004 aus diesem Archiv 121 Präparate von Patientinnen herausgesucht, die in einem Zehnjahreszeitraum 1991 bis 2001 an einem Mammakarzinom operiert wurden. Erst ab 1991 wurde gepuffertes Formalin zur Fixierung verwendet. Davor wäre eine immunhistochemische Bestimmung schwierig gewesen.

Um ein möglichst homogenes Kollektiv zu erreichen, wurden nur duktale und lobuläre Tumoren ohne Beschreibung von in situ - Anteilen eingeschlossen.

4.1.1 Altersverteilung

Ursprünglich sollten aus demselben Grund wie oben möglichst postmenopausale Frauen aufgenommen werden. Es wurden Präparate von Frauen \geq 50 Jahren herangezogen, mangels Anzahl aber dann doch auch 16 Tumorblöcke von Patientinnen zwischen 45 und 49 Jahren ausgewertet.

Das Durchschnittsalter ist 62,2 Jahre (45-84 Jahre), der Median 61 Jahre (25% Quartile 54,5 Jahre, 75% Quartile 69,5 Jahre), (Tabelle 1)

Altersverteilung	
N	121
Mittelwert	62,17
Minimum	45
Maximum	84
Standardabweichung	9,794

Tabelle 1: Altersverteilung der Patientinnen mit Mammakarzinom insgesamt

4.1.2 Menopausenstatus

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, ist also die überwiegende Anzahl (mindestens 85%) der Patientinnen postmenopausal.

Ex post wurde teilweise anhand der Pathologiescheine, teilweise anhand der Originalakten der Menopausenstatus der Patientinnen eruiert. Bei 4 Patientinnen, die alle unter 55 Jahre alt sind, waren die Akten nicht mehr auffindbar, so dass der Menopausenstatus nicht geklärt werden konnte.

Menopausenstatus	Anzahl	Prozent
postmenopausal	103	85,1
praemenopausal	14	11,6
fehlend	4	3,3
gesamt	121	100,0

Tabelle 2: Menopausenstatus

4.1.3 Histologie

Die vorliegende Untersuchung konzentriert sich auf die beiden häufigsten Tumortypen, nämlich das invasiv duktales und das invasiv lobuläre Mammakarzinom. 83 (69%) der untersuchten Präparate sind vom duktales Typ, die übrigen (38 Präparate = 31%) invasiv lobulär.

4.1.4 Differenzierung

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei den in die Untersuchung einbezogenen Patientinnen war es in der I. Unifrauenklinik München nicht üblich, lobuläre Mammakarzinome bezüglich ihrer Differenzierung zu beurteilen. Da die Expression von Glycodelin A und Cathepsin D jedoch u.a. auch mit dem Grading aller Karzinome korreliert werden sollte, wurden die Präparate der lobulären Karzinome nachträglich durch einen Gynäköpathologen (N. Shabani) bezüglich dieses Kriteriums beurteilt. Dabei mußten 4 der betroffenen 39 Präparate aus technischen Gründen unberücksichtigt bleiben. („GX“).(Abbildung 1)

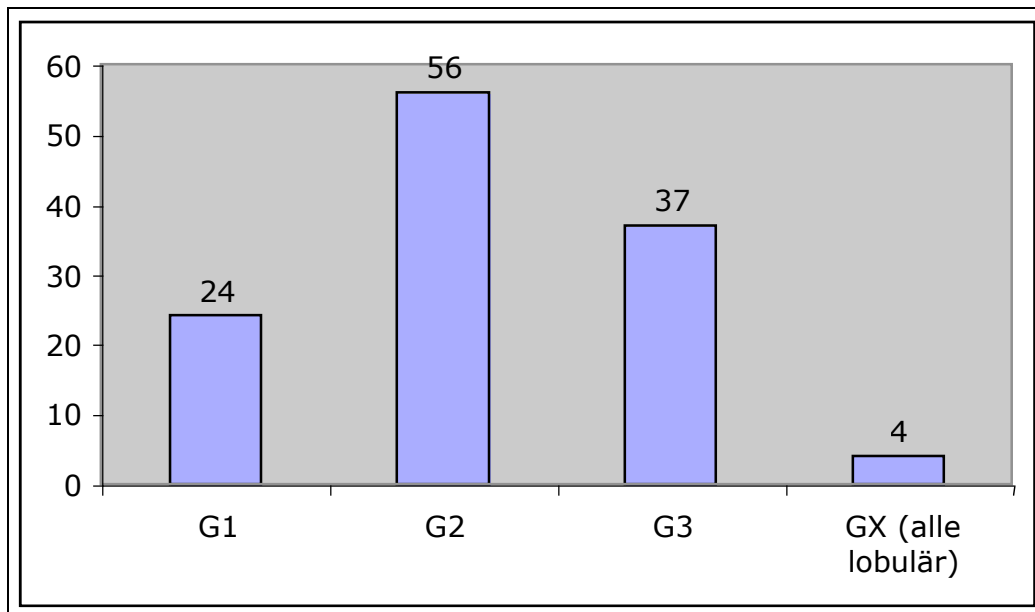


Abbildung 1: Grading aller untersuchter Tumorpräparate

	lobulär (n/%)		duktal (n/%)		gesamt (n/%)	
G1	15	39,5%	9	10,8%	24	19,8%
G2	16	42,1%	40	48,2%	56	46,3%
G3	3	3,6%	34	41,0%	37	30,6%
GX	4	10,5%	0		4	3,3%

Tabelle 3: Verteilung des gradings je nach Histologie

Bei den duktaalen Karzinomen sind relativ gesehen mehr Tumore schlecht differenziert (G3).

(

	lobulär (n/%)		duktal (n/%)		gesamt (n/%)	
G1	15	39,5%	9	10,8%	24	19,8%
G2	16	42,1%	40	48,2%	56	46,3%
G3	3	3,6%	34	41,0%	37	30,6%
GX	4	10,5%	0		4	3,3%

Tabelle 3). Dieser Unterschied ist im χ^2 -Quadrat-Test statistisch signifikant.

4.1.5 Nodalstatus

Tumoren mit und ohne regionalen Lymphknotenbefall sind im untersuchten Kollektiv fast paritätisch verteilt und zwischen den zwei histologischen Tumortypen nicht signifikant unterschiedlich häufig. (siehe Abbildung 2; asympt. Signifikanz im χ^2 -Test: 0,797)

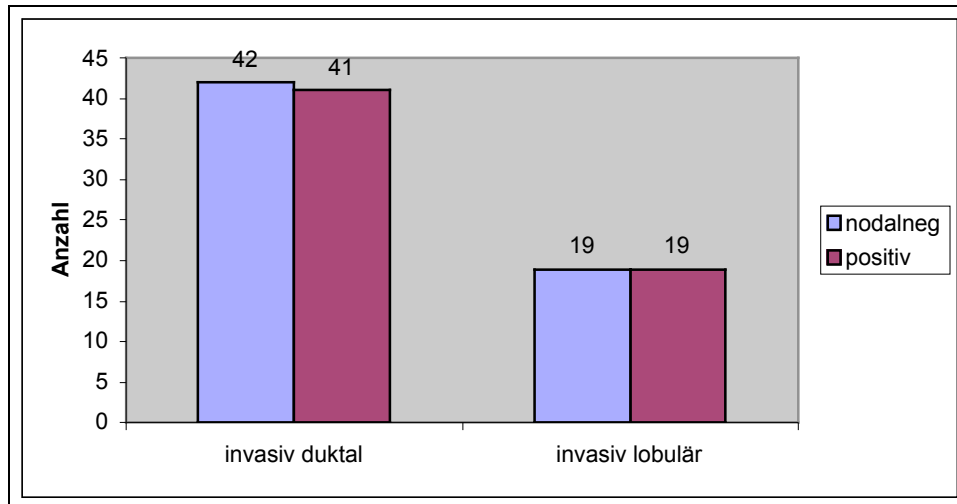


Abbildung 2: Nodalstatus je nach Histologie, asymptotische Signifikanz im χ^2 -Test: 0,797

4.1.6 Rezeptorstatus

Die Bestimmung der Hormonrezeptoren erfolgte immunhistochemisch im gynäkopathologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Innenstadt der LMU – wie auch die gesamte histologische Beurteilung. „Rezeptornegativ oder –positiv“ bedeutet für die vorliegenden Tumore immer entweder negativ oder positiv für sowohl Östrogen- als auch Progesteronrezeptor. Die Einstufung in „positiv“ und „negativ“ erfolgte qualitativ ohne dokumentiertes score-System.

43,8 % der Karzinome dieser Untersuchungsreihe sind hormonrezeptornegativ und 56,2% hormonrezeptorpositiv. (Abbildung 3). Zwischen den histologischen Tumortypen findet sich hierfür kein signifikanter Unterschied.

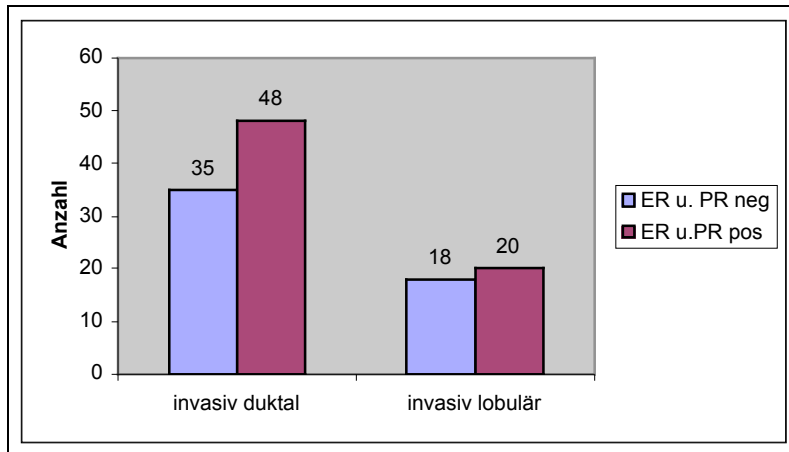


Abbildung 3: Rezeptorstatus je nach Histologie; asymptotische Signifikanz im x2-Test: 0,452

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Prinzipielle Durchführung

Die hier beschriebenen immunhistochemischen Färbungen wurden von medizinisch technischen Assistentinnen durchgeführt (Christina Kuhn und Susanne Kunze). Es wurde mit der sogenannten „ABC-Methode“ gearbeitet. „ABC“ steht für **A**vidin-**B**iotin-**C**omplex. Dieses Verfahren ist in der Universitätsfrauenklinik Innenstadt der Ludwig-Maximilian-Universität München etabliert und in der Literatur beschrieben. (Noll and Schaub-Kuhnen 2000)

Vorbereitung der Schnitte:

Von den Paraffinblöcken mit dem formalinfixierten, eingebetteten Tumorgewebe werden mit dem Schlittenmikrotom 2-3µm dicke Gewebeschnitte gewonnen und auf speziell für die Immunhistochemie beschichtete („silanisierter“) Objektträger („Superfrost Plus“ der Firma Langenbrinck, Tettingen, Dtl.), aufgezogen.

Zur Anfärbung der in Tabelle 4 genannten Antikörper wurde das Detektionssystem „Vectastain Elite mouseIgG-Kit“ der Firma Vector Laboratories, Inc, 30 Ingold Road, Burlingame, CA, USA verwendet.

Entparaffinieren:

Zunächst wird das Gewebe durch eine 15 minütige Inkubation in Xylol und anschließende zweimalige Inkubation in hundertprozentigem Alkohol entparaffiniert.

Um die endogene Peroxidase des zu färbenden Gewebes zu inaktivieren, werden die Schnitte 20 Minuten in dreiprozentigem Wasserstoffperoxyd (H₂O₂) in Methanol aufbewahrt.

Dies ist notwendig, weil die immunhistochemische Färbung mit dem hier verwendeten Avidin-Biotin-Komplex („ABC“-kit) auf der Reaktion mit an einen Brückenantikörper gebundener Peroxidase und dem Chromogen 3,3-Diaminobenzidin beruht. Endogene Peroxidase findet sich hauptsächlich in Granulozyten, Histozyten und Erythrozyten. Nach erfolgreicher Inaktivierung der gewebständigen Peroxidase sollen Erythrozyten also farblos

erscheinen.

Hitzeinduzierte Antigendemaskierung:

Sodann folgt die Aufhebung der durch Formalin verursachten Aldehydvernetzung der Proteine durch Erhitzen der Schnitte in Citrat (2%iger Na-Citratpuffer aus Na-Citrat und Citronensäure, pH6).

Dies erfolgt für 5 Minuten bei kochender Pufferlösung in einem Dampfkochtopf. Die Abkühlung mit Leitungswasser muss vorsichtig geschehen, damit das Gewebe gut auf den Objektträgern haften bleibt. Bei einem der Präparate kam es zum sogenannten „Abschwimmen“ (vgl. Absatz 4.2.3) Die Objektträger werden dann mit Aqua destilata (Aqua dest.) gespült und 2 mal für 2 Minuten in Phosphate Buffered Saline (PBS, isotonische Lösung aus Natriumchlorid, Natriumphosphat und Kaliumphosphat, pH auf 7,4 eingestellt) gewaschen.

Inkubation mit Blockierungsserum:

Um hydrophobe Bindungen der später verwendeten Markierungs-Immunglobuline an Membranen oder Fettgewebe -und damit eine unspezifische Anfärbung des zu untersuchenden Gewebes- zu verhindern, sollen elektrostatische Ladungen mit -in diesem Fall muralem (lat. mus = die Maus) oder rabbit- Serum abgesättigt werden.

Dazu werden die Objektträger für 20 Minuten mit einer Lösung aus 3 Tropfen Blockierungsserum von der Maus auf 10ml steriles PBS beträufelt und vollständig damit abgedeckt.

Inkubation mit dem Primärantikörper:

Nachdem die o.g. Lösung abgeschüttet wurde, werden die Objektträger mit dem jeweiligen Primärantikörper entweder über Nacht bei 4°C (Anti-Glycodelin monoklonal) oder für 60 Minuten (Anti-Glycodelin polyklonal und Anti-Cathepsin-D) inkubiert. Siehe hierzu auch Tabelle 4. Die verwendete Verdünnung war 1:800 in DAKO-Verdünnungsmedium für den polyklonalen Glycodelin-Antikörper und 1:2000 für den monoklonalen Glycodelin-Antikörper. Dies entspricht in beiden Fällen einer Endkonzentration von 2µg/ml. Der Cathepsin-D-Antikörper wurde 1:60 in PBS verdünnt. Dies entspricht einer Endkonzentration von 1µg/ml - für den Cathepsin-D-Antikörper.

