

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

**Expression von E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1 bei  
einherdigen im Vergleich zu mehrherdigen Mammakarzinomen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
(Dr. med.)  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu München

vorgelegt von

Eva Hirte  
aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. U. Jeschke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Rainer Wiedemann  
Priv. Doz. Dr. Doris Mayr

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. T. Weißenbacher

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2013

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Einleitung.....	5
1.2 Fragestellung.....	9
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Material.....	11
2.1.1 Geräte .....	11
2.1.2 Reagenzien .....	11
2.1.3 Antikörper.....	13
2.1.4 Patientinnen .....	14
2.1.4.1 Studiengruppe.....	14
2.1.4.2 Matched-Pair-Gruppe.....	14
2.1.4.3 Gesamtkollektiv.....	15
2.2 Das immunhistochemische Verfahren .....	16
2.2.1 Vorbereitung.....	16
2.2.1.1 Gewebefixierung .....	16
2.2.1.2 Vorgang des Einbettens.....	16
2.2.1.3 Schneiden am Mikrotom .....	16
2.2.2 Die immunhistochemische Färbung.....	17
2.2.2.1 Nachweis von E-Cadherin.....	17
2.2.2.2 Nachweis von Beta-Catenin.....	17
2.2.2.3 Nachweis von Mucin-1 .....	18
2.2.2.4 Das Färbeprotokoll.....	19
2.3 Auswertung und statistische Methoden .....	21
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
3.1 Übersichtsdaten.....	23
3.1.1 Altersverteilung.....	23
3.1.1.1 Matched-Pair-Gruppe.....	23
3.1.1.2 Gesamtkollektiv.....	23
3.1.2 Menopausenstatus .....	24
3.1.2.1 Matched-Pair-Gruppe.....	24
3.1.2.2 Gesamtkollektiv.....	24
3.1.3 TumorgroÙe .....	25
3.1.3.1 Matched-Pair-Gruppe.....	25
3.1.3.2 Gesamtkollektiv.....	25
3.1.4 Lymphknotenstatus .....	27
3.1.4.1 Matched-Pair-Gruppe.....	27
3.1.4.2 Gesamtkollektiv.....	27
3.1.5 Grading .....	28

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.5.1	Matched-Pair-Gruppe.....	28
3.1.5.2	Gesamtkollektiv.....	29
3.1.6	Histologie .....	30
3.1.6.1	Matched-Pair-Gruppe.....	30
3.1.6.2	Gesamtkollektiv.....	31
3.2	E-Cadherin .....	32
3.2.1	Matched-Pair-Gruppe.....	32
3.2.2	Gesamtkollektiv .....	33
3.3	Beta-Catenin.....	37
3.3.1	Matched-Pair-Gruppe.....	37
3.3.2	Gesamtkollektiv .....	38
3.4	Mucin-1 .....	40
3.4.1	Mucin-1-Darstellung mittels PankoMab.....	40
3.4.1.1	Matched-Pair-Gruppe.....	40
3.4.1.2	Gesamtkollektiv.....	42
3.4.2	Vergleich der Mucin-1-Darstellung mittels PankoMab, VU-4-H5 und DF3 .....	43
3.5	Verhältnis der Moleküle E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1 .....	44
3.5.1	Matched-Pair-Analyse .....	44
3.5.2	Gesamtkollektiv.....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>62</b>
7.1	Übersichtstabelle der Patientencharakteristik.....	62
7.2	Fotos.....	64
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>67</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	(Strept-)Avidin-Biotin-Komplex.....	21
Abbildung 3.1:	E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores bei Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen, gematched nach Grading, Lymphknoten- und Größenstadium des Tumors.....	33
Abbildung 3.2:	E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores bei Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen .....	34
Abbildung 3.3:	Verteilung der E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit einherdigen Mammakarzinomen.....	35
Abbildung 3.4:	Verteilung der E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit mehrherdigen Mammakarzinomen .....	36
Abbildung 3.5:	Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores bei Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen, gematched nach Grading, Lymphknoten- und Größenstadium des Tumors .....	37
Abbildung 3.6:	Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores bei , Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen .....	38
Abbildung 3.7:	Verteilung der Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit einherdigen Mammakarzinomen.....	39
Abbildung 3.8:	Verteilung der Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit mehrherdigen Mammakarzinomen .....	40
Abbildung 3.9:	Darstellung der Mucin-1-Expression (PankoMab) anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit einherdigen (grün) und mehrherdigen (blau) Mammakarzinomen .	41
Abbildung 3.10:	Verteilung der Mucin-1-Expression (PankoMab) anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei unifokalen Mammakarzinomen .....	42
Abbildung 3.11:	Verteilung der Mucin-1-Expression (PankoMab) anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei multifokalen/multizentrischen Mammakarzinomen.....	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Geräte .....	11
Tabelle 2.2:	Verwendete Antikörper .....	13
Tabelle 2.3:	Verwendete Antikörper .....	13
Tabelle 3.1:	Verteilung der TumorgroÙe bei den einherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs.....	25
Tabelle 3.2:	Verteilung der TumorgroÙe bei den mehrherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs.....	26
Tabelle 3.3:	Verteilung des Lymphknotenstatus bei den einherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs.....	27
Tabelle 3.4:	Verteilung des Lymphknotenstatus bei den mehrherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs.....	28
Tabelle 3.5:	Verteilung des Gradings bei den einherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs .....	29
Tabelle 3.6:	Verteilung des Gradings bei den mehrherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs.....	29
Tabelle 3.7:	Histologie der einherdigen Mammakarzinome der Matched-Pair-Gruppe .....	30
Tabelle 3.8:	Histologie der mehrherdigen Mammakarzinome der Matched-Pair-Gruppe .....	30
Tabelle 3.9:	Histologie der einherdigen Mammakarzinome des Gesamtkollektivs .....	31
Tabelle 3.10:	Histologie der mehrherdigen Mammakarzinome des Gesamtkollektivs.....	32
Tabelle 7.1:	Patientencharakteristik Matched-Pair-Gruppe .....	62
Tabelle 7.2:	Patientencharakteristik Gesamtkollektiv .....	63

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Einleitung

Das Mammakarzinom ist der weltweit häufigste maligne Tumor der Frau und gilt in den Industrieländern als die häufigste tumorassoziierte Todesursache der Frau. Schätzungen der Global Cancer Statistics vermuten für Brustkrebs im Jahr 2010 eine Neuerkrankungsrate von 1,5 Millionen Fällen weltweit [1]. In Deutschland schätzt das Robert-Koch-Institut für das Jahr 2010 die Mammakarzinom-Neuerkrankungsrate auf knappe 60 000 [2]. Die Inzidenz steigt bereits ab dem 20. Lebensjahr deutlich an und erreicht den Höhepunkt zwischen dem 65. und 69. Lebensjahr [3]. Das Tumorregister München registrierte im Jahr 2004 sogar einen Brustkrebsfall einer 18-jährigen Patientin [4]. Das Lebenszeitrisiko für eine Frau an Mammakarzinom zu erkranken liegt in Deutschland bei ca. 9,2% [5]. Durch diese Epidemiologie haben das Mammakarzinom und die Erforschung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze einen hohen Stellenwert in der Gynäkologie und Onkologie.

Die Therapieansätze zur Behandlung von Brustkrebs haben sich in den letzten Jahren verändert und wurden zusehends spezifischer und auch individueller auf die Erkrankung der Patientinnen abgestimmt. Entscheidend ist nach wie vor die TNM (tumor-node-metastasis)-Klassifikation, da sie über die Prognose und weitere Therapie einer Patientin maßgeblich bestimmt.