Inkubation mit dem Sekundärantikörper:

Zur farbigen Detektierung des Primärantikörpers wird ein sogenannter Brückenantikörper eingesetzt. Dieser ist biotinyliert, das heißt mit Biotin markiert. Letzteres ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin B₇,

C₁₀H₁₆N₂O₃S) und lässt sich gut an Immunglobuline koppeln. Die ABC-Methode basiert auf dessen Affinität zu Avidin. Dieses ist ein aus Hühner-eiweiß gewonnenes tetrameres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 64 kiloDalton (kDa). Genauer gesagt, wird ein gentechnisch gewonnenes, reineres Produkt namens Streptavidin verwendet.

An diesen Komplex ist das Enzym Peroxidase (40kDa) gebunden. Peroxidase wird aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen. Zusammen mit dem Chromogen 3,3 Diaminobenzidin (DAB) und H₂O₂ als Katalysator bildet sich ein farbiges (braunes) Endprodukt.

Vom Sekundärantikörper – Anti-mouse für Glycodelin mono und Cathepsin D (Vectastain Elite mouse-IgG-kit; Firma Vector laboratories, Peterborough, UK) bzw. Anti-rabbit für Glycodelin poly (Vectastain Elite rabbit-IgG-kit)- wird ein Tropfen mit 3 Tropfen Normalserum und 10ml DAKO-Verdünnungsmedium bzw. PBS vermischt. Die Präparate werden 30 Minuten damit inkubiert. und anschließend wieder 2 mal 2 Minuten mit PBS gewaschen.

Inkubation mit dem ABC-Komplex:

4 Tropfen Avidin-Reagenz werden mit mit 4 Tropfen Biotin-Reagenz (beide Firma DAKO) und 10ml sterilem PBS versetzt und 30 min ruhen gelassen. Sodann werden die Objektträger 30min damit inkubiert und wiederum 2X2 Minuten mit PBS gewaschen.

Substratfärbung mit dem Chromogen:

2 Tropfen Pufferkonzentrat + 2 Tropfen DAB Chromogen („Dyna Chrome“) der Firma Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA werden mit 2ml Aqua dest verdünnt. Diese Lösung wird für 8-10 min auf den Objektträgern belassen.

Danach wird wieder 2X2 min mit Aqua dest gewaschen.

Gegenfärbung:

Mit saurem Hämalaun nach Mayer (pH 4,5), einem basischen Farbstofflack in saurer Lösung, werden die Zellkerne blau gefärbt. Positiv geladene basische Farbstoffe lagern sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS an. Dies erfolgt für 2 min und wird anschließend mit Leitungswasser ausgewaschen.

Nachbehandlung/Entwässerung:

Um die Schnitte haltbar zu machen, werden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%igem, 96%igem und absolutem Ethanol entwässert und danach mit Eukitt luftdicht eingeschlossen.

4.2.2 Antikörper

Als Primärantikörper zum Nachweis der Cathepsin-D-Expression wurde ein kommerziell erhältlicher Mausantikörper verwendet.

Zum immunhistochemischen Nachweis für Glycodelin-A wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet.

Ein polyklonaler Antikörper erkennt die Glycodelin-Aminosäuresequenz.

Der monoklonale Antikörper erkennt die umgebende Glykanstruktur.

Die Herkunft und Konzentration ist aus Tabelle 4 ersichtlich. Jeschke et al beschreiben die Herstellung des monoklonalen Antikörpers in (Jeschke et al. 2006)

Antigen	Klon	Isotyp	Konzentration	Herkunft
Cathepsin D	C5	Maus IgG	1µg/ml	Dianova
Glycodelin-A polyklonal	UCI-2	Kaninchen IgG	2µg/ml	Bioscience AG
Glycodelin-A monoklonal	A87-B/D2	Maus IgG	2µg/ml	Bioscience AG

Tabelle 4: Antikörper für Immunhistochemie

4.2.3 Bewertung nach IRS

Sowohl für die Bewertung der Cathepsin D- als auch der Glycodelin A-Expression kam der semiquantitative immunreaktive score (IRS) zur Anwendung. (Remmele and Stegner 1987)

Er bewertet getrennt die Intensität und Verteilung der immunhistochemischen Färbung:

Bei der Intensität steht

- „0“ für „keine erkennbare Färbung“,
- 1= schwach,
- 2= mäßig und
- 3= stark gefärbt.

Hier wird jeweils die maximale Intensität herangezogen – auch wenn sie nur auf einzelne Zellen zutrifft.

Die Verteilung der Färbung wird in Prozentsätzen angegeben:

- 0= keine Färbung,
- 1= $\leq 10\%$ der Zellen angefärbt,
- 2= 11-50%,
- 3= 51-80%,
- 4= $>80\%$.

Die beiden Werte werden multipliziert und ergeben einen score von 0-12.

Für die Cathepsin-D-Färbung konnte in einem Fall die Bewertung aus technischen Gründen nicht erfolgen. (Das Gewebe war artifiziell verändert, im Jargon „abgeschwommen“). Es handelt sich um eines von 10 Präparaten aus der Gruppe von invasiv duktalem, nodal negativen G3 Tumoren.

In die Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Präparate wurde die Autorin unter anderem von einem Gynäkopathologen eingewiesen. Die Beurteilungsergebnisse wurden stichprobenartig (ca. ein Viertel der Präparate) von dem ebenfalls darin erfahrenen biochemischen Laborleiter (PD

Dr. Jeschke) überprüft. Es mussten nur geringfügig Korrekturen vorgenommen werden.

4.3 Photodokumentation

Die immunhistochemischen Schnitte wurden mit einem Mikroskop der Firma Leitz (Wetzlar, Deutschland) bei 10- bzw. 25-facher Vergrößerung betrachtet.

Die Digitalisierung erfolgte über das C-Mount-Gerät 3-CCD der Firma JVC (Friedberg, Dtl.) und die „Color Video Camera KY F 55 B“ derselben Firma.

Das „Computer System Discus 4.25.3.“ diente zur Betrachtung und Auswertung der Färbung nach IRS (s.o.) nach Weißabgleich am Bildschirm.

4.4 Statistische Auswertung

Die Datensammlung und statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes SPSS („Statistical Package for the Social Sciences“ oder auch „Superior Performance Software System“) für PC, Version 13.0 (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, Chicago, Illinois 60606, USA) durchgeführt.

Da es sich um ein nicht exakt normalverteiltes Kollektiv handelt, kam für Tests mit 2 unabhängigen Variablen der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Bei 3 oder mehr Variablen (Auswertung nach grading oder für Vergleiche von Untergruppen mit kombinierten Variablen) wurde der Kruskal-Wallis-H-test genutzt. $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Korrelationen wurden nach Spearman-Rho berechnet.

In Kreuztabellen wurde die Signifikanz von Unterschieden qualitativer Größen mit dem χ^2 -Test geprüft. Es gilt das gleiche Signifikanzniveau wie oben.

Für nicht normalverteilte Variablen bzw. Ergebnisse wird auch jeweils ein Boxplot mit Darstellung von Median, 25- und 75% Quartilen sowie Extremfällen abgebildet.

5 Ergebnisse

5.1 Cathepsin D

5.1.1 Histologie

Bei den duktaalen Karzinomen fand sich ein signifikant höherer Färbescore.

Histologie		N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard-abweichung
invasiv duktal	Cathepsin IRS	82	1	12	7,12	2,598
invasiv lobulär	Cathepsin IRS	38	1	12	5,74	2,892

Tabelle 5: Cathepsin D, IRS abhängig von der Histologie

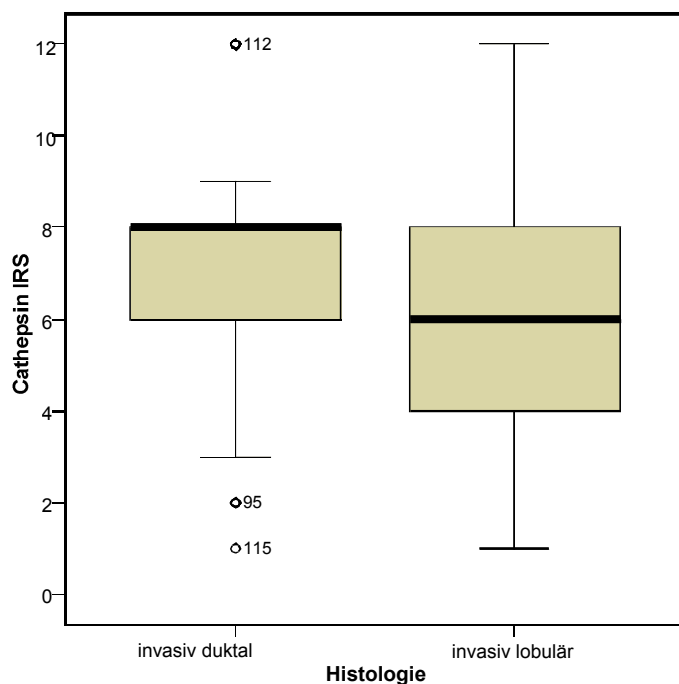


Abbildung 4: Cathepsin-D; IRS abhängig von der Histologie; Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen

5.1.2 Grading

Bezüglich des Gradings fanden sich im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede in der immunhistochemisch nachweisbaren Cathepsin-D-Expression.

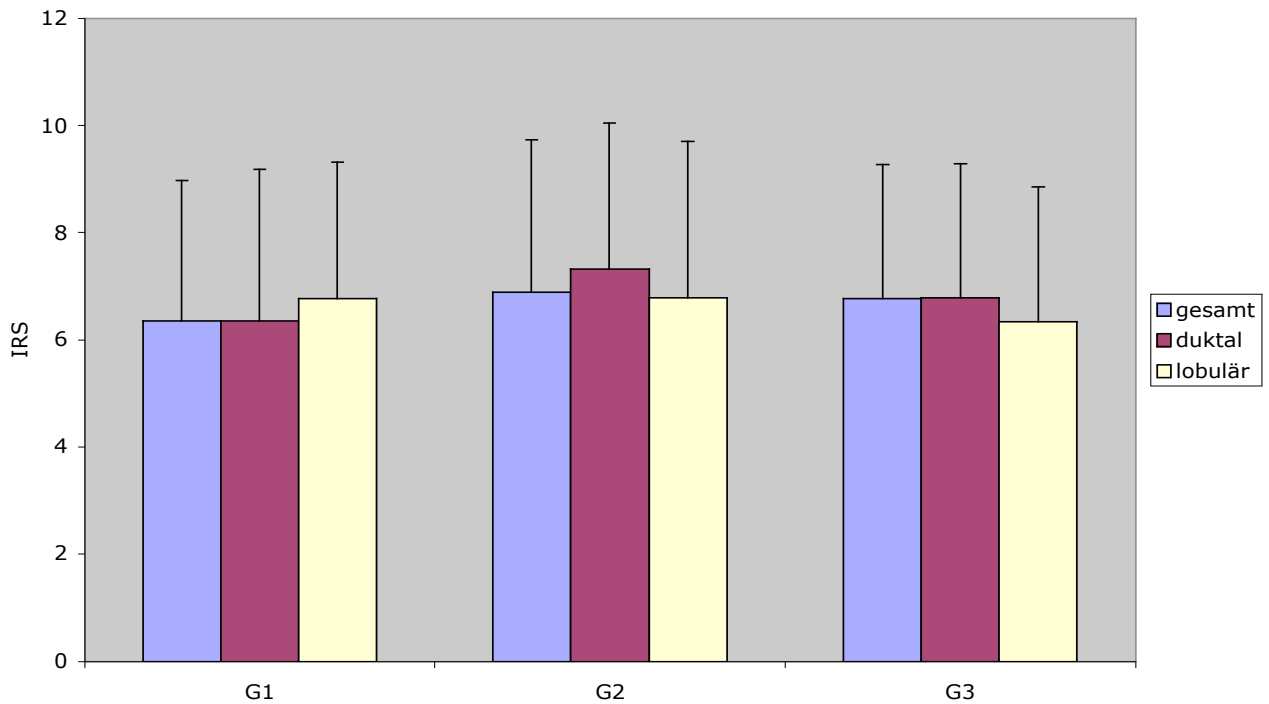


Abbildung 5: Cathepsin-D-Expression; IRS abhängig vom grading; keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte

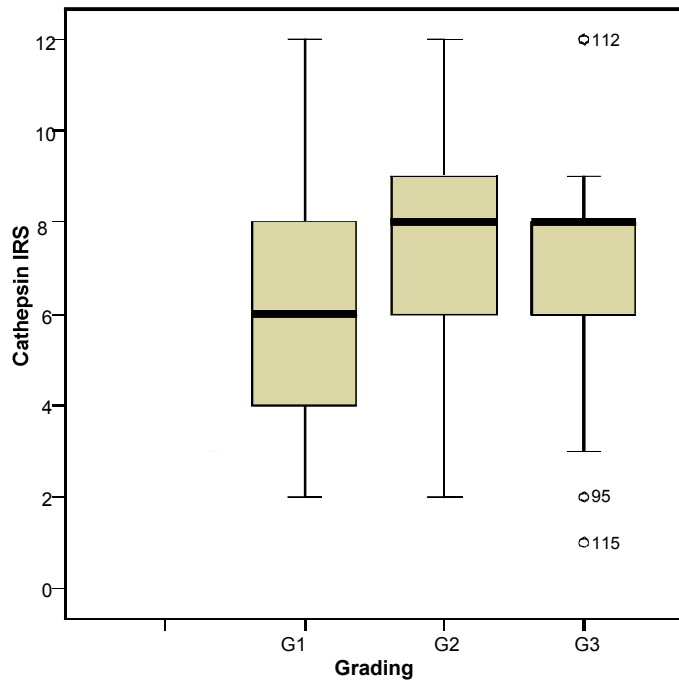


Abbildung 6: Cathepsin-D; IRS abhängig vom grading; Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen

5.1.3 Nodalstatus

Hier findet sich mit $p=0,048$ für Cathepsin D ein gerade signifikant höherer durchschnittlicher Färbescore bei Befall der regionären Lymphknoten.

Die Mittelwerte sind 6,15 ($n=60$, Standardabweichung (SD) 2,65) ohne Lymphknotenbefall und 7,22 ($n=60$, SD 2,78) bei axillärer Metastasierung.

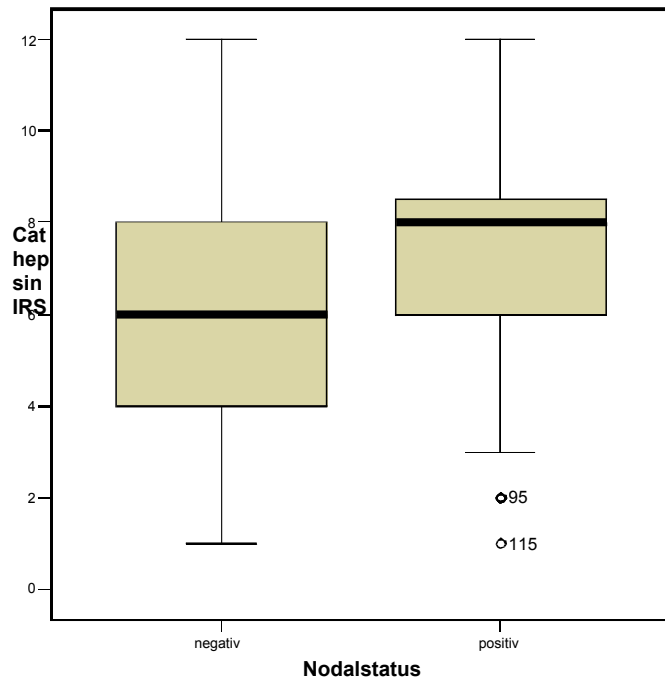


Abbildung 7: Cathepsin-D; IRS abhängig vom Nodalstatus; Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen

5.1.4 Steroidhormonrezeptorstatus

Östrogen- und progesteronrezeptornegative Tumore zeigen im Mittel für Cathepsin D eine minimal und nichtsignifikant stärkere Färbung als hormonempfindliche Tumore. Die Mittelwerte der immunreaktiven scores sind für steroidrezeptornegative Tumore 6,85 (n= 53; SD 2,71) und 6,55 für rezeptorpositive (n= 67; SD 2,81)

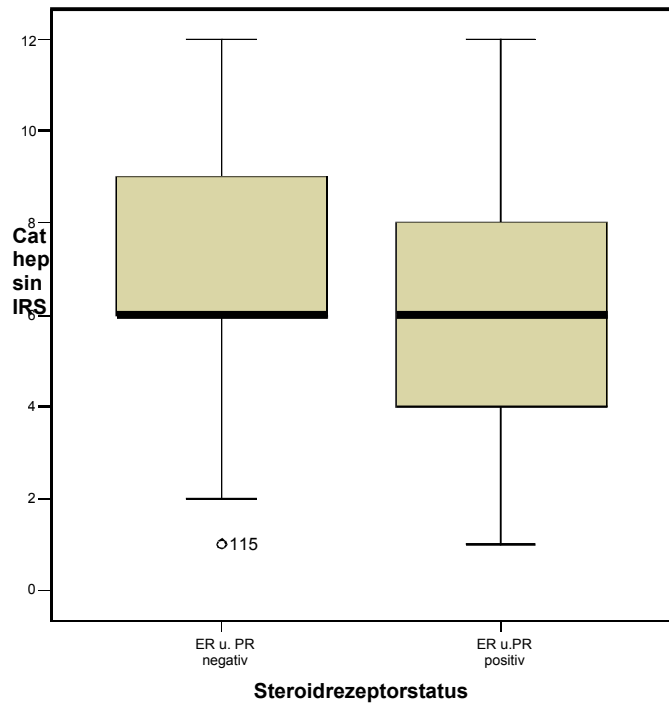


Abbildung 8: Cathepsin-D; IRS abhängig vom Rezeptorstatus; Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen

5.1.5 Fotodokumentation

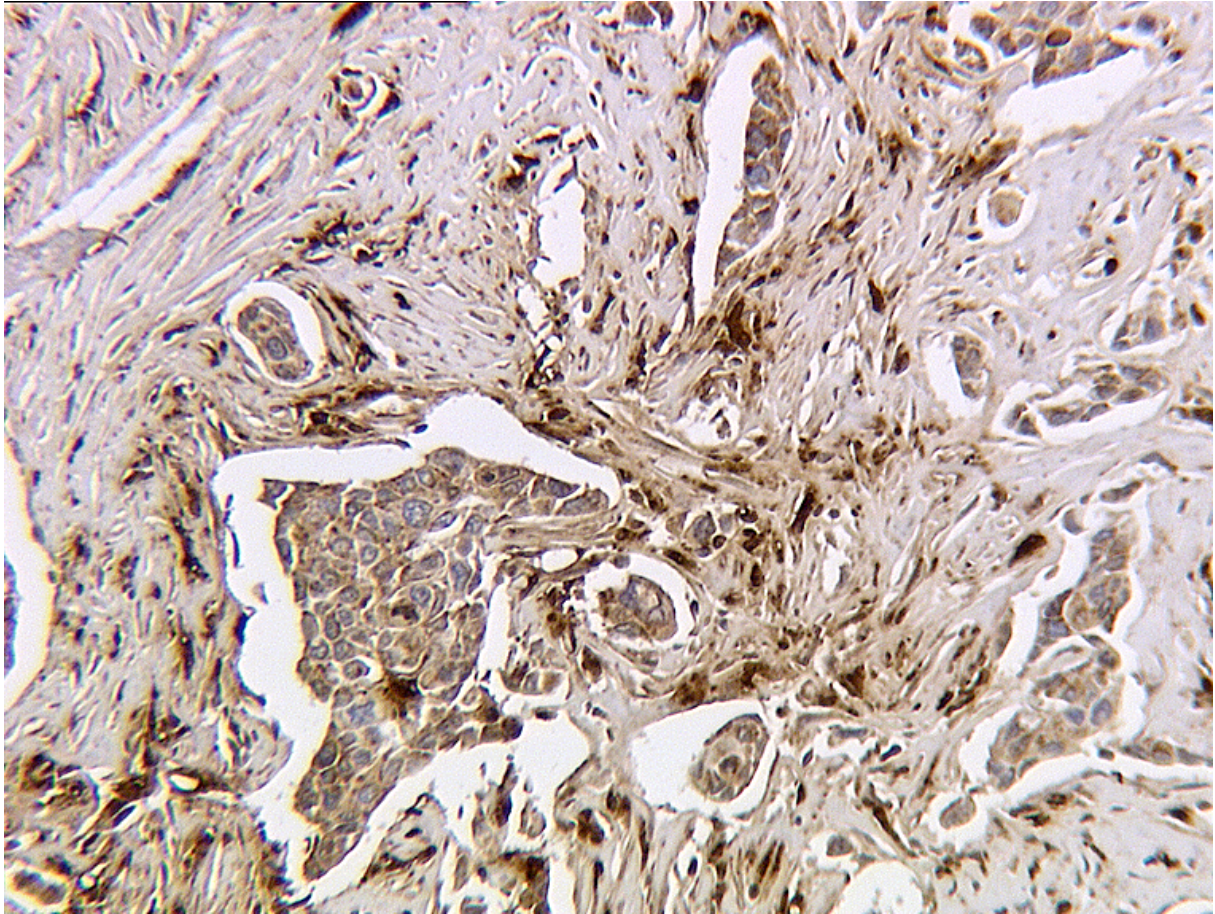


Abbildung 9: duktales Mammarkarzinom N1 G2 rezeptornegativ, Cathepsin-D-Färbung; 10-fache Vergrößerung, Linsenvergrößerung X8, IRS 9

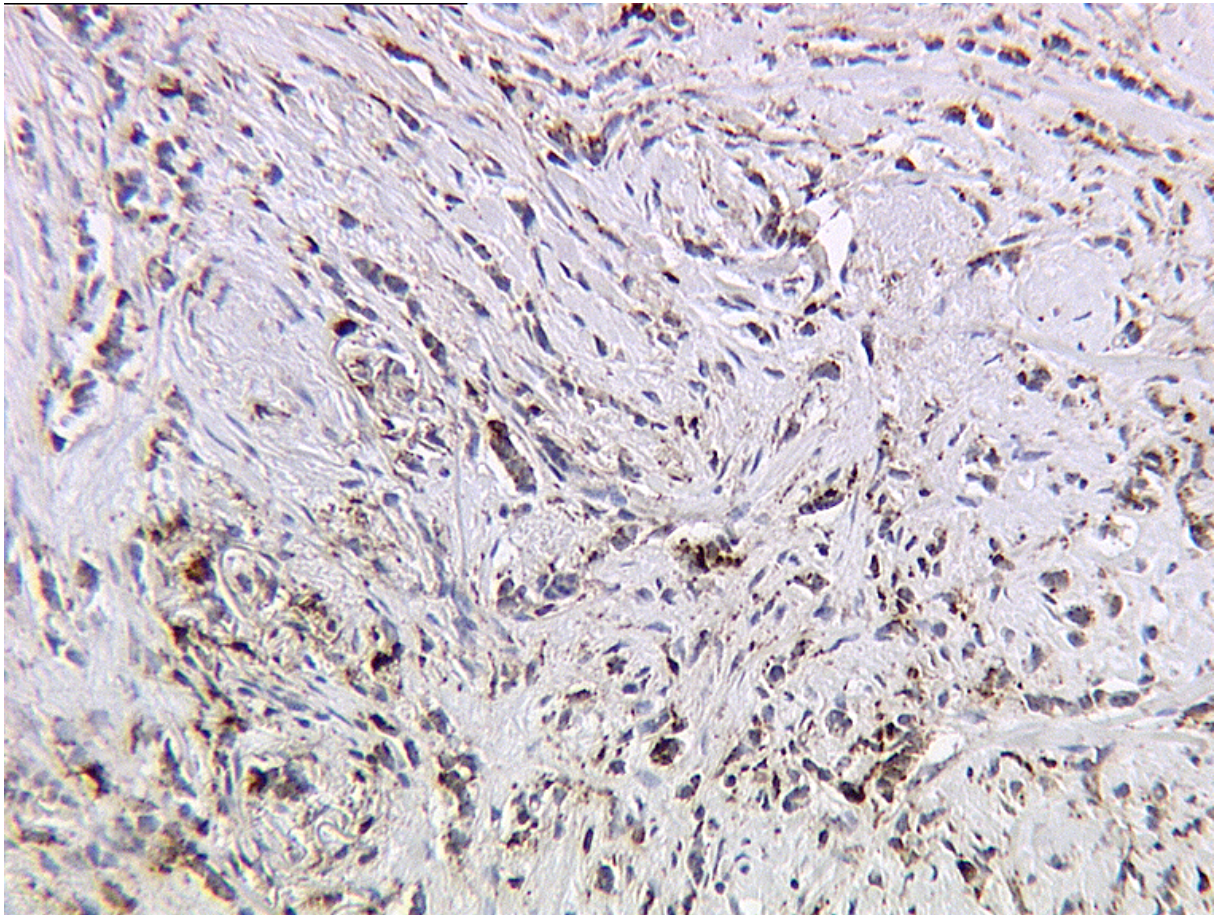


Abbildung 10: lobuläres Mammkarzinom, N0 G2 rezeptorpositiv; Cathepsin-D-Färbung; 10-fache Vergrößerung, Linsenvergrößerung X8, IRS 4

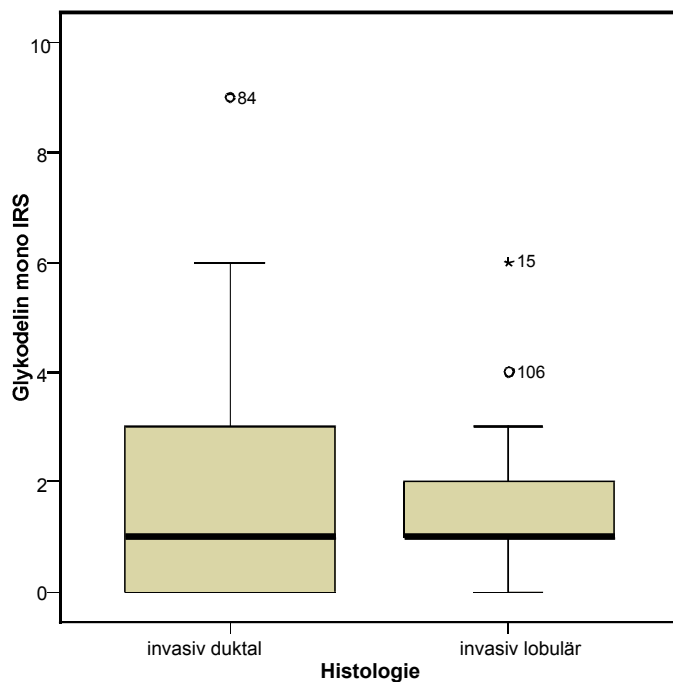
5.2 Glycodelin A

5.2.1 Monoklonaler Antikörper gegen Glycodelin A

5.2.1.1 Histologie

Bei den duktaalen Karzinomen fand sich ein nicht signifikant höherer Färbescore als bei den lobulären.

Bei den invasiv duktaalen Mammakarzinomen war der Mittelwert des Färbescores 1,81 (n=83, SD 1,92), bei den invasiv lobulären 1,55 (n=38, SD 1,39).



**Abbildung 11: Glycodelin monoklonal: IRS abhängig von der Histologie;
Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen**

5.2.1.2 Grading

Mit $p=0,059$ erreichen die Unterschiede im IRS bezüglich grading beim monoklonalen Glycodelin-Antikörper nicht ganz statistische Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test. Außerdem findet sich keine –theoretisch vorstellbare und bei der Untersuchung mit dem polyklonalen Antikörper tendentiell zu sehende- kontinuierliche Abnahme des Färbescores mit zunehmender Entdifferenzierung. Hingegen wäre nach vorliegender Untersuchung bei den G1-Tumoren eine niedrigere Expression anzunehmen als bei den G2- und G3-Tumoren. Hier wiederum ist der Mittelwert der Färbescores bei G3-Tumoren niedriger als bei G2-Differenzierung. Allerdings ist auch dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant.