Nach den aktuellen Leitlinien aus dem Jahr 2008 [6] sollten folgende Kriterien bei der mikroskopischen, pathologisch-anatomischen Dokumentation des operativ entfernten Mammakarzinoms untersucht werden:

Grading, histologischer Subtyp, Tumorgroße, Multifokalität/-zentrität, Resektionsrandstatus, peritumorale Lymphgefäßinvasion, TNM-Klassifikation, Hormonrezeptorstatus und HER-2-Status.

Bezüglich der Mehrherdigkeit und der Unterscheidung von Multifokalität und Multizentrität weisen die oben genannten Leitlinien darauf hin, dass es noch keine einheitliche internationale Definition gibt. Sie sprechen sich aber für folgende Zuordnung aus:

Multifokalität bezeichnet mindestens zwei voneinander getrennte maligne Tumorherde in einem Quadranten, während Multizentrität als Auftreten von mindestens zwei getrennten Herden in unterschiedlichen Quadranten definiert ist.

Aufgrund unterschiedlicher Brustgrößen ist eine strikte Einteilung der Herdigkeit nach Quadranten jedoch ungenau. Faverly et al. [7] sprach sich bereits 1994 für eine genauere Einteilung aus. Das Auftreten von mindestens zwei getrennten malignen Tumorherden beschrieb er als multifokal, wenn der Abstand zwischen den Herden kleiner als 4cm war. Von Multizentrität sprach er, wenn der Abstand 4cm oder größer war. In der aktuell verfügbaren Fachliteratur finden sich bezüglich des Übergangs von Multifokalität zu Multizentrität unterschiedliche Grenzen von 2cm [8], 3cm [9] und 3-4cm [10] neben der immer noch bestehenden Einteilung nach Quadranten [11]. Auch ist es bis dato nicht geklärt, ob es sich bei multifokalen Herden nicht auch um biologisch einen Tumor mit Satellitenherden handeln könnte. Nach dem National Cancer Institute gehen multifokale Karzinome aus einem Ursprungstumor hervor, wohingegen multizentrische Mammakarzinome sich getrennt voneinander entwickelt haben [12].

Karzinome werden seit mehr als 50 Jahren mittels der TNM-Klassifikation eingeteilt. Für Brustkrebs schlägt die 2009 verabschiedete und aktuell gültige 7.Auflage [13] keine Änderungen zur Angabe der Tumorgröße bei multiplen Mammakarzinomen vor und hält sich damit an die vorherige, 2003 verabschiedete Auflage [14-15].

Bezüglich mehrherdiger Karzinome wird in der gegenwärtigen TNM-Klassifikation die tatsächliche Tumorgröße und somit die gesamte Tumorlast nicht ausreichend berücksichtigt. Bei mehrherdigen Karzinomen wird derzeit lediglich der Tumorherd mit dem größten Durchmesser angegeben. In einer ausführlichen Dokumentation sollte die Anzahl der Herde in Klammern hinter die Tumorgröße in der TNM-Klassifikation mit angegeben werden [13, 16]. Die tatsächliche Tumorlast wird auch hier nicht berücksichtigt.

Es konnte in zuletzt veröffentlichten Studien gezeigt werden, dass die TNM-Klassifikation bezüglich der Mehrherdigkeit und der aus der Stadieneinteilung resultierenden Therapieentscheidung für die betroffenen Patientinnen eine Fehleinschätzung von Prognose und Therapieansatz darstellen kann.

So verglichen Studien ein- und mehrherdige Mammakarzinome bezüglich Überleben [17] und axillärer Lymphknotenbeteiligung [18-19] und stellten fest, dass unter



Berücksichtigung der kumulativen Tumormasse von mehrherdigen Karzinomen keine signifikanten Unterschiede zu größenidentischen unifokalen Karzinomen deutlich wurden. Es traten jedoch Unterschiede auf, wenn bei mehrherdigen Karzinomen lediglich der Tumorherd mit dem größten Durchmesser in die Bewertung einging. Die Autoren wiesen auf die Gefahr hin, multifokale bzw. multizentrische Mammakarzinome im Hinblick auf ihre Tumorlast zu unterschätzen. Neuere Daten haben zudem mittels Matched-Pair-Analyse gezeigt, dass mehrherdige Mammakarzinome im Vergleich zu einherdigen Mammakarzinomen bei identischem TNM-Stadium ein geringeres Gesamtüberleben, häufiger Lokalrezidive und vermehrt Fernmetastasen zeigen [20]. Die Prognose von mehrherdigen Karzinomen scheint also im Vergleich zu einherdigen Karzinomen bei identischem TNM-Stadium schlechter zu sein.

Ob sich einherdige und mehrherdige Tumoren aber auch in der Tumorbilogie unterscheiden ist derzeit noch kaum erforscht. Aufgrund neuer wissenschaftlicher Ergebnisse wird in der Literatur zunehmend eine unterschiedliche Tumorbilogie von einherdigen, multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen diskutiert.

Mit der vorliegenden Studie wurden in einem retrospektiven Ansatz erstmals Oberflächenmoleküle bei unifokalen und multifokalen/multizentrischen Mammakarzinomen vergleichend untersucht. Um Unterschiede in der Tumorbilogie zu eruieren, untersuchten wir die Expression der Moleküle E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1 in ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen.

E-Cadherin ist ein transmembranes Glykoprotein und wird vor allem im Epithel exprimiert, wo es den Interzellulärraum überbrückt. Die extrazelluläre N-terminale Domäne übernimmt die Calcium-abhängige Zell-Adhäsionsfunktion, die zytoplasmatische C-terminale Untereinheit interagiert unter anderem mit Beta-Catenin [21]. E-Cadherin spielt bei der Ausdifferenzierung von Epithelzellen insofern eine Rolle, als dass es zum einen die Zell-Zell-Adhäsion und apiko-basale Polarität aufbaut, zum anderen als negativer Regulator des Wnt-Signalweges fungiert [22].

Erfüllt E-Cadherin die Aufgabe als Inhibitor des Wnt-Signalweges, wie es in gesunden Zellen der Fall ist, ist Beta-Catenin an den Adhärenz junctions lokalisiert

und stellt das Bindeglied zwischen E-Cadherin und  $\alpha$ -Aktin her. Beta-Catenin ist also für eine funktionierende Zelladhäsion notwendig.

In Karzinomen epithelialer Herkunft, wie dem kolorektalen Karzinom und dem Magenkarzinom [23], dem Pankreaskarzinom [23-24] oder auch dem Mammakarzinom [21, 25], wird häufig eine reduzierte E-Cadherin-Expression festgestellt, was mit einem aggressiven Tumorverhalten und schlechterer Prognose einherzugehen scheint [21]. Invasive lobuläre Mammakarzinome zeigen sogar einen kompletten E-Cadherin-Verlust. Sie metastasieren häufiger und früher in Wirbelsäule und Becken und zeigen häufiger eine Meningealkarzinose [26]. Bei invasiv lobulären Karzinomen konnten Mutationen im CDH1-Gen [27-28], dem Gen, das E-Cadherin kodiert, oder eine Herabregulation [29] dieses Gens gefunden werden. Die Veränderungen des CDH1-Gens wurden bei invasiv duktalem Mammakarzinomen nicht nachgewiesen [27] und scheinen eine mögliche, aber nicht die alleinige Ursache für den E-Cadherin-Verlust der invasiven lobulären Karzinome und auch der nicht-invasiven lobulären Karzinome (CLIS) zu sein.