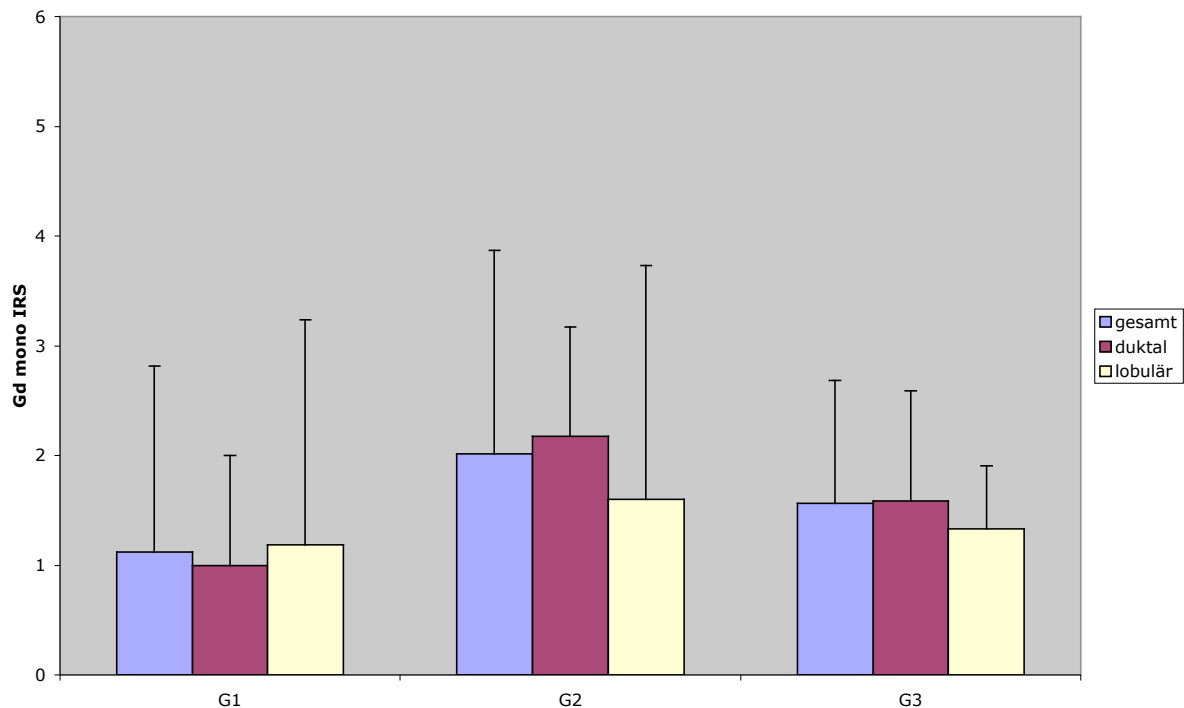


Abbildung 12: Glycodelin monoklonal; IRS abhängig vom grading

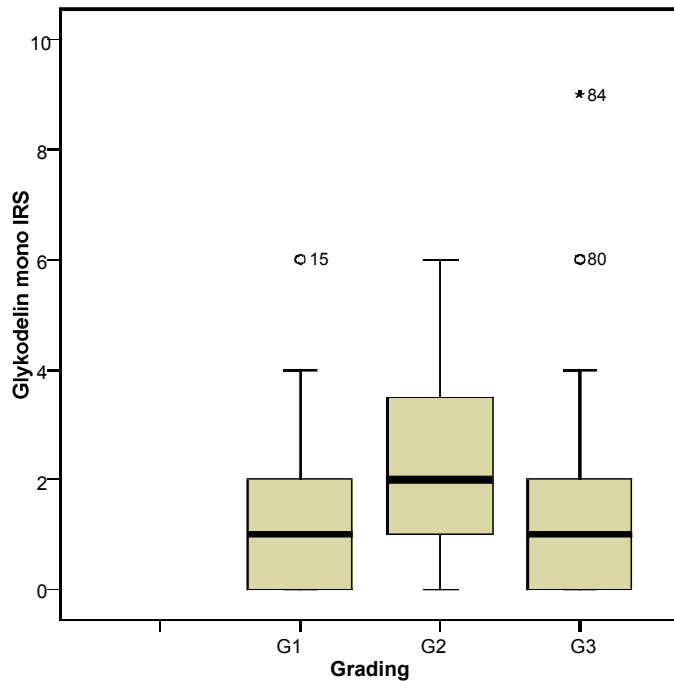


Abbildung 13: Glycodelin monoklonal; IRS abhängig vom grading; Boxplot mit Median, 25- und 75% Quartile

5.2.1.3 Nodalstatus

Beim monoklonalen Glycodelin-Antikörper zeigt sich – wie auch beim polyklonalen Antikörper- ein nichtsignifikanter Anstieg des durchschnittlichen immunreaktiven scores mit axillärem Lymphknotenbefall.

Der Mittelwert des Färbescores (IRS) bei Tumoren ohne axilläre Metastasierung beträgt 1,59 (n=61, SD 1,73). Mit axillärer Metastasierung ist der Mittelwert 1,87 n=60, SD 1,81).

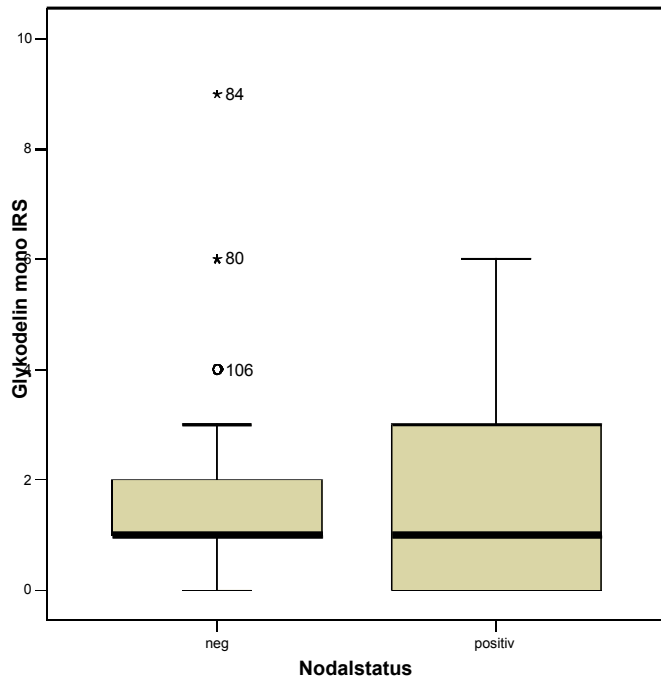


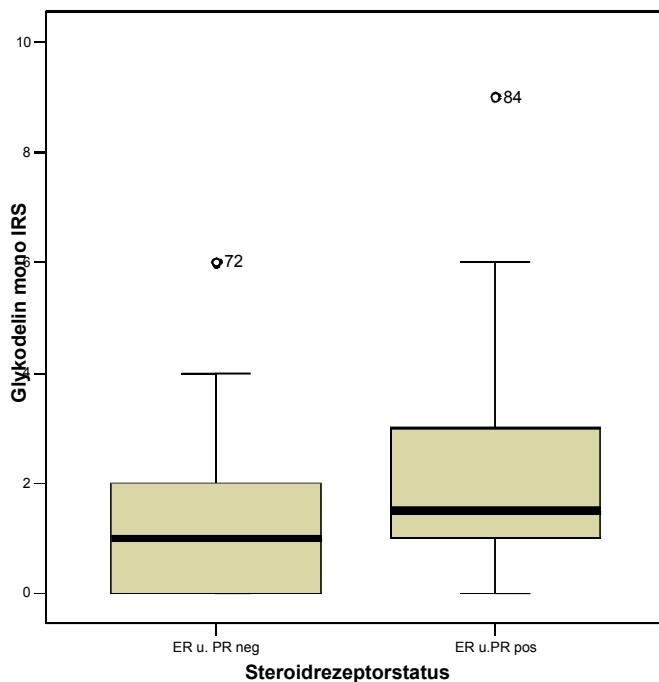
Abbildung 14: Glykodelin monoklonal; IRS abhängig vom Nodalstatus; Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen

5.2.1.4 Steroidhormonrezeptorstatus

Die immunhistochemische Anfärbung mit dem monoklonalen Glycodelinantikörper ist bei rezeptornegativen Tumoren signifikant schwächer ausgeprägt als bei rezeptorpositiven. ($p=0,033$ im Mann-Whitney-U-Test)

Der Mittelwert des Färbescores bei Tumoren ohne Expression von Steroidhormonrezeptoren beträgt 1,40 ($n=53$, SD 1,64). Bei den für beide Steroidrezeptoren positiven Tumoren ist er 1,99 ($n=68$, SD 1,82).

Hier besteht auch eine positive signifikante Korrelation nach Spearman-Rho zwischen der Expression der Steroidhormonrezeptoren und der Anfärbung mit Hilfe monoklonaler Glycodelinantikörper.



**Abbildung 15: Glycodelin monoklonal; IRS abhängig vom Rezeptorstatus;
Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen**

5.2.1.5 Fotodokumentation

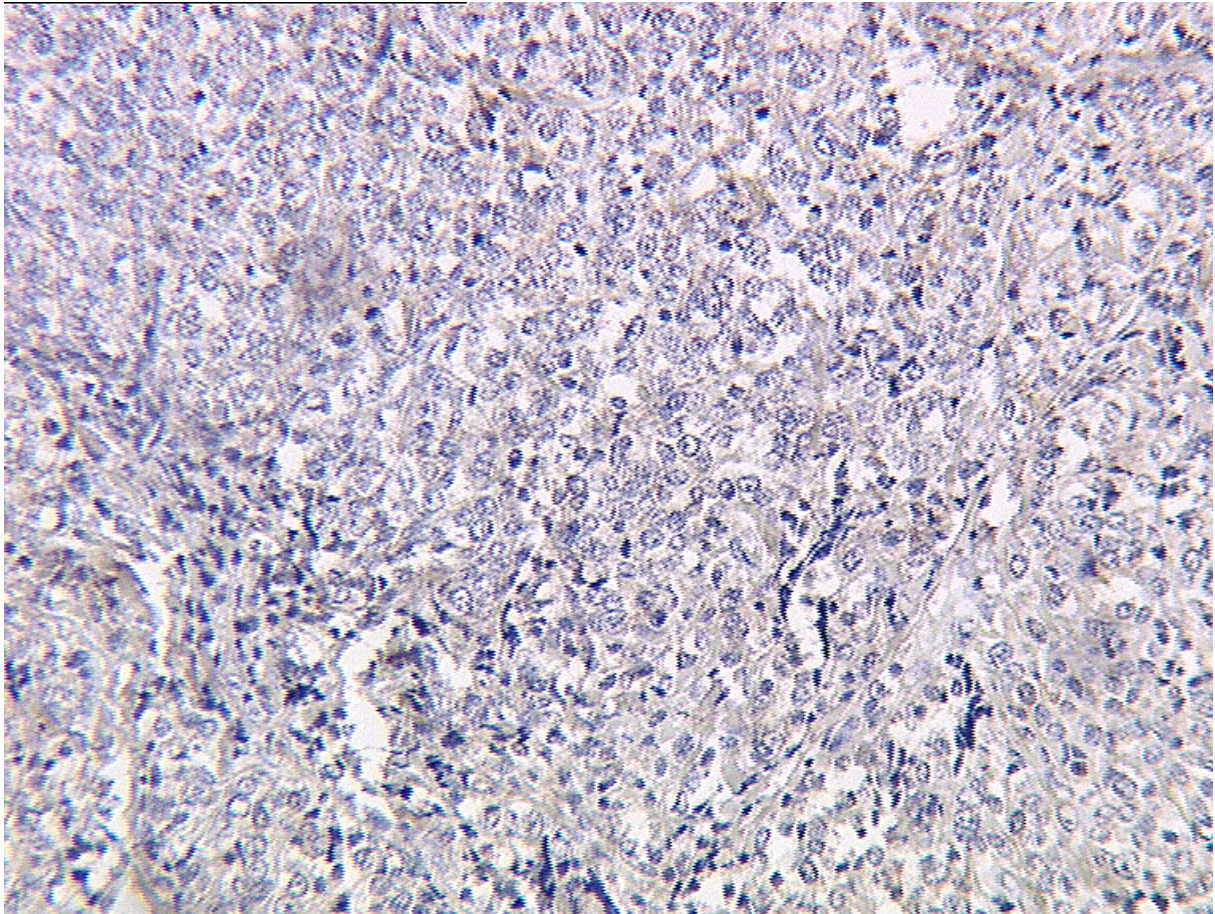


Abbildung 16: invasiv lobuläres Mammakarzinom, N1 G1 rezeptor-negativ; Glokodelin mono-Färbung; 10-fache Vergrößerung, Lin-senvergrößerung X8, IRS 0 (negativ)

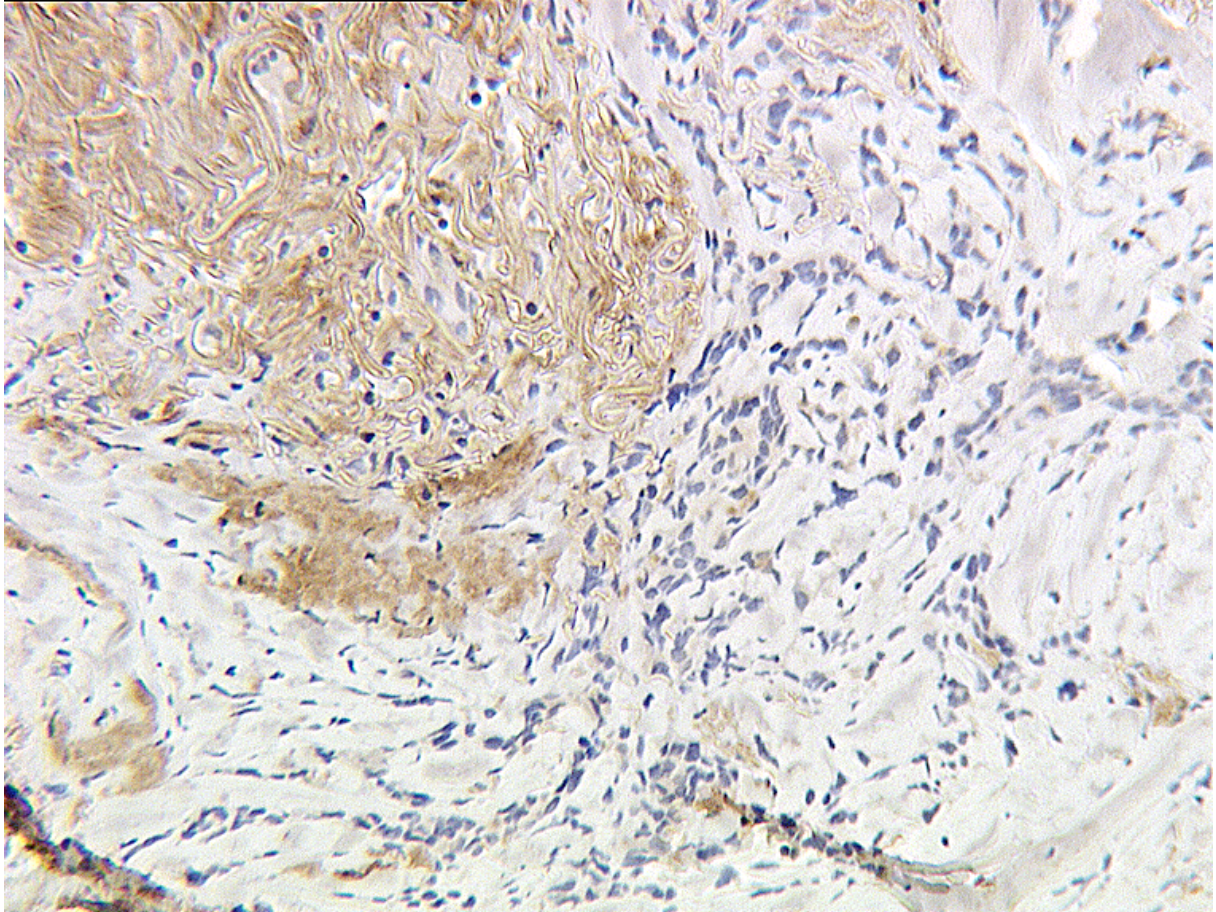


Abbildung 17: Glycodelin-mono-Färbung bei invasiv duktalem Mammakarzinom N1 G2 rezeptorpositiv; 10-fache Vergrößerung, Linsenvergrößerung X8, IRS 4

5.2.2 Polyklonaler Antikörper gegen Glycodelin A

5.2.2.1 Histologie

Bei den dukalen Karzinomen fand sich ein minimal, nicht signifikant höherer Färbescore.