Eine Minderung der E-Cadherin-Expression bietet die Basis für Trennung und Invasion von Tumorzellen und legt damit den Grundstein für eine potentielle Metastasenbildung [22]. Des Weiteren wird der Wnt-Signalweg gefördert, der seinerseits die Akkumulation von Beta-Catenin im Zytoplasma anregt [30]. Beta-Catenin lokalisiert sich nun nicht mehr an Adhärenz junctions, sondern im Nukleus, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt. Es wird vermutet, dass Mucin-1 als Trägermolekül für Beta-Catenin fungiert [31].

Mucin-1 findet sich im gesunden Organismus apikal als Transmembranmolekül an sekretorischen Epithelzellen und kommt in überexprimierter Form bei Lungen-, [32], Pankreas-, Ovarial- und Mammakarzinomen vor [32-33]. Seine C-terminale Untereinheit bildet den transmembranen Teil des Moleküls, während die N-terminale Untereinheit in den Extrazellulärraum ragt [33]. Die N-terminale Domäne kann sich auf noch ungeklärte Weise von der transmembranen Domäne lösen und diese als Rezeptor zurücklassen. Die zytoplasmatische Domäne von Mucin-1-C (Mucin-1-CD) kann bei Verlust der Zellpolarität mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen interagieren und so auf Gentranskription wirken [32, 34-35].

Ein irreversibler Polaritätsverlust kommt gehäuft bei Tumorzellen vor. Mucin-1 verteilt sich dann von seiner ursprünglichen apikalen Lokalisation über die gesamte Zelle.

Diese Überexpression von Mucin-1 ist verknüpft mit einer verminderten Glykosylierung der Mucin-1-N-Tandem-repeats [32].

Mucin-1 scheint auf vielfältige Weise in die Zell-Zell-Interaktion und Genexpression einzugreifen. Für diese Arbeit ist seine bereits erwähnte Interaktion mit Beta-Catenin von besonderer Wichtigkeit. So kann Mucin-1 die Cadherin-abhängige Zell-Zell-Adhäsion zum einen durch sterische Effekte, zum anderen durch Bindung an Beta-Catenin blockieren [36]. Beta-Catenin stellt nämlich sowohl für E-Cadherin, als auch für Mucin-1 einen Interaktionspartner dar. Deshalb konkurrieren beide letzteren Moleküle um Beta-Catenin [34, 37]. Mucin-1-CD verhilft Beta-Catenin in den Nukleus, wo Beta-Catenin als Transkriptionsfaktor im Wnt-Signalweg unter anderem Zellproliferation und -differenzierung fördert [30, 32, 35].

Der Verlust der Beta-Catenin-E-Cadherin-Bindung gewährleistet eine ineffektivere Zelladhäsion und somit eine unter anderem durch Mucin-1 verursachte Zerstörung der Adhärenz junctions. Des Weiteren ist eine Mucin-1-C-Überexpression möglicherweise mit einer Reduzierung der E-Cadherin-Expression vergesellschaftet [32], was ebenso die Zelladhäsion mindern würde.

### **1.2 Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Studie war es, Unterschiede in der Expression genannter Glykoproteine und somit in der Tumorbilogie zwischen ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen zu evaluieren. Die bereits erwähnten und mehrfach nachgewiesenen Unterschiede in der Prognose in Abhängigkeit von der Herdigkeit könnten hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden in vorliegender Arbeit Matching-Paare gebildet. Sie stimmten hinsichtlich Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Grading überein. Wir verglichen 23 einherdige mit 23 mehrherdigen Mammakarzinompatientinnen aus den Jahren 2000-2002. Dazu untersuchten wir weitere 34 unifokale und 32 multifokale/multizentrische Mammakarzinome aus den gleichen Jahrgängen, die jedoch keinen Match-Kriterien unterworfen waren.

Die Paraffinschnitte der Patientinnen wurden immunhistochemisch auf die Expression der Oberflächenmoleküle E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1 untersucht.

## Einleitung und Fragestellung

---

Des Weiteren verglichen wir drei unterschiedliche Mucin-1-Antikörper im Hinblick auf ihre Aussagekraft bezüglich der Mucin-1-Expression.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Pipetten	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Objektträger Superfrost Ultra Plus® und Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG; Saarbrücken, Deutschland
Mikroskop Leitz Diaplan	Leitz; Wetzlar, Deutschland
Brutschrank	Heraeus; Hanau, Deutschland
Kamera KY-F55B	JVC
Kochfeld Typ THL 2597	Rommelsbacher; Dinkelsbühl, Deutschland
Schnellkochtopf vitafit®	Fissler GmbH, Deutschland
Schlittenmikrotom Hn40	Reichert-Jung; Leica; Wetzlar, Deutschland

**Tabelle 2.1: verwendete Geräte**

#### 2.1.2 Reagenzien

Für den Vorgang des Entparaffinierens der Paraffinschnitte wurde Xylol der Firma J.T.Baker (Deventer, Niederlande) verwendet. Die Alkohole, sowie das während des immunhistochemischen Färbeprozesses verwendete saure Hämalaun (nach P.Mayer) stammten aus der Apotheke Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde 30%iges Wasserstoffperoxid der Firma VWR International S.A.S (Briare, Frankreich) mit Methanol der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) gemischt.

## Material und Methoden

---

Die Demaskierung durch Hitzevorbehandlung erfolgte mit Natrium-Citratpuffer (pH=6,0), bestehend aus Lösung A [21,01g 0,1M Zitronensäure (Firma: Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland) in einem Liter destilliertem Wasser] und Lösung B [29,41g 0,1M Natrium-Citrat (Firma: Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland) in einem Liter destilliertem Wasser].

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser der Firma Noll Karl W. Wasserdistillation (München, Deutschland) beziehungsweise mit PBS(Phosphate-Borate-Saline)-Puffer (Dulbecco) der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) gewaschen.

Als Detektionssysteme dienten Vectastain® ABC KIT für Mouse-IgG- und Rabbit-IgG-Antikörper der Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA).

Für die Substratfärbung bezogen wir DAB (3,3 Diaminobenzidin) und Chromogen von Dako North America Inc. (Carpinteria, USA). Hier erhielten wir ebenso das Dako-Verdünnungsmedium, das ausschließlich für die Färbung von Mucin1 benötigt wurde.

Als Negativkontrollseren wurden, je nach Herkunft des verwendeten Primärantikörpers, entweder Maus-isotypspezifische Kontrollreagenzien (X0931; Klon Dak-GO1) der bereits oben erwähnten Firma Dako oder präimmunes Kaninchenserum (HK408; Rabbit Super Sensitive™ Negative Control, 17ml) der Firma BioGenex (BioGenex Laboratories; San Ramon, USA) benutzt.

Weiterhin wurde zum Eindecken der Paraffinschnitte Thermo Scientific Shandon Consul-Mount der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) verwendet.