Histologie		N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
invasiv duktal	Glykodelin poly IRS	83	0	12	8,92	3,63
invasiv lobulär	Glykodelin poly IRS	38	3	12	8,63	3,09

Tabelle 6: Glycodelin polyklonal, IRS abhängig von der Histologie

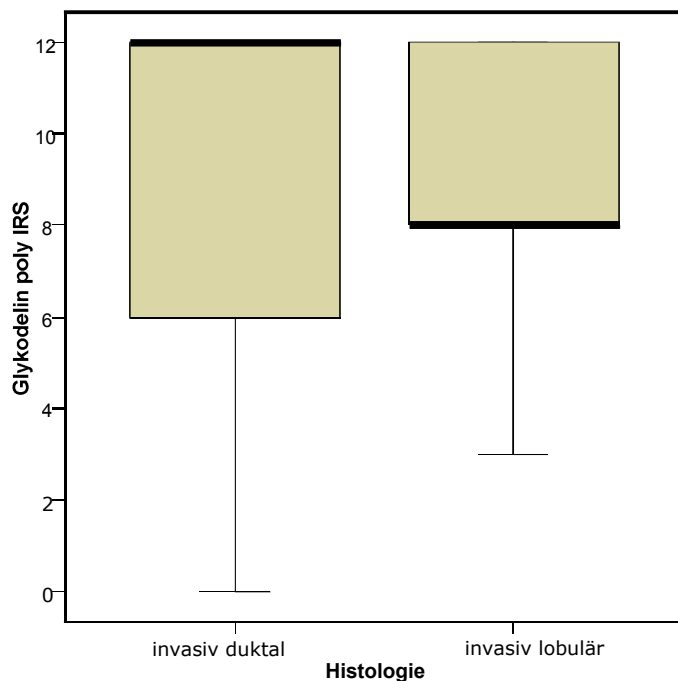


Abbildung 18: Glycodelin polyklonal; IRS abhängig von der Histologie; Boxplot mit Median, 25- und 75% Quartile

5.2.2.2 Grading

Man sieht hier durchschnittlich eine leichte, nichtsignifikante Abnahme des Färbescores mit zunehmender Entdifferenzierung.

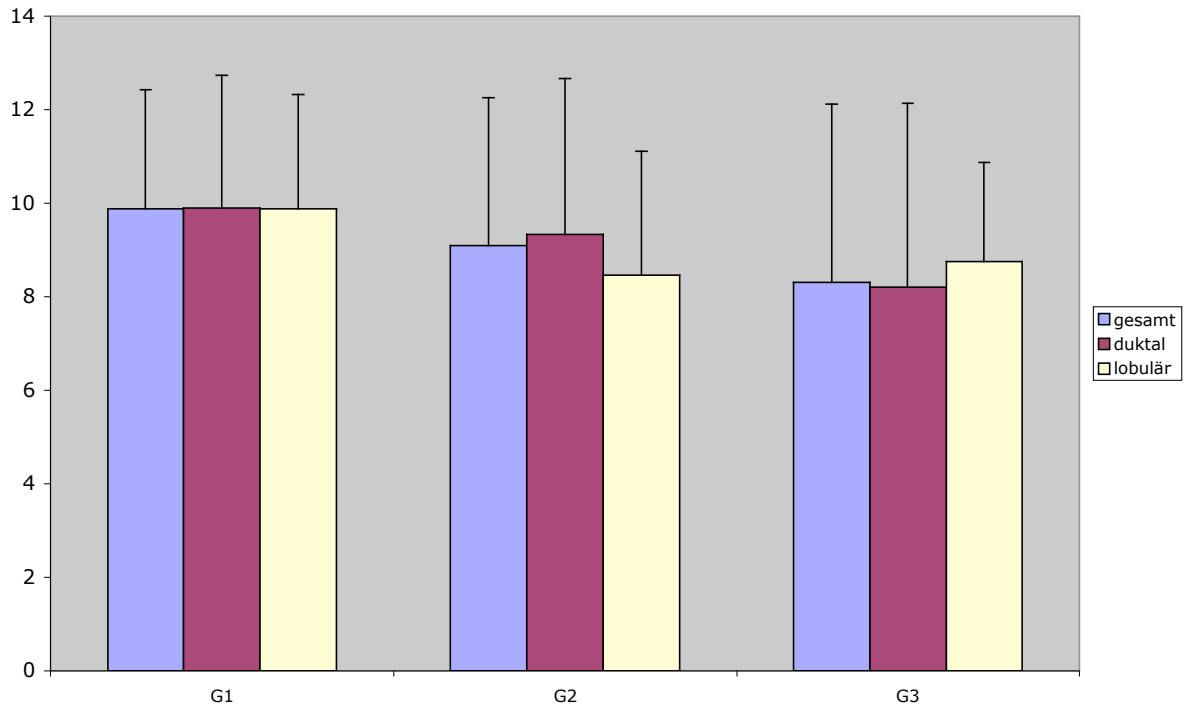


Abbildung 19: Glycodelin polyklonal; IRS abhängig vom Grading

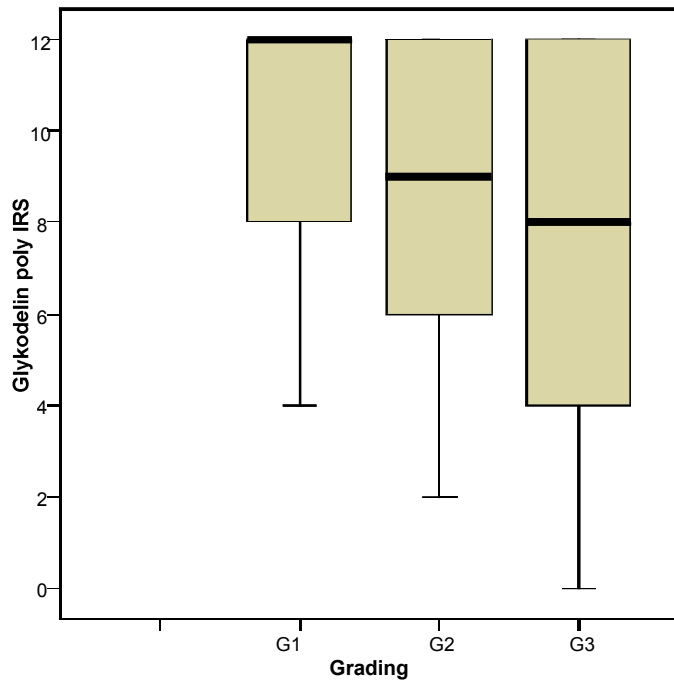


Abbildung 20: Glykodelin polyklonal; IRS abhängig vom Grading; Boxplot mit Median, 25- und 75%Quartilen

5.2.2.3 Nodalstatus

Beim polyklonalen Glycodelin-Antikörper findet sich –wie beim monoklonalen Antikörper- eine nicht signifikant stärkere Färbung bei Lymphknotenbefall.

Mittelwert bei axillärer Metastasierung war 9,12 (n=60, SD 3,39) versus 8,54 (n=61, SD 3,53).

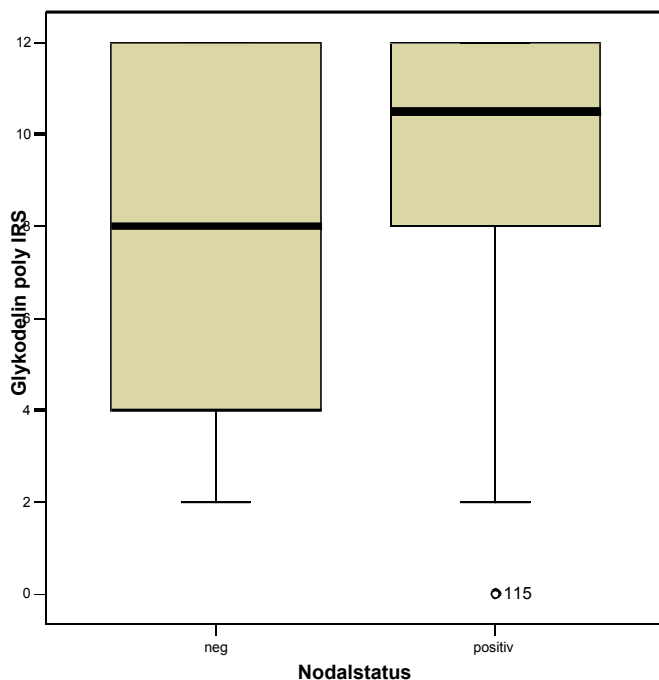


Abbildung 21: Glycodelin polyklonal; IRS abhängig vom Nodalstatus; Boxplot mit Median, 25- und 75%-Quartilen

5.2.2.4 Steroidhormonrezeptorstatus

Mit dem polyklonalen Glycodelinantikörper färben sich die rezeptornegativen Tumoren ebenfalls durchschnittlich etwas schwächer an als die rezeptorpositiven. Dies bleibt aber statistisch nicht signifikant.

Die rezeptorpositiven Tumoren wurden im Mittel mit einem IRS von 8,93 (n=68, SD 3,39) bewertet, die rezeptornegativen mit 8,70 (n=53, SD 3,57).

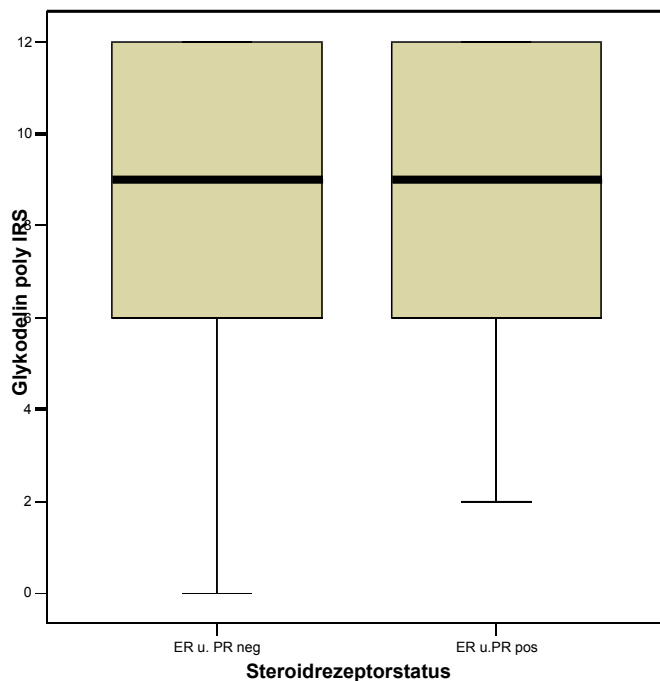


Abbildung 22: Glycodelin polyklonal: IRS abhängig vom Rezeptorstatus; Boxplot mit Median, 25- und 75% Quartilen

5.2.2.5 Fotodokumentation

Theoretisch wäre nach oben genannten Ergebnissen der durchschnittlich höchste score bei einem Präparat der Klassifikation duktal G1 N1 rezeptor positiv zu erwarten. Ein solches stand aber in dieser Kombination (G1N1) gar nicht zur Verfügung.