### 2.1.3 Antikörper

Die Paraffinschnitte jeder Patientin wurden gesondert mit folgenden Antikörpern angefärbt:

Name	Antikörper-eigenschaften	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-E-Cadherin; Klon: HECD-1	Monoklonaler Maus-IgG1- Antikörper	1:80	Calbiochem	205601
Anti-Beta-Catenin	Polyklonaler Kaninchen-IgG- Antikörper	1:100	Diagnostic BioSystems	RP 80
Anti-Mucin1; Klon: PankoMab™	Monoklonaler Maus-IgG1- Antikörper	1:550	Glycotope	MAB-P101

**Tabelle 2.2: verwendete Antikörper**

Die 46 Gewebeschnitte, die für die Matched-Pair-Analyse verwendet wurden, wurden zusätzlich mit folgenden Antikörpern angefärbt:

Name	Antikörper-eigenschaften	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-Mucin 1 Klon: VU-4-H5	Monoklonaler Maus-IgG1- Antikörper	1:600	Zymed	18-2298
Anti-CA 15-3 Klon: DF3	Monoklonaler Maus-IgG1- Antikörper	1:400	Dako Cytomation	M3518

**Tabelle 2.3: verwendete Antikörper**

## **2.1.4 Patientinnen**

### **2.1.4.1 Studiengruppe**

Für diese Studie wurde das archivierte Gewebe von 112 an Mammakarzinom erkrankten Patientinnen ausgewählt, die in den Jahren 2000 bis 2002 in der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Campus Innenstadt, operativ behandelt wurden. Auswahlkriterien waren das Vorhandensein einer invasiven Tumorkomponente, sowie zunächst mehrherdige Mammakarzinome.

Grading (histopathologische Tumordifferenzierung), histologischer Subtyp, TNM-Stadium, Herdigkeit, sowie Menopausenstatus und das Patientenalter zum Operationszeitpunkt wurden aus den Unterlagen des Archivs und der internen Mammakarzinomdatenbank (Prof. Dr. Genz; Version 3.1; Stand 09/2005) entnommen. In einigen Patientenunterlagen fanden sich keine Informationen über den histologischen Subtyp oder die histopathologische Tumordifferenzierung. Die fehlenden Daten konnten größtenteils durch das Pathologische Institut der LMU München nachträglich erhoben werden. Dies geschah an Gewebeschnitten der entsprechenden Patientinnen, die mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) angefärbt waren. Des Weiteren waren bei einigen Patientinnen keine Angaben zum Menopausenstatus vorhanden, welcher retrospektiv nicht mehr mit Sicherheit auszumachen war. Auch das TNM-Stadium wies bei wenigen Patientinnen Lücken auf. Diese Patientinnen wurden außerhalb der gematchten Gruppe im Rahmen des Gesamtkollektivs ausgewertet.

Die Mammakarzinome wurden je nach ihrer Herdigkeit in die einherdige oder mehrherdige Gruppe eingeteilt.

### **2.1.4.2 Matched-Pair-Gruppe**

Matching-Kriterien waren Tumorgröße, Grading und Lymphknotenstatus.

Aus dem Kollektiv von insgesamt 112 Patientinnen konnten 46 Frauen gematcht werden. Es wurden demnach zwei Gruppen mit jeweils 23 Paaren gebildet. Die eine



Gruppe enthielt nur Patientinnen mit unifokalen Karzinomen, die andere Gruppe schloss nur mehrherdige Mammakarzinome ein. Die mehrherdigen Karzinome beinhalteten neben rein multifokalen Karzinomen ein rein multizentrisches Karzinom und ein Karzinom multifokalen und multizentrischen Charakters.

Durch die Anwendung der Matched-Pair-Analyse wurde Strukturgleichheit geschaffen. Diese Technik senkt die Wahrscheinlichkeit, dass wahrgenommene Unterschiede aus der Disparität des Patientenkollektivs resultieren und sie erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass wahrgenommene Unterschiede aus der Eigenschaft der Herdigkeit resultieren.

### **2.1.4.3 Gesamtkollektiv**

Das Kollektiv zählte insgesamt 112 Karzinome, darunter 57 einherdige und 55 mehrherdige Karzinome.

Die Matched-Pairs waren Teil des Gesamtkollektivs.

Unter den mehrherdigen Karzinomen waren neben den rein multifokalen Mammakarzinomen vier Karzinome rein multizentrisch und weitere vier gemischt multizentrisch und multifokal.

## **2.2 Das immunhistochemische Verfahren**

### **2.2.1 Vorbereitung**

#### **2.2.1.1 Gewebefixierung**

Das von den Patientinnen während der Operation entnommene Gewebe wurde sofort in 4%igem neutral gepufferten Formalin fixiert, um die für den Autolyseprozess verantwortlichen Enzyme zu inaktivieren. Die Formalinfixierung erfolgte für 24 Stunden. Das Fixationsmittel wurde anschließend mit Leitungswasser herausgewaschen.

#### **2.2.1.2 Vorgang des Einbettens**

Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurde das Wasser aus dem Gewebe beseitigt. Das Intermedium Xylol entfernte wiederum den Alkohol aus den Gewebestücken und das auf 60°C erhitzte Paraffin konnte eindringen. Anschließend wurde das Gewebe in eine kleine Gießform gelegt und mit flüssigem Paraffin übergossen, so dass Blöcke entstanden, die nach Erkalten im Eisfach gekühlt wurden.

Diese Blöcke wurden im Archiv der Frauenklinik der LMU, Campus Innenstadt, gelagert und für diese Arbeit verwendet.

#### **2.2.1.3 Schneiden am Mikrotom**

Mit Hilfe des Schlittenmikrotoms wurden von den Paraffinblöcken 2-3 µm dünne Gewebsschnitte auf speziell für die Immunhistochemie beschichtete Objektträger (Punkt 2.1.1) aufgezogen und anschließend in einem Heraeus-Brutschrank bei 55°C getrocknet.

## **2.2.2 Die immunhistochemische Färbung**

### **2.2.2.1 Nachweis von E-Cadherin**

Zur Darstellung von E-Cadherin wurde der Klon HECD-1 der Firma Calbiochem als E-Cadherin-Antikörper verwendet. Es handelt sich hierbei um einen monoklonalen Maus-IgG1-Antikörper. Er wurde mit einer Verdünnung von 1:80 in sterilem PBS verdünnt. Als Detektionssystem diente Vectastain® ABC KIT für Maus-IgG-Antikörper der Vector Laboratories Inc.

Als Positiv- und Isotypkontrolle benutzten wir Haut, als Negativkontrolle Lymphknoten. Für die Isotypkontrolle verwendeten wir den monoklonalen Maus-Antikörper X0931 der Firma Dako (Klon DAK-GO1), der keine Haftung an humanen Antigenen zeigt. Zur Herstellung gleicher Konzentrationsverhältnisse zum Primärantikörper erfolgte die Verdünnung mit sterilem PBS.

Das genaue Färbeprotokoll findet sich unter Punkt 2.2.2.4

### **2.2.2.2 Nachweis von Beta-Catenin**

Zum Nachweis von Beta-Catenin wurde der Anti-Beta-Catenin Antikörper der Firma DiagnosticBioSystems gewählt. Es handelt sich dabei um einen polyklonalen IgG-Kaninchen-Antikörper. Er wurde 1:100 in Blockierungsserum verdünnt, das, wie auch die anderen Komponenten des Detektionssystems, vom Vectastain® ABC KIT für Kaninchen-IgG-Antikörper entnommen wurde.

Für Positiv- und Isotypkontrolle wurde Haut verwendet, für die Negativkontrolle ein Lymphknotenpräparat. Als Isotypkontrollreagenz diente Kaninchenserum (HK408-7R; Rabbit Super Sensitive™ Negative Control, 17ml) der Firma BioGenex. Es wurde gebrauchsfertig geliefert und daher nicht verdünnt.

Das genaue Färbeprotokoll findet sich unter Punkt 2.2.2.4

### 2.2.2.3 Nachweis von Mucin-1

Für die Darstellung von Mucin-1 wurden drei Antikörper verwendet.

Alle Patientenschnitte wurden mit dem Anti-Mucin-1-Klon PankoMab der Firma Glycotope angefärbt. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Maus-IgG1-Antikörper. Bei einer Antikörperkonzentration von 1,39 mg/dl (Lot.nr.: 186A) wurde der Primärantikörper 1:550 in Dako-Verdünnungsmedium verdünnt.

Als Detektionssystem diente Vectastain® ABC KIT für Maus-IgG-Antikörper der Vector Laboratories Inc.

Für die Positiv- und Isotypkontrolle benutzten wir Ovarialkarzinomgewebe, als Negativkontrolle Gehirn. Für die Isotypkontrolle verwendeten wir den monoklonalen Maus-Antikörper X0931 der Firma Dako (Klon DAK-GO1). Zur Herstellung gleicher Konzentrationsverhältnisse zum Primärantikörper erfolgte die Verdünnung mit Dako-Verdünnungsmedium.

Bei den 23 Matchingpaaren wurde die Mucin-1-Expression zusätzlich mit dem Anti-Mucin-1-Klon VU-4-H5, einem monoklonalen Maus-IgG1-Antikörper der Firma Zymed, dargestellt. Die Verdünnung erfolgte 1:600 in Dako-Verdünnungsmedium. Es kamen das gleiche Detektionssystem, sowie die gleichen Positiv-, Negativ- und Isotypkontrollen wie bei der PankoMab-Färbung zur Anwendung. Das Isotypkontrollreagenz wurde mit Dako-Verdünnungsmedium auf die identische Konzentration des Primärantikörpers verdünnt.

Außerdem wurde zur Darstellung von Mucin-1 bei den 23 Wertepaaren der CA 15-3-Antikörper (Klon: DF3) der Firma Dako North America Inc. verwendet, der an das DF3-Antigen, ein Mucin-ähnliches Glykoprotein, bindet. Anti-CA 15-3 ist ein monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper. Er wurde 1:400 in Dako-Verdünnungsmedium verdünnt. Als Detektionssystem diente ebenfalls Vectastain® ABC KIT für Maus-IgG-Antikörper der Vector Laboratories Inc.

Als Positiv- und Isotypkontrolle benutzten wir Nierengewebe, als Negativkontrolle Gehirn. Das Isotypkontrollreagenz war mit dem bei der PankoMab-Anti-Mucin-1-Färbung verwendeten Reagenz äquivalent und wurde mit

Dako-Verdünnungsmedium auf die gleiche Konzentration des Primärantikörpers verdünnt.

Die genauen Färbeprotokolle finden sich unter Punkt 2.2.2.4

#### **2.2.2.4 Das Färbeprotokoll**

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung wurde das Paraffin durch Xylol aus dem Gewebeschnitt herausgelöst (15 Minuten) und dieses wiederum in einer absteigenden Alkoholreihe (100%iger, 2x 96%iger, 2x 70%iger Alkohol) entfernt. Die Schnitte wurden in 100%igem Ethanol dehydriert und anschließend in einem Gemisch aus 3ml 30%igem Wasserstoffperoxid und 97ml Methanol zur Blockierung der endogenen Peroxidase inkubiert (20 Minuten). Die absteigende Alkoholreihe wurde zu Ende geführt und die Ethanolreste durch Reinigung in destilliertem Wasser beseitigt.

Außer bei der Mucin-1-Färbung durch den PankoMab-Antikörper wurde eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung im Dampfkochtopf für fünf Minuten vorgenommen. Die Objektträger wurden dazu in eine kochende kalziumpräzipitierte Lösung aus Natrium-Citratpuffer (18ml Lösung A, 82ml Lösung B, 900ml Aqua dest.; Punkt 2.1.2) gestellt. Durch diese Maßnahme konnte der entsprechende Antikörper in der anschließenden Färbung auch Epitope wahrnehmen, die zuvor durch die Aldehydvernetzung bei der Formalinfixation maskiert worden waren.

Daraufhin wurden die Schnitte in destilliertem Wasser kurz gereinigt und für 2x2 Minuten in PBS gespült.

Es folgte das Auftragen des Blockierungsserums.

Dieses stammte aus dem jeweiligen Detektionssystem Vectastain®, das neben dem Sekundärantikörper und dem ABC-System das Blockierserum und Anti-Maus-IgG beziehungsweise Anti-Rabbit-IgG enthielt.

Für das Blockierungsserum kamen drei Tropfen Blockierserum auf 10ml steriles PBS. Durch die Verwendung dieses Serums wurde eine unspezifische Anfärbung verhindert, da elektrostatische Ladungen im Gewebe gesättigt und eine unspezifische Bindung von Immunglobulinen an Membran und Fettgewebe unterbunden wurden.

Zum Nachweis von CA 15-3 wurde das Blockierserum für 30 Minuten auf den Objektträgern belassen, danach nur abgeklopft und dann der Primärantikörper (Anti-Ca 15-3) für 17 Stunden aufgetragen. Der Antikörper wurde bei 4°C im Kühlschrank über Nacht auf dem Gewebe belassen. Für den Nachweis der anderen Strukturen wurde das Blockierungsserum bereits nach 20 Minuten abgeschüttet und der entsprechende Antikörper (Anti-E-Cadherin, Anti-Beta-Catenin, Anti-Mucin-1 Klon PankoMab, Anti-Mucin-1 Klon VU-4-H5) eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Objektträgern belassen.

Daraufhin wurden die Gewebeschnitte 2x2 Minuten in PBS gewaschen. Für 30 Minuten konnte nun der Sekundärantikörper, auch biotinylierte Brücken- oder Link-Antikörper genannt, einwirken. Wie bereits erwähnt stammte er aus dem jeweiligen Detektionssystem und entstand durch Mischung von drei Tropfen Blockierserum, einem Tropfen Anti-Maus-IgG (bzw. Anti-Rabbit-IgG bei der Beta-Catenin-Färbung) und 10ml sterilem PBS. Während der Einwirkzeit des Sekundärantikörpers erkannte dieser das Fc-Fragment des Primärantikörpers als sein Antigen. Der Sekundärantikörper war stets gegen das Tier gerichtet, aus dem der Primärantikörper stammte.

Anschließend erfolgte wieder ein Waschvorgang von 2x2 Minuten in PBS.

Die Objektträger wurden nun für 30 Minuten mit dem sogenannten Avidin-Biotin-Komplex bedeckt.

Dem Effekt der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex-Methode) (Abbildung 2.1) liegt die Affinität von Avidin zu Biotin zugrunde. Als Alternative zum Avidin wurde in dieser Arbeit das gentechnisch hergestellte Streptavidin benutzt, das aus dem Bakterium „*Streptomyces avidinii*“ gewonnen wird und spezifischer an Biotin bindet als das natürlich vorkommende Avidin. Streptavidin besitzt mehrere Bindungsstellen für Biotin. Die Produktion des AB-Komplexes ist darauf ausgelegt, dass biotinylierte Peroxidase nicht alle Avidin-Bindungsstellen besetzt. Einige Bindungsstellen bleiben frei. An diese binden die mit Biotin markierten Brückenantikörper (Sekundärantikörper). Biotin, auch als wasserlösliches Vitamin H oder Vitamin B7 bekannt, stellt damit die Verbindung zwischen Brückenantikörper und AB-Komplex her. Für unsere Versuche wurde Meerrettichperoxidase verwendet. [38]

Nach der Einwirkzeit des AB-Komplexes wurden die Schnitte erneut 2x2 Minuten in PBS gereinigt. Es folgte die zweiminütige Färbung mit 3,3 Diaminobenzidin (DAB)

und Chromogen. Dabei rief die Peroxidase mit dem Substratpuffer  $H_2O_2$  als Katalysator und DAB ein braunes Farbprodukt hervor. DAB hat den Vorteil in organischen Lösungsmitteln unlöslich zu sein.