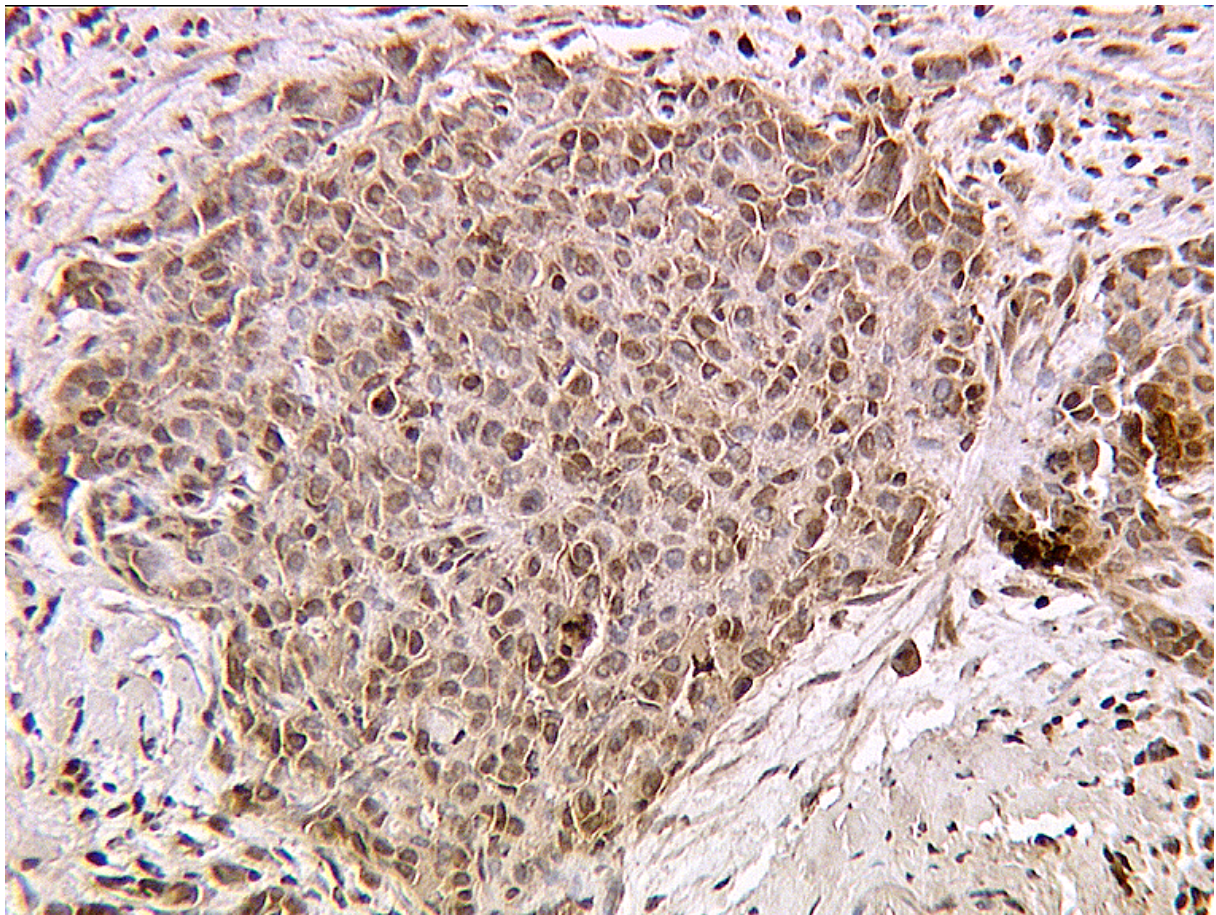
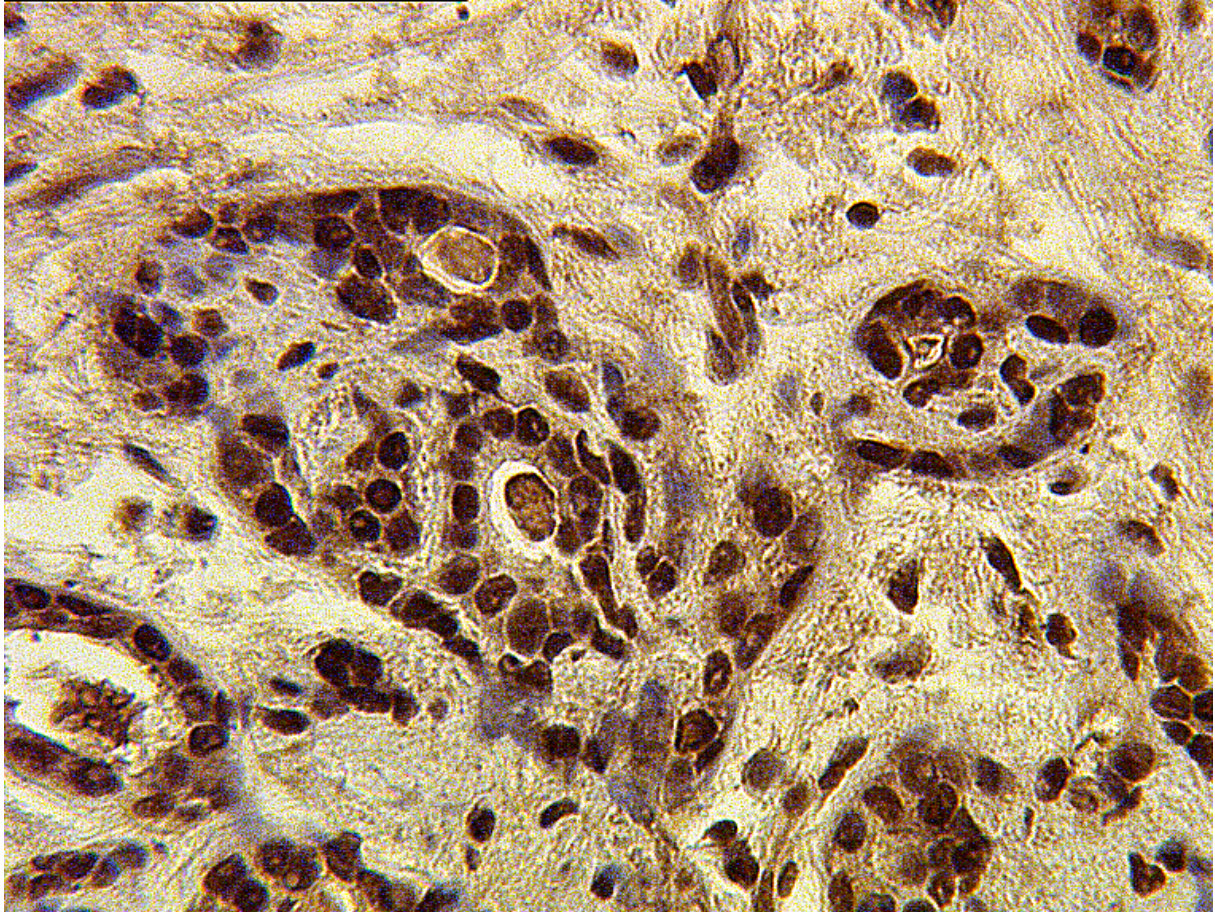


Abbildung 23: Glycodelin poly Färbung bei invasiv lobulärem Mammakarzinom N0 G3 rezeptor negativ, 10-fache Vergrößerung, Linsenvergrößerung X8, IRS 8



**Abbildung 24: Glycodelin poly Färbung bei invasiv duktalem Mam-
makarzinom, N0 G1 rezeptor positiv, 25-fache Vergrößerung, Lin-
senvergrößerung X8, IRS 9**

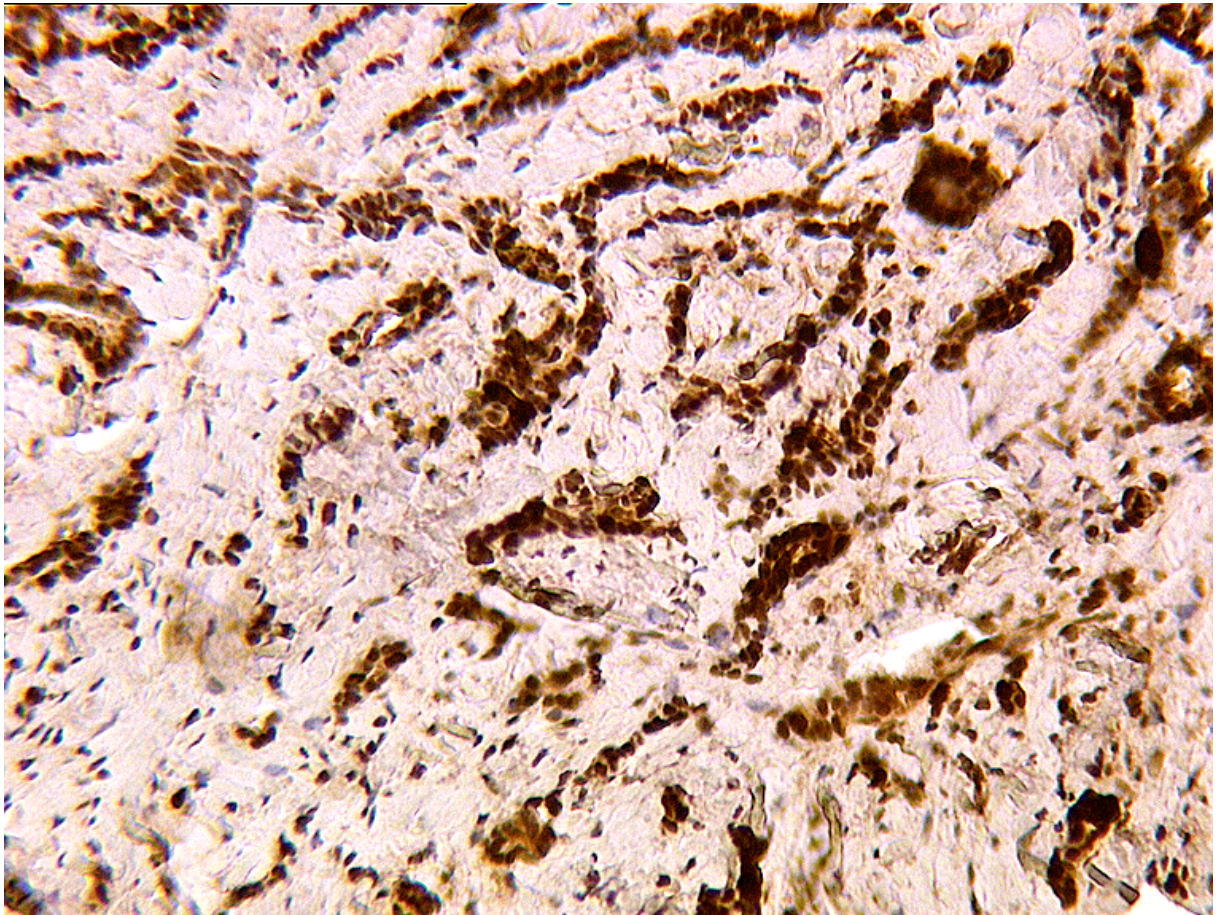


Abbildung 25: gleiches Präparat wie vorherige Abbildung, 10-fache Vergrößerung, Linsenvergrößerung X8

6 Diskussion

Bezüglich der Cathepsinexpression wurde innerhalb dieser Studie eine Reihe von Ergebnissen beim Mammakarzinom erarbeitet:

Bei den duktalem Karzinomen fand sich ein signifikant höherer Färbescore verglichen mit den lobulären Karzinomen.

Bezüglich des Gradings fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Cathepsin-D-Expression.

Östrogen- und progesteronrezeptornegative Tumore zeigen im Mittel für Cathepsin D eine minimal und nichtsignifikant stärkere Färbung als hormonempfindliche Tumore.

Mammakarzinome mit regionalem Lymphknotenbefall haben einen höheren Gehalt an der Tumorprotease Cathepsin-D als lokal begrenzte.

Die immunhistochemische Anfärbung mit dem monoklonalen Glycodelinantikörper ist bei rezeptornegativen Tumoren signifikant niedriger als bei rezeptorpositiven.

Es besteht auch eine positive signifikante Korrelation zwischen der Expression der Steroidhormonrezeptoren und der Färbintensität mit Hilfe monoklonaler Glycodelinantikörpern.

6.1 Cathepsin D

Beim hier vorliegenden immunhistochemischen Nachweis ergab sich ein signifikant höherer Färbescore bei duktalem im Vergleich zu lobulären Karzinomen, kein Unterschied für den Grad der Differenzierung, ein signifikant höherer score bei Lymphknotenbefall und kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Rezeptorstatus.

Auch andere Autoren fanden bei Messung der Cathepsin D-Konzentration im Tumorzytosol keine Korrelation mit bekannten Prognosefaktoren, teils außer dem Estrogenrezeptorstatus. (Maudelonde et al. 1988, Spyrtos, 1989) (Spyrtos, Maudelonde et al. 1989).

An estrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinien wurde aber eine Stimulierung der Cathepsin D-Transkription und Expression durch Estrogene gezeigt. (Westley and May 1987; Cavailles et al. 1993)

In einer anderen Untersuchung korrelierten die Cathepsin D-Spiegel im Tumorzytosol nur mit dem Lymphknotenstatus. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein. (Pujol et al. 1993)

Ebenso zeigte sich bei einer vorhergehenden immunhistochemischen Untersuchung, dass die Cathepsin D Expression im Tumorgewebe mit dem Lymphknotenstatus korreliert. (Gohring et al. 1996)

Andererseits wurde in einer größeren Studie an 1003 Patientinnen sehr wohl eine Korrelation mit den bekannten Prognosefaktoren gezeigt. Die Cathepsin D-Spiegel waren hier –wie in der vorliegenden Untersuchung- in duktalem histologischen Typen höher als in anderen. Eine prognostische Stratifizierung schien hier nur in der Gruppe der nodalpositiven Frauen möglich. Es wurde ebenfalls immunoradiometrisch im Tumorzytosol gemessen. (Rodriguez et al. 2005)

Auch Joensuu et al fanden in einer retrospektiven immunhistochemischen Arbeit an 213 Präparaten bei duktalem Mammakarzinomen in 80% eine Cathepsin D-Expression, bei lobulären nur in 54%. Sie beschreiben, dass keine Assoziation mit den untersuchten bekannten Prognosefaktoren vorlag, aber mit hoher Zellproliferationsrate. (Joensuu et al. 1995)

Umgekehrt war in einer älteren Untersuchung bei lobulärer Differenzierung Cathepsin D in 86% (48/56), bei duktalem Differenzierung nur in 63% immunhistochemisch nachweisbar. (Domagala et al. 1993)

Es gibt drei Arbeiten, die die immunhistochemische Messung von Cathepsin D mit der aufwändigeren -und nur an größeren Tumoren möglichen- Bestimmung im Tumorzytosol von frisch gefrorenem Gewebe direkt vergleicht:

Retrospektiv wurden von Gohring et al 270 primäre Mammakarzinompräparate ausgewertet und die Immunhistochemie mit einem Immunoradiometrischen Assay (IMRA) im Zytosol verglichen. Die Nachbeobachtungs-

zeit war median 68 Monate. Dabei findet sich eine um 70-prozentige Konkordanz der beiden Methoden. Ein prädiktiver Wert bezüglich des Überlebens fand sich aber nur für die Immunhistochemie. (Gohringet al. 1996)

Maudelonde veröffentlichte den Vergleich an 34 Brustkrebspräparaten und fand eine gute Korrelation ($r=0,80$) der nachgewiesenen Cath D Expression. (Maudelonde et al. 1992)

Auch Roger et al verglichen prospektiv eine immunhistochemische Cathepsin-D-Bestimmung mit Hilfe desselben Antikörpers (monoklonaler M1G8-Antikörper) mit der Messung im Tumorzytosol. Dabei fand sich, dass Cathepsin D in 41 Brustkrebspräparaten gegenüber dem peritumorösen Gewebe verstärkt nachweisbar war und dieser Nachweis vor allem auf das Vorhandensein in Lysosomen und Phagosomen der malignen Zellen beruhte. Der immunhistochemische Nachweis korrelierte signifikant mit dem im Zytosol ($r=0.76$). Auch hier färbten sich duktale stärker als lobuläre Tumore ($n=35$ versus 6). Nur in ersteren, nämlich in 40%, fanden sich so genannte LAV's (large acidic vesicles, d.h. Phagosomen), die sich zum Teil positiv färbten.

Makrophagen wurden in dieser Arbeit zusätzlich mit Hilfe von antiCD68-Antikörpern detektiert und färbten sich regelmäßig deutlich positiv für Cathepsin D. Allerdings gab es keine Korrelation zwischen dem quantitativen immunhistochemischen score und der Anzahl der Makrophagen. (Roger et al. 1994)

Capony et al. wiesen immunhistochemisch für Cathepsin D eine 20-50-fach höhere Expression in Mammakarzinomzellen als in benignem Brustdrüsengewebe oder anderen Zellen wie Fibroblasten nach. Makrophagen aus dem Tumorstroma reagierten bei dieser Färbung auch positiv. (Capony et al. 1989; Roger et al. 1994)

Insofern wird mit unseren Ergebnissen die grundsätzliche Eignung des Cathepsin D als Prognosefaktor beim Mammakarzinom bestätigt. Dabei sollte die unterschiedliche Ausprägung bei verschiedenen histologischen Typen berücksichtigt werden.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die Cathepsin D Expression in den Tumorzellen mit der Lymphknotenmetastasierung zunimmt. Dies deutet auf eine Rolle von Cathepsin D beim Zusammenbruch der extrazellulären Matrix hin. Andere Untersuchungen (Ioachim et al. 1997) deuteten auf einen Zusammenhang der Cathepsin D Expression mit Prolifera-

tion und Hormonrezeptorstatus hin. Diese Zusammenhänge konnten in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden.

Der Cathepsin D-Gehalt der Tumorpräparate ist gemäß der vorliegenden Arbeit unabhängig von traditionellen Prognosefaktoren außer dem Lymphknotenbefall. In der Literatur sind mehrere Hinweise für eine schlechtere Prognose bei hohen Cathepsin-D-Spiegeln zu finden – insbesondere bei nodalnegativen Patientinnen. (Harbeck et al. 2000) . (Siehe auch Einleitung Punkt 2.3.3.4) Dies betrifft Frauen mit sogenanntem intermediärem Risiko, bei denen die Entscheidung für oder gegen eine Chemotherapie oft schwierig zu treffen ist. Deswegen könnte die Cathepsin-D-Färbung einen diagnostischen Mehrwert darstellen. Die Immunhistochemie hat den Vorteil, dass sie relativ einfach und auch nachträglich durchführbar ist. Für diese Methode müssten sich aber noch prospektive Studien mit dem Endpunkt krankheitsfreies und Gesamtüberleben anschließen.

6.2 Glycodelin A

Die Glycodelin A Färbung mit dem polyklonalen Antikörper war in 99,2% positiv (1 von 121 Präparaten war negativ). Mit dem monoklonalen Antikörper waren 75,2% positiv (30 von 121 Präparaten waren negativ).

Zur Untersuchung der Glycodelin Expression beim Mammakarzinom existieren bis jetzt in der Literatur relativ wenige Nachweise:

Kostadima beschreibt beim Nachweis von Glycodelin mRNA an 275 Paraffinpräparaten von Mammakarzinomen nur in 25% Positivität. (Kostadima et al. 2006)

Shabani et al fanden in 9 von 10 Mammakarzinompräparaten ohne Lymphknotenmetastasen und 5/10 Mammakarzinompräparaten mit Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch eine Glycodelinexpression. (Shabani, Mylonas et al. 2005)

Kamarainen et al wiesen Glycodelin per Immunhistochemie, Northern blot und Reverse Transkriptase-PCR nach und fanden es in 6/6 normalen Brustgewebspräparaten, in 25/27 Präparaten von morphologisch normalem Brustdrüsengewebe von Brustkrebspatientinnen, in 6/6 benignen Adenomen der Brust, in 21/35 duktalem Mammakarzinomen und in 7/11 lobulären Karzinomen. (Kamarainen et al. 1999)

Mit dem monoklonalen Antikörper fand sich eine statistisch signifikante Korrelation bezüglich der Hormonrezeptoren: Der immunhistochemische Glycodelin-A-Nachweis bei den rezeptornegativen, also entdifferenzierten Zellen ist verringert. Eine Tendenz ist bei der Färbung mit dem polyklonalen Antikörper im selben Sinn zu finden. Spezifisch für Glycodelin A ist nur der monoklonale Antikörper, der die Glykosilierung detektiert. Der polyklonale Antikörper ist gegen das Peptid gerichtet und erkennt somit verschiedene Glykodeline. Dies passt zu der Erkenntnis, dass Estrogene eine Rolle bei der Glykosilierung spielen. Es könnte evtl. auch mit einem Einfluß von Progesteron auf die Glycodelinsekretion zu tun haben. Zumindest ist beim Endometrium eine verstärkte Glycodelinkonzentration in der Lutealphase beschrieben. (Brown et al. 2000). Auch in vitro ist eine Stimulation der Expression durch Progesteron nachgewiesen. (Taylor et al. 1998)

In der Praxis handelt es sich lediglich um einen Unterschied von 0,6 Einheiten auf der 12-teiligen Skala des Immunreaktiven scores. Dies dürfte nur schwer eine praktische Konsequenz, z.B. für die Festlegung eines cut-offs, haben.

Bei der Stratifizierung der Tumorpräparate in „rezeptorpositiv“ und rezeptornegativ“ wurden Präparate verglichen, die sowohl Estrogen- als auch Progesteronrezeptoren exprimierten. Diese Präparate wurden verglichen mit Präparaten, die negativ für beide Hormonrezeptoren waren. Bei den Estrogenrezeptoren wurden die ER α positiven Präparate verwendet und bei den Progesteronrezeptoren die PR-A positiven.

Die Ergebnisse bezüglich Nodalstatus und grading sind statistisch nicht signifikant, aber in der Tendenz widersprüchlich bezüglich einer Assoziation mit diesen Faktoren. Nach vorliegender Untersuchung könnte man tendenziell eine Abnahme der Expression mit Entdifferenzierung in der Morphologie annehmen. Das ist konsistent mit Untersuchungen bei anderen Tumoren.

Es ist ein wichtiger Erkenntnisgewinn, dass die Glycodelinexpression unabhängig von der Differenzierung zu sein scheint, obwohl nachgewiesen wurde, dass bei Mammakarzinomen mit regionalem Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung die Glycodelin messenger-RNA-Konzentrationen gegenüber in situ Carcinomen und lokal begrenzten Erkrankungen ab-

nehmen. (Jeschke et al. 2005) Dies spricht dafür, dass Glycodelin-A als prognostischen Marker verwendbar sein könnte.

Um die Frage der Wertigkeit von Glycodelin als unabhängiger Prognosefaktor weiter zu verfolgen, müsste die Korrelation seiner Expression mit dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben prospektiv evaluiert werden. Die Immunohistochemie als Methode könnte dazu mit beiden Antikörpern prinzipiell in Betracht gezogen werden, weil sich Glycodelin-A damit beim Mammakarzinom nachweisen lässt und sie eine relativ gut verfügbare Methode ist. Ein cut-off bleibt noch zu definieren. Auch besteht keine signifikante Korrelation mit dem Grading oder Nodalstatus. Dies ist für eine Funktion als unabhängiger Marker eher positiv.

Die Immunhistochemie an sich unterliegt einer gewissen Subjektivität und erlaubt lediglich eine semiquantitative Beurteilung.

Eine mögliche Limitierung der Arbeit besteht in der fehlenden Kontrolle an benignem Brustgewebe.

In der Literatur findet sich zumindest ein qualitativer Glycodelin-Nachweis in normalem Brustdrüsengewebe. (Kamarainen, Halttunen et al. 1999)

Das Alter der Präparate spielte bezüglich der Intensität der Färbung gemäß der Untersuchung von Mandelin (Mandelin et al. 2003) keine Rolle.

7 Literaturverzeichnis

- Arnold, J. T., et al. (2001). "Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model." Hum Reprod **16**(5): 836-45.
- Baechle, D., et al. (2006). "Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L." J Biol Chem **281**(9): 5406-15.
- Bässler, R. (1997). Mamma. Pathologie. W. Remmele. Berlin, Heidelberg, Springer. **4**.
- Beaujouin, M., et al. (2006). "Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity." Oncogene **25**(13): 1967-73.
- Bell, S. C., et al. (1986). "Amniotic fluid concentrations of secreted pregnancy-associated endometrial alpha 1- and alpha 2-globulins (alpha 1- and alpha 2-PEG)." Br J Obstet Gynaecol **93**(9): 909-15.
- Berchem, G., et al. (2002). "Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis." Oncogene **21**(38): 5951-5.
- Bertz, J., et al. (2006). Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, GEKID und Robert Koch Institut.
- Bischof, A., et al. (2005). "Measurement of glycodelin A in fluids of benign ovarian cysts, borderline tumours and malignant ovarian cancer." Anticancer Res **25**(3A): 1639-44.
- Braun, S., et al. (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." N Engl J Med **353**(8): 793-802.
- Briozzo, P., et al. (1991). "MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D." Exp Cell Res **194**(2): 252-9.
- Brouillet, J. P., et al. (1997). "Increased cathepsin D level in the serum of patients with metastatic breast carcinoma detected with a specific pro-cathepsin D immunoassay." Cancer **79**(11): 2132-6.
- Brown, S. E., et al. (2000). "Endometrial glycodelin-A expression in the luteal phase of stimulated ovarian cycles." Fertil Steril **74**(1): 130-3.

- Cai, Q., et al. (2003). "Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(9): 853-9.
- Capony, F., et al. (1989). "A hormone-regulated pro-cathepsin D secreted by human mammary cancer cells." Biochem Soc Trans **17**(1): 31-3.
- Capony, F., et al. (1987). "Phosphorylation, glycosylation, and proteolytic activity of the 52-kD estrogen-induced protein secreted by MCF7 cells." J Cell Biol **104**(2): 253-62.
- Capony, F., et al. (1989). "Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells." Cancer Res **49**(14): 3904-9.
- Cavaillès, V., et al. (1993). "Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(1): 203-7.
- Cavaillès, V., et al. (1989). "Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF7 human breast cancer cells." Mol Endocrinol **3**(3): 552-8.
- Connor, J. P., et al. (2000). "Glycodelin-A expression in the uterine cervix." Gynecol Oncol **79**(2): 216-9.
- de Duve, C. (1983). "Lysosomes revisited." Eur J Biochem **137**(3): 391-7.
- Deroo, B. J. and K. S. Korach (2006). "Estrogen receptors and human disease." J Clin Invest **116**(3): 561-70.
- Domagala, W., et al. (1993). "Immunohistochemical profile of invasive lobular carcinoma of the breast: predominantly vimentin- and p53 protein-negative, cathepsin D- and oestrogen receptor-positive." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **423**(6): 497-502.
- Duffy, M. J., et al. (1992). "Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival." Clin Chem **38**(10): 2114-6.
- Einav, U., et al. (2005). "Gene expression analysis reveals a strong signature of an interferon-induced pathway in childhood lymphoblastic leukemia as well as in breast and ovarian cancer." Oncogene **24**(42): 6367-75.
- Engel, J. (2006). persönliche Mitteilung im Rahmen des Kolloquiums "Mammakarzinomtherapie in Deutschland- besser als ihr Ruf?" Muenchen.

- Faust, P. L., et al. (1985). "Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(15): 4910-4.
- Fazleabas, A. T., et al. (1991). "Effect of clomiphene citrate on the synthesis and release of the human beta-lactoglobulin homologue, pregnancy associated endometrial alpha 2-globulin, by the uterine endometrium." Hum Reprod **6**(6): 783-90.
- Flower, D. R. (1996). "The lipocalin protein family: structure and function." Biochem J **318 (Pt 1)**: 1-14.
- Foekens, J. A., et al. (1999). "Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients." Br J Cancer **79**(2): 300-7.
- Fusek, M. and V. Vetvicka (1994). "Mitogenic function of human pro-cathepsin D: the role of the propeptide." Biochem J **303 (Pt 3)**: 775-80.
- Garcia, M., et al. (1996). "Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis." Stem Cells **14**(6): 642-50.
- Glondou, M., et al. (2001). "A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells." Oncogene **20**(47): 6920-9.
- Gohring, U. J., et al. (1996). "Prognostic value of cathepsin D in breast cancer: comparison of immunohistochemical and immunoradiometric detection methods." J Clin Pathol **49**(1): 57-64.
- Goldhirsch, A., et al. (2005). "Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005." Ann Oncol **16**(10): 1569-83.
- Gonzalez-Vela, M. C., et al. (1999). "Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive invasive breast carcinoma." Histopathology **34**(1): 35-42.
- Griffiths, J. R. (1991). "Are cancer cells acidic?" Br J Cancer **64**(3): 425-7.
- Harbeck, N., et al. (2000). "Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer." Int J Biol Markers **15**(1): 79-83.
- Harbeck, N., et al. (2001). "Prognostic Impact of Proteolytic Factors (Urokinase-Type Plasminogen Activator, Plasminogen Activator Inhibitor 1, and Cathepsins B, D, and L) in Primary Breast Cancer Reflects Effects of Adjuvant Systemic Therapy." Clinical Cancer Research **Vol. 7**(September 2001): 2757-2764.

- Harvey, J. M., et al. (1999). "Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer." J Clin Oncol **17**(5): 1474-81.
- Herynk, M. H. and S. A. Fuqua (2004). "Estrogen receptor mutations in human disease." Endocr Rev **25**(6): 869-98.
- Hook, V., et al. (2005). "Inhibition of cathepsin B reduces beta-amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate beta-secretase of Alzheimer's disease." Biol Chem **386**(9): 931-40.
- Ioachim, E., et al. (1997). "Immunohistochemical expression of cathepsin D in correlation with extracellular matrix component, steroid receptor status and proliferative indices in breast cancer." Virchows Arch **431**(5): 311-6.
- Janni, W., et al. (2005). "Therapie des primären, invasiven Mammacarcinoms." Deutsches Ärzteblatt **102**(41): 2795-2804.
- Janni, W. J., et al. (2006). SUCCESS-Studie, Studienprotokoll. Berlin, Muenchen, Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie, Deutsche Krebsgesellschaft. **2006**.
- Jeschke, U., et al. (2006). "Development and characterization of monoclonal antibodies for the immunohistochemical detection of glycodelin A in decidual, endometrial and gynaecological tumour tissues." Histopathology **48**(4): 394-406.
- Jeschke, U., et al. (2005). "Expression of glycodelin protein and mRNA in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive ductal carcinomas, their lymph node and distant metastases, and ductal carcinomas with recurrence." Oncol Rep **13**(3): 413-9.
- Jeschke, U., et al. (2003). "Glycodelin and amniotic fluid transferrin as inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion." Histochem Cell Biol **119**(5): 345-54.
- Joensuu, H., et al. (1995). "Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer." Br J Cancer **71**(1): 155-9.
- Johansson, A. C., et al. (2003). "Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine." Cell Death Differ **10**(11): 1253-9.
- Joyce, J. A., et al. (2004). "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis." Cancer Cell **5**(5): 443-53.

- Julkunen, M., et al. (1988). "Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to beta-lactoglobulins." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 8845-9.
- Kagedal, K., et al. (2001). "The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress." Faseb J **15**(9): 1592-4.
- Kamarainen, M., et al. (1999). "Expression of glycodelin in human breast and breast cancer." Int J Cancer **83**(6): 738-42.
- Kamarainen, M., et al. (1997). "Expression of glycodelin in MCF-7 breast cancer cells induces differentiation into organized acinar epithelium." Lab Invest **77**(6): 565-73.
- Kaufmann, M., et al. (2005). "Primäre Therapie operabler Mammkarzinome- Ergebnisse der 9. internationalen Konferenz von St. Gallen." Deutsches Ärzteblatt **102**(22): 1265-1266.
- Keyomarsi, K., et al. (2002). "Cyclin E and survival in patients with breast cancer." N Engl J Med **347**(20): 1566-75.
- Koblinski, J. E., et al. (2000). "Unraveling the role of proteases in cancer." Clin Chim Acta **291**(2): 113-35.
- Koike, M., et al. (2003). "Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice." Mol Cell Neurosci **22**(2): 146-61.
- Koninckx, P. R., et al. (1992). "CA-125 and placental protein 14 concentrations in plasma and peritoneal fluid of women with deeply infiltrating pelvic endometriosis." Fertil Steril **57**(3): 523-30.
- Kostadima, L., et al. (2006). "Survivin and glycodelin transcriptional activity in node-positive early breast cancer: mRNA expression of two key regulators of cell survival." Breast Cancer Res Treat **100**(2): 161-7.
- Kruger, A. and L. Wojnowski (2006). "Kardiotoxizität von Anthrazyklinen- ein ungelöstes Problem." Dtsch. Arztebl **2006**(103(37)): A 2393-7.
- Kuiper, G. G., et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.
- Lebeau, A. (2003). Pathomorphologie des Mammakarzinoms. Manual Mammakarzinome. Tumorzentrum-München. München, W.Zuckerschwerdt Verlag: S. 41-59.