Im Anschluss wurden die Schnitte 2x2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und dann mit saurem Hämalaun nach Mayer für zwei Minuten gegengefärbt. Dies ist ein basischer Farbstofflack in saurer Lösung. Der pH-Wert betrug 4,5. Dadurch wurden die Kerne wegen ihrer negativen Ladung am stärksten gefärbt. Das Abwaschen der Säurereste, sowie das Bläuen erfolgten unter Leitungswasser im alkalischen Milieu für fünf Minuten.

Daraufhin wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iger, 96%iger und absoluter Alkohol) entwässert und mittels Xylol aufgehellt. Als letzter Schritt erfolgte die Eindeckung der Objektträger mit Consul-Mount.

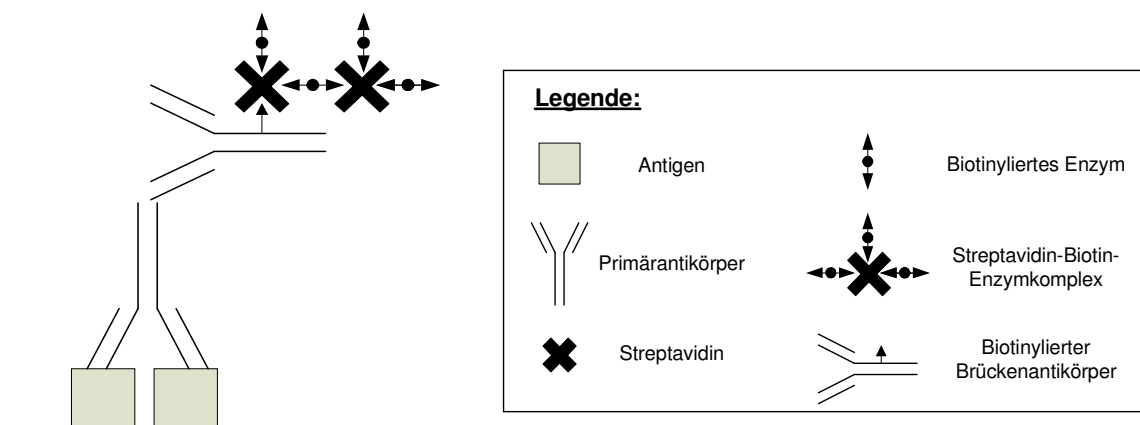


Abbildung 2.1: (Strept-)Avidin-Biotin-Komplex [38]

### 2.3 Auswertung und statistische Methoden

Die Auswertung erfolgte am Mikroskop Leitz Diaplan mit Hilfe des immunreaktiven Scores (IRS-Score) nach Remmele und Stegner (1987). Die Objektträger wurden unter 6,3-facher und 25-facher Vergrößerung beurteilt. Es wurde zum einen die Färbeintensität, zum anderen die Anzahl der gefärbten Karzinomzellen bewertet. Die Multiplikation dieser beiden Werte ergab den IRS-Score. Die Färbeintensität konnte sich zwischen negativ oder einfach, zweifach oder dreifach positiv bewegen (keine, schwache, mäßige oder starke Färbung). Für die Anzahl der gefärbten Zellen konnte der Wert 0 bei keiner Färbereaktion, der Wert 1 bei einer geringen Anzahl an

gefärbten Zellen (<10%), der Wert 2 bei 10-50% angefärbter Zellen, der Wert 3 bei 51-80% angefärbter Zellen oder der Wert 4 vergeben werden, wenn nahezu alle Karzinomzellen gefärbt waren (>80%).

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Statistikprogramm SPSS („Statistical Package for Social Sciences“) (Version 17.0; SPSS Inc., Chicago, USA) und Excel (Version 2003). Es wurden der Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben und der Kruskal-Wallis-Test bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben verwendet. Für die Angabe von Korrelationen diente der Spearman Korrelationstest. Das Signifikanzniveau wurde als  $p \leq 0,05$  definiert.



## **3 Ergebnisse**

Die Ergebnisse wurden für die Matched-Pair-Gruppe und das Gesamtkollektiv jeweils getrennt beurteilt. Die Matched-Pair-Gruppe war Bestandteil des Gesamtkollektivs. Die Zusammensetzung der beiden Gruppen ist unter Punkt 2.1.4.2 und 2.1.4.3 ausführlich beschrieben.

### **3.1 Übersichtsdaten**

Im Anhang (Punkt 7.1) finden sich Tabellen zur Patientencharakteristik.

#### **3.1.1 Altersverteilung**

Es wurde jeweils das Alter, das zum Operationszeitpunkt bestand, verwendet, da an diesem Tag auch das für diese Studie verwendete Gewebe gewonnen wurde.

##### **3.1.1.1 Matched-Pair-Gruppe**

Bei den Patientinnen mit einem Herd in der Brust lag der Median bei 57 Jahren, bei Frauen mit mehreren Herden in der Brust lag der Median bei 68 Jahren. Der p-Wert betrug 0,104.

##### **3.1.1.2 Gesamtkollektiv**

Bei der einherdigen Gruppe betrug der Median 59 Jahre. In der mehrherdigen Gruppe ergab sich ein Median von 61 Jahren. Der p-Wert zwischen den Vergleichsgruppen betrug 0,533.

### **3.1.2 Menopausenstatus**

#### **3.1.2.1 Matched-Pair-Gruppe**

In der Gruppe der einherdigen Karzinome befanden sich sechs (28,6%) prämenopausale Patientinnen, eine (4,8%) perimenopausale Patientin und 14 (66,7%) postmenopausale Patientinnen. Bei zwei Frauen waren keine Angaben über den Menopausenstatus verfügbar.

Innerhalb der gematchten mehrherdigen Patientinnen waren 18,2% (n=4) prämenopausal und 81,8% (n=18) postmenopausal. Bei einer Frau mit mehrherdigem Karzinom war kein Menopausenstatus angegeben.

Der p-Wert zwischen den ein- und mehrherdigen Karzinomen betrug 0,291.

#### **3.1.2.2 Gesamtkollektiv**

Unter den Frauen mit einherdigen Mammakarzinomen waren 30,8% (n=16) in der Prämenopause, 3,8% (n=2) in der Perimenopause und 65,4% (n=34) in der Postmenopause. Unter Einbeziehung der gematchten Patientinnen waren bei fünf Patientinnen keine Angaben zum Menopausenstatus vorzufinden.

In der mehrherdigen Gruppe befanden sich 13 (26,0%) prämenopausale, eine (2,0%) perimenopausale und 36 (72,0%) postmenopausale Patientinnen. Auch hier waren bei fünf Frauen keine Angaben zum Menopausenstatus aufzufinden.

Im Gesamtkollektiv zeigte sich zwischen den Vergleichsgruppen in Bezug auf den Menopausenstatus kein signifikanter Unterschied ( $p=0,503$ ).

### 3.1.3 Tumorgroße

#### 3.1.3.1 Matched-Pair-Gruppe

Die Tumorgroße war Matchkriterium und somit  $p=1,0$ .

Innerhalb der Matched-Pair-Gruppe befand sich ein Paar (4,3%) mit einer Tumorausdehnung unter 0,5cm (pT1a). Sechs Paare (26,1%) wiesen eine Tumorgroße von 0,5cm bis 1cm (pT1b) auf und elf Paare (47,8%) einen Tumor mit einer Größe von 1cm bis 2cm (pT1c). Eine Tumorausdehnung von 2cm bis 5cm wurde bei vier Paaren (17,4%) klassifiziert (pT2). Ein Paar (4,3%) wies tumorbegleitend Ulzerationen der Brusthaut mit Ödem auf (pT4b).