- Liaudet, E., et al. (1995). "Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors." Cell Growth Differ **6**(9): 1045-52.
- Liaudet-Coopman, E., et al. (2006). "Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis." Cancer Lett **237**(2): 167-79.
- Loeffler, G., et al. (2006). Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Springer.
- Look, M. P., et al. (2002). "Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients." J Natl Cancer Inst **94**(2): 116-28.
- Mandelin, E., et al. (2003). "Glycodelin in ovarian serous carcinoma: association with differentiation and survival." Cancer Res **63**(19): 6258-64.
- Maudelonde, T., et al. (1992). "Immunostaining of cathepsin D in breast cancer: quantification by computerised image analysis and correlation with cytosolic assay." Eur J Cancer **28A**(10): 1686-91.
- Maudelonde, T., et al. (1988). "Immunoenzymatic assay of Mr 52,000 cathepsin D in 182 breast cancer cytosols: low correlation with other prognostic parameters." Cancer Res **48**(2): 462-6.
- McGuire, W., et al. (1990). "Commentaries. How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients." J Natl Cancer Inst **82**: 1006-1015.
- Morikawa, W., et al. (2000). "Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells." J Biol Chem **275**(49): 38912-20.
- Morrow, D. M., et al. (1994). "Hematopoietic placental protein 14. An immunosuppressive factor in cells of the megakaryocytic lineage." Am J Pathol **145**(6): 1485-95.
- Mueller-Steiner, S., et al. (2006). "Antiamyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease." Neuron **51**(6): 703-14.
- Mukhopadhyay, D., et al. (2004). "Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification." J Biol Chem **279**(10): 8577-84.
- Mylonas, I., et al. (2000). "Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodelin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells

- of normal human endometrium." Histochem Cell Biol **114**(5): 405-11.
- Nakagawa, T., et al. (1998). "Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus." Science **280**(5362): 450-3.
- Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen (2000). Praxis der Immunhistochemie, Urban und Fischer.
- Nomura, T. and N. Katunuma (2005). "Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells." J Med Invest **52**(1-2): 1-9.
- Oehninger, S., et al. (1995). "Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida." Fertil Steril **63**(2): 377-83.
- Okamoto, N., et al. (1991). "Suppression by human placental protein 14 of natural killer cell activity." Am J Reprod Immunol **26**(4): 137-42.
- Osborne, C. K., et al. (2005). "Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy." Breast **14**(6): 458-65.
- Paik, S., et al. (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." N Engl J Med **351**(27): 2817-26.
- Paik, S., et al. (2006). "Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer." J Clin Oncol **24**(23): 3726-34.
- Paradiso, A., et al. (2001). "Randomized clinical trial of adjuvant fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy for patients with fast-proliferating, node-negative breast cancer." J Clin Oncol **19**(19): 3929-37.
- Piwnicka, D., et al. (2004). "Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance." Mol Endocrinol **18**(10): 2522-42.
- Pujol, P., et al. (1993). "A prospective study of the prognostic value of cathepsin D levels in breast cancer cytosol." Cancer **71**(6): 2006-12.
- Ravdin, P., et al. (2006). A sharp decrease in breast cancer incidence in the United States in 2003. San Antonio Breast cancer meeting, San Antonio, USA.

- Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue." Pathologe **8**(3): 138-40.
- Riemenschneider, M., et al. (2006). "The cathepsin D rs17571 polymorphism: effects on CSF tau concentrations in Alzheimer disease." Hum Mutat **27**(6): 532-7.
- Riittinen, L. (1992). "Serous ovarian cyst fluids contain high levels of endometrial placental protein 14." Tumour Biol **13**(3): 175-9.
- Roberg, K., et al. (2002). "Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts." Am J Pathol **161**(1): 89-96.
- Rocheftort, H., et al. (1987). "Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: a role in carcinogenesis?" J Cell Biochem **35**(1): 17-29.
- Rocheftort, H., et al. (1989). "Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer." J Steroid Biochem **34**(1-6): 177-82.
- Rodriguez, J., et al. (2005). "Clinical significance of cathepsin D concentration in tumor cytosol of primary breast cancer." Int J Biol Markers **20**(2): 103-11.
- Roger, P., et al. (1994). "Cathepsin D immunostaining in paraffin-embedded breast cancer cells and macrophages: correlation with cytosolic assay." Hum Pathol **25**(9): 863-71.
- Saftig, P., et al. (1995). "Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells." Embo J **14**(15): 3599-608.
- Schlesinger-Raab, A., et al. (2005). "Metastasiertes Mammakarzinom: Keine Lebensverlängerung seit 20 Jahren." Deutsche Ärzteblatt **102**(40): A-2706 / B-2280 / C-2154.
- Scorilas, A., et al. (1999). "Predictive value of c-erbB-2 and cathepsin-D for Greek breast cancer patients using univariate and multivariate analysis." Clin Cancer Res **5**(4): 815-21.
- Seppala, M., et al. (2002). "Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation." Endocr Rev **23**(4): 401-30.
- Shabani, N., et al. (2005). "Expression of glycodelin in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ,

- invasive carcinomas and their lymph node metastases." Anticancer Res **25**(3A): 1761-4.
- Silvestrini, R., et al. (1995). "Biologic and clinicopathologic factors as indicators of specific relapse types in node-negative breast cancer." J Clin Oncol **13**(3): 697-704.
- Sotiriou, C., et al. (2006). "Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis." J Natl Cancer Inst **98**(4): 262-72.
- Spyratos, F., et al. (1989). "Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer." Lancet **2**(8672): 1115-8.
- Swahn, M. L., et al. (1993). "Effect of tamoxifen alone and in combination with RU 486 on the endometrium in the mid-luteal phase." Hum Reprod **8**(2): 193-200.
- Taylor, R. N., et al. (1998). "Promegestone (R5020) and mifepristone (RU486) both function as progestational agonists of human glycodeilin gene expression in isolated human epithelial cells." J Clin Endocrinol Metab **83**(11): 4006-12.
- Thomssen, C., et al. (2003). "Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer." Onkologie **26**(5): 438-45.
- Thuerigen, O., et al. (2006). "Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer." J Clin Oncol **24**(12): 1839-45.
- Tomczak, S., et al. (1996). "Serum placental protein 14 (PP14) levels in patients with threatened abortion." Arch Gynecol Obstet **258**(4): 165-9.
- Tsukuba, T., et al. (2000). "New functional aspects of cathepsin D and cathepsin E." Mol Cells **10**(6): 601-11.
- Van Cong, N., et al. (1991). "The human placental protein 14 (PP14) gene is localized on chromosome 9q34." Hum Genet **86**(5): 515-8.
- van de Vijver, M. J., et al. (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." N Engl J Med **347**(25): 1999-2009.
- Vetvicka, V., et al. (2000). "Role of procathepsin D activation peptide in prostate cancer growth." Prostate **44**(1): 1-7.
- Vetvicka, V., et al. (1997). "Analysis of the interaction of procathepsin D activation peptide with breast cancer cells." Int J Cancer **73**(3): 403-9.

Volpi, A., et al. (2000). "Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study." Breast Cancer Res Treat **63**(3): 181-92.

Westley, B. R. and F. E. May (1987). "Oestrogen regulates cathepsin D mRNA levels in oestrogen responsive human breast cancer cells." Nucleic Acids Res **15**(9): 3773-86.

Wille, A., et al. (2004). "Cathepsin L is involved in cathepsin D processing and regulation of apoptosis in A549 human lung epithelial cells." Biol Chem **385**(7): 665-70.

www.adjuvantonline.com (2006). Decision making tools for health care professionals, Adjuvant! Inc. **2006**: San Antonio Data Base;

Ravdin, Siminoff, Davis, et al. JCO 19(4) 980-991, 2001.

Zhang, L., et al. (2003). "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer." N Engl J Med **348**(3): 203-13.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Elisabeth Barthell
Anschrift: Villacherstr.9, 80687 München
Telephon: 089 62728627(privat)
089-593806(dienstlich)
email: barthell@gmx.de
geboren: 8.5.68 in Nürnberg
Familienstand: in Lebensgemeinschaft, zwei Kinder (geb. 2005 und 2007)
Eltern: Rainer Barthell, Bankkaufmann
Heidrun Barthell, Apothekerin

Schulbildung:

1974-1987: Grundschule (Neuried bei München) und Gymnasium Fürstenried-West in München; allg. Hochschulreife (Note 2,0);
Leistungskurse Latein, Französisch., Chemie, Religion
1985-86: katholische Pfarrjugendleiterin

Hochschulbildung:

1987-1989 vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
1989-1994 klinisches Studium, Technische Universität München
1990/91 Teilnahme am Modellstudiengang Naturheilweisen
1994 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung,(Note sehr gut, Gesamtnote gut)

Famulaturen:

1990-1991 Chirurgie (Barmherzige Bruder, Regensburg)
Ambulanz d. Frauenklinik München rechts der Isar
Gynäkologie u. Geburtshilfe (Lower Bucks hospital, Bristol bei Philadelphia, USA)
Allgemeinmedizin (Justizvollzugsanstalt Stadelheim, München)
Dermatologie (Hopital St. Charles, Montpellier)

Praktisches Jahr:

11/93-9/94 Innere Medizin (Klinikum Passau)
Chirurgie (Trinity College, St. James hospital, Dublin)
Gynäkologie u. Geburtshilfe (Straubing)

Tätigkeit als studentische Hilfskraft:

1990-93 Gynäkologie und anästhesiologische Intensivstation,
Klinikum rechts der Isar, München

klinische Tätigkeit:

7/95-12/96 AiP im Kreiskrankenhaus Tegernsee (Gynäkologie u. Geburtshilfe)
1/97-2/98 Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Tegernsee (Gynäkologie)
4/98 -3/2001 Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Eggenfelden,
Chefarzt Dr. Siebert, Gynäkologie u. Geburtshilfe, Facharztzeugnis
4/2001-12/2002 Assistenzärztin in der gynäkologischen Praxis Drs. Leifels-
Fischer/Schulze in München
4/2003 Facharztprüfung
10/2002-12/2007 Assistenzärztin in der I. Universitätsfrauenklinik München (LMU)
Prüfärztin für die "F.U.T.U.R.E"-Studie (HPV-Impfung)
Hormonsprechstunde
teilweise Leitung der Dysplasiesprechstunde und der Ambulanz
7.1.2008 Niederlassung als Frauenärztin im jobsharing 50/50
(Lindwurmstr.10, 80337 München)

Fortbildung:

- Dopplersonographie in Geburtshilfe u. Gynäkologie, Abschlußkurs
- Mammasonographie (Grund- u. Aufbaukurs, KV-Zulassung)
- Abdomensonographie (Grundkurs)
- Fortbildungsreihe fetale Echokardiographie (1997/98)
- regelmäßige Weiterbildung in pränataler Sonographie, u.a. Zertifizierung im Ersttrimesterscreening, Pränatalsymposien
- Kurs für Urodynamik, Dr. Anthuber, Klin. Großhadern
- Balintgruppe, psychosomatische Grundversorgung
- Fluorkurs, Prof. Weißenbacher, Klin. Großhadern
- regelmäßige Einzelfortbildungen und Kongresse, Dt. u. bayr. Gynäkologenkongreß, DKG, ECCO , HPV-Symposium
- GABG-Treffen (Mammakarzinom)
- Diagnostik u. Therapie des Mammakarzinoms 2/2002 (Großhadern)
- Fachkunde Rettungsdienst, Kurse A-D
- Hospitationen in der gyn. Strahlentherapie der I. UFK München, Prof. Willgeroth
- 12. Weiterbildungsseminar für Assistenten im letzten Jahr der Weiterbildung Gynäkologie, Augsburg 2002
- Intensivkurs gynäkologische Endokrinologie u. Reproduktionsmedizin 2002 und 2004, München, I.UFK

- Kurs Laser in der Medizin (Sachkunde u. Befähigung zur Laserschutzbeauftragten) 3/2004
- Kolposkopiestandardisierungskurs der Firma Merck, USA
- Kolposkopiezertifizierung der AG für Zervixpathologie 2005

Vortragstätigkeit und Veröffentlichung:

ab 2004

Unterricht in Geburtshilfe an der staatlichen Hebammenschule München

Hausfortbildung; aktuelle Aspekte der Kontrazeption

Teenager-Infoabend zum Thema Kontrazeption

mehrere Vorträge zum Thema präventive HPV-Impfung: Münchner Impftag, DGPI-Kongreß, key account-Tagung der Firma MSD, Studententreffen der Firma MSD, bayrisch-österreichischer Gynäkologenkongreß 2007

anticancer research 27-2007: immunohistochemical visualisation of Cathepsin-D expression in breast cancer

Deutscher Krebskongreß 2006: Poster zum Thema Glycodelinexpression an Mammakarzinomtumoren

Danksagung

Professor Friese bin ich dankbar für beständige Erinnerungen und die Toleranz des status sine "Dr". Herr PD Udo Jeschke hatte immer ein offenes Ohr für Sorgen und Nöte und stand mit Rat und Tat unkompliziert zur Seite. Herrn PD Ioannis Mylonas sei herzlich gedankt für das Anstoßen des Themas und die Ermutigungen sowie fachlichen Ratschläge. Beide mußten mich während des Voranschreitens der Dissertation auch durch zwei Schwangerschaften begleiten und die entsprechenden Verzögerungen ertragen. Nicht nur Dr. Mylonas und Dr. Jeschke sondern vor allem Susanne Kunze und Christina Kuhn sind für eine sehr warme und herzliche Atmosphäre im Labor verantwortlich und haben mich in die technischen Abläufe eingeweiht.

Meinem Partner Dr. Friedrich Strauß danke ich für große Geduld und Beharrlichkeit sowie Beratung bei Problemen mit word.

Meine Eltern waren immer für mich da, haben mir überhaupt erst das Medizinstudium ermöglicht und damit die Grundlage für meinen Werdegang gelegt.