#### 3.1.3.2 Gesamtkollektiv

In der unifokalen Gruppe fand sich bei drei Patientinnen (5,4%) ein Tumor im Stadium pT1a. Am häufigsten war das Tumorstadium pT1b mit 19 Patientinnen (33,9%), gefolgt von dem Stadium pT1c mit 18 Personen (32,1%). Ein pT2-Stadium konnte bei 15 Patientinnen (26,8%) nachgewiesen werden. Lediglich bei einer Patientin (1,8%) fand sich ein Tumor im Stadium pT4b. Bei einer Patientin waren keine Angaben zur Tumorgroße verfügbar.

		Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Gültig	pT1a	3	5,4	5,4
	pT1b	19	33,9	39,3
	pT1c	18	32,1	71,4
	pT2	15	26,8	98,2
	pT4b	1	1,8	100,0
	Gesamt	56	100,0	

Tabelle 3.1: Verteilung der Tumorgroße bei den einherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs

## Ergebnisse

---

Bei den von mehrherdigen Mammakarzinomen betroffenen Frauen wiesen nur zwei Patientinnen (3,7%) einen Tumor im pT1a-Stadium auf. Acht Frauen (14,8%) litten zum Operationszeitpunkt an einem pT1b-Tumor. Etwa die Hälfte der Betroffenen wies einen Tumor im pT1c-Stadium auf (51,9%; n=28). Dieses Stadium war damit am häufigsten zu finden. Hinsichtlich der Häufigkeit folgte mit 22,2% (n=12) das pT2-Stadium. Ein Tumor, der größer als 5cm maß (pT3), fand sich lediglich bei einer Frau (1,9%). Ein pT4b-Tumor wurde bei zwei Patientinnen (3,7%) festgestellt und ein inflammatorisches Mammakarzinom (pT4d) wies eine Patientin (1,9%) auf. Bei einer Patientin waren keine Angaben zur Tumorgöße verfügbar.

		Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Gültig	pT1a	2	3,7	3,7
	pT1b	8	14,8	18,5
	pT1c	28	51,9	70,4
	pT2	12	22,2	92,6
	pT3	1	1,9	94,4
	pT4b	2	3,7	98,1
	pT4d	1	1,9	100,0
	Gesamt	54	100,0	

**Tabelle 3.2: Verteilung der Tumorgöße bei den mehrherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs**

Die Tumorgöße unterschied sich zwischen ein- und mehrherdigen Karzinomen nicht signifikant ( $p=0,113$ ).

### 3.1.4 Lymphknotenstatus

#### 3.1.4.1 Matched-Pair-Gruppe

Der Lymphknotenstatus war Matchkriterium und somit  $p=1,0$ .

Bei 17 Paaren (73,9%) konnte kein Lymphknotenbefall nachgewiesen werden (pN0). Metastasen in ein bis drei Lymphknoten (pN1bi) wurden bei zwei Paaren (8,7%) festgestellt. Bei vier Patientenpaaren (17,4%) überschritten Metastasen mit einem Durchmesser unter 2cm bereits die Lymphknotenkapsel (pN1biii).

#### 3.1.4.2 Gesamtkollektiv

In der unifokalen Gruppe wiesen zum Operationszeitpunkt mehr als die Hälfte aller Patientinnen keine Lymphknotenmetastasen auf (64,8%;  $n=35$ ). Ein pN1bi-Stadium wurde bei sieben Patientinnen (13,0 %) diagnostiziert. Bei acht Frauen (14,8%) wurde ein pN1biii-Stadium vorgefunden und bei drei Patientinnen (5,6%) befanden sich Metastasen mit einem Durchmesser über 2cm im Lymphknoten (pN1biv). Eine Patientin (1,9%) war von Metastasen im ipsilateralen axillären Lymphknoten betroffen. Die Lymphknoten waren untereinander verbacken oder in anderen Strukturen fixiert (pN2). Bei drei Patientinnen konnten keine Aussagen über den Befall der regionären Lymphknoten getroffen werden (pNx).

		Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Gültig	pN0	35	64,8	64,8
	pN1bi	7	13,0	77,8
	pN1biii	8	14,8	92,6
	pN1biv	3	5,6	98,2
	pN2	1	1,9	100,1
	Gesamt	54	100,0	

**Tabelle 3.3: Verteilung des Lymphknotenstatus bei den einherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs**

Bei den mehrherdigen Karzinomen wies nur knapp die Hälfte (54,0%; n=27) des Patientenkollektivs einen negativen Lymphknotenstatus auf (pN0). Damit waren in der mehrherdigen Gruppe mehr Frauen von Lymphknotenmetastasen betroffen als in der unifokalen Gruppe. Vier Frauen (8,0%) zeigten einen pN1bi-Status und 18 Frauen (36,0%) einen pN1biii-Lymphknotenstatus. Bei lediglich einer Patientin (2,0%) fand sich ein pN2-Status, bei fünf Patientinnen konnten die regionären Lymphknoten nicht beurteilt werden (pNx).

		Häufigkeit	Prozent	Kumulative Prozente
Gültig	pN0	27	54,0	54,0
	pN1bi	4	8,0	62,0
	pN1biii	18	36,0	98,0
	pN2	1	2,0	100,0
	Gesamt	50	100,0	

**Tabelle 3.4: Verteilung des Lymphknotenstatus bei den mehrherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs**

Der p-Wert zwischen ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen hinsichtlich des histopathologischen Lymphknotenstatus lag bei 0,150. Somit lag kein signifikanter Unterschied vor.

### 3.1.5 Grading

#### 3.1.5.1 Matched-Pair-Gruppe

Das Grading war ein Matchkriterium, der p-Wert folglich 1,0.

Es gab sowohl in der einherdigen, als auch in der mehrherdigen Gruppe 19 Karzinome (82,6%) mit einer mäßigen Differenzierung (G2) und vier Frauen (17,4%), deren Mammakarzinome als schlecht differenziert (G3) eingestuft wurden. Gut differenzierte G1-Tumore kamen nicht vor.

### 3.1.5.2 Gesamtkollektiv

In der unifokalen Gruppe waren drei G1-Tumore (5,4%) zu verzeichnen. Bei 35 Patientinnen (62,5%) war der Tumor mäßig differenziert und bei 18 Patientinnen (32,1%) fand man eine schlechte Differenzierung des Tumors zum Operationszeitpunkt vor. Bei einer Patientin waren keine Angaben zum Differenzierungsgrad verfügbar.

		Häufigkeit	Prozente	Kumulative Prozente
Gültig	G1	3	5,4	5,4
	G2	35	62,5	67,9
	G3	18	32,1	100,0
	Gesamt	56	100,0	

**Tabelle 3.5: Verteilung des Gradings bei den einherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs**

Die mehrherdige Gruppe beinhaltete sechs Karzinome (11,1%) in einem hoch differenzierten Zustand (G1) und 38 Karzinome (70,4%) in einem mäßig differenzierten Zustand. Nur zehn Karzinome (18,5%) wurden als schlecht differenziert klassifiziert. Bei einer Patientin waren keine Angaben zum Grading verfügbar.

		Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Prozente
Gültig	G1	6	11,1	11,1
	G2	38	70,4	81,5
	G3	10	18,5	100,0
	Gesamt	54	100,0	

**Tabelle 3.6: Verteilung des Gradings bei den mehrherdigen Mammakarzinomen des Gesamtkollektivs**

Die Karzinome der ein- und mehrherdigen Gruppe unterschieden sich hinsichtlich des Gradings nicht signifikant ( $p=0,068$ ).

### 3.1.6 Histologie

#### 3.1.6.1 Matched-Pair-Gruppe

Die folgende Tabelle (Tabelle 3.7) listet die histologischen Subtypen der unifokalen Karzinome auf, die in die Matched-Pair-Analyse eingingen. Bei einer Patientin war keine Angabe zur Histologie vorhanden.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	lobulär	3	13,6
	duktulo-lobulär	1	4,5
	duktal	15	68,2
	medullär	1	4,5
	mikro-/papillär	2	9,1
	Gesamt	22	100,0

**Tabelle 3.7: Histologie der einherdigen Mammakarzinome der Matched-Pair-Gruppe**

Nachfolgend (Tabelle 3.8) befinden sich die histologischen Subtypen der gematchten mehrherdigen Karzinome.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	lobulär	5	21,7
	duktulo-lobulär	2	8,7
	duktal	16	69,6
	Gesamt	23	100,0

**Tabelle 3.8: Histologie der mehrherdigen Mammakarzinome der Matched-Pair-Gruppe**

Die ein- und mehrherdigen Karzinome der gematchten Gruppe zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Histologie ( $p=0,120$ ).



### 3.1.6.2 Gesamtkollektiv

In der Gruppe der unifokalen Karzinome fanden sich unten aufgeführte histologische Verteilungsmuster (Tabelle 3.9). Es wurde bei 40 Patientinnen zusätzlich zum invasiven Herd ein duktales Carcinoma in situ (DCIS) und bei fünf Frauen zusätzlich ein Carcinoma lobulare in situ (CLIS) festgestellt, wobei vier Frauen ein DCIS mit einem CLIS zusammen aufwiesen. Bei einer Patientin waren keine Angaben zur Histologie verfügbar.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	lobulär	3	5,4
	duktulo-lobulär	3	5,4
	duktal	39	69,6
	muzinös	2	3,6
	medullär	4	7,1
	mikro-/papillär	2	3,6
	tubulär	3	5,4
	Gesamt	56	100,0

**Tabelle 3.9: Histologie der einherdigen Mammakarzinome des Gesamtkollektivs**

Die Histologie der multifokalen und multizentrischen Karzinome zeigte deutlich mehr invasiv lobuläre Karzinome. Zusätzlich zum invasiven Herd trat bei 30 Patientinnen ein DCIS und bei neun Patientinnen ein CLIS auf. Vier Frauen hatten sowohl ein DCIS als auch ein CLIS. Bei zwei Patientinnen waren keine Angaben zur Histologie verfügbar.

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	lobulär	11	20,8
	duktulo-lobulär	4	7,5
	duktal	35	66,0
	muzinös	1	1,9
	medullär	1	1,9
	mikro-/papillär	1	1,9
	Gesamt	53	100,0

**Tabelle 3.10: Histologie der mehrherdigen Mammakarzinome des Gesamtkollektivs**

Die Histologie des Gesamtkollektivs unterschied sich bei ein- und mehrherdigen Patientinnen signifikant ( $p=0,003$ ).

## 3.2 E-Cadherin

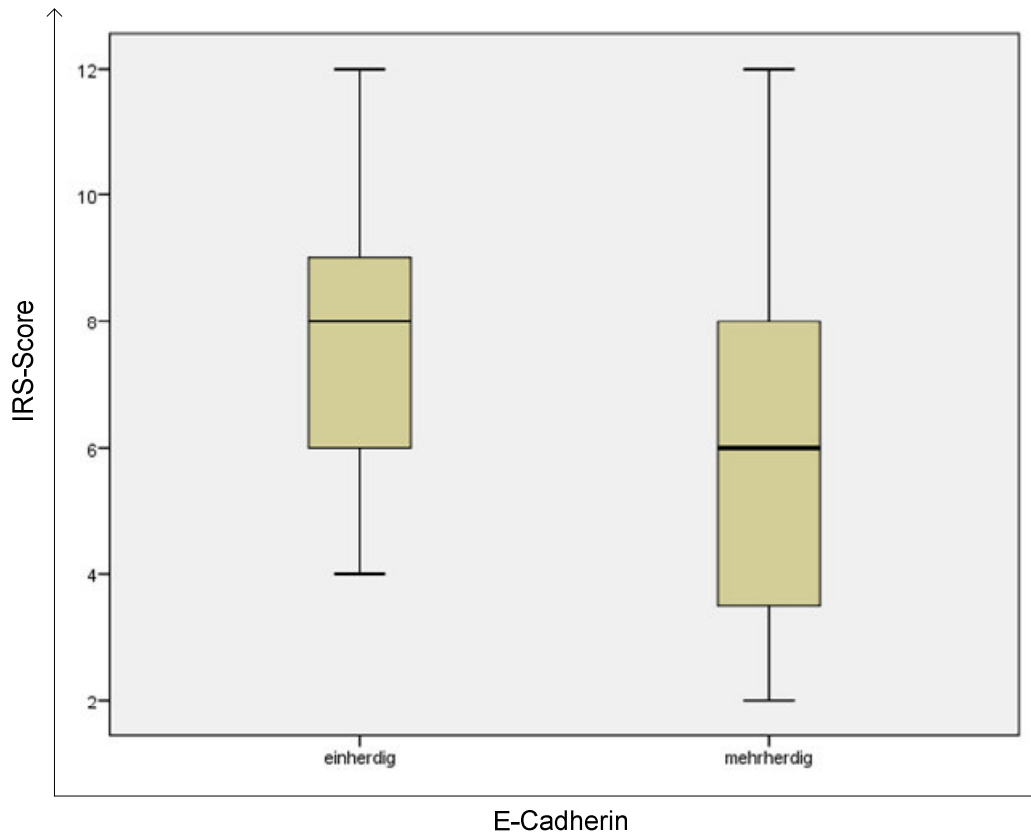
Die rein lobulären Karzinome wurden nicht mit in die Auswertungen eingeschlossen, da sie aufgrund der bereits erwähnten Veränderungen des CDH1-Gens keine E-Cadherin-Expression mehr aufweisen (Punkt 1.1).

### 3.2.1 Matched-Pair-Gruppe

Durch den Wegfall der lobulären Karzinome verkleinerte sich die Patientenzahl von 23 Paaren auf 16 gematchte Paare. Es befanden sich 13 Karzinome in einem mäßig differenzierten Stadium und drei Mammakarzinome in einem schlecht differenzierten Stadium. Die beiden Patientinnen, die ein Matching-Paar bildeten, stimmten hinsichtlich Tumorgröße, Grading und Lymphknotenstatus überein.

Bei der Auswertung der Matched-Pair-Analyse zeigte sich eine signifikant höhere E-Cadherin-Expression der unifokalen Mammakarzinome ( $p=0,024$ ) gegenüber den multifokalen/multizentrischen Karzinomen (Abbildung 3.1 und im Anhang unter Punkt 7.2 Bild 1 und Bild 2).

Es bestand keine Signifikanz zwischen der E-Cadherin-Expression und dem Grading ( $p=0,897$ ).



**Abbildung 3.1: E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores bei Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen, gematched nach Grading, Lymphknoten- und Größenstadium des Tumors**

### 3.2.2 Gesamtkollektiv

Die E-Cadherin-Expression im Gesamtkollektiv wurde an 54 einherdigen und 44 mehrherdigen Mammakarzinompatientinnen untersucht.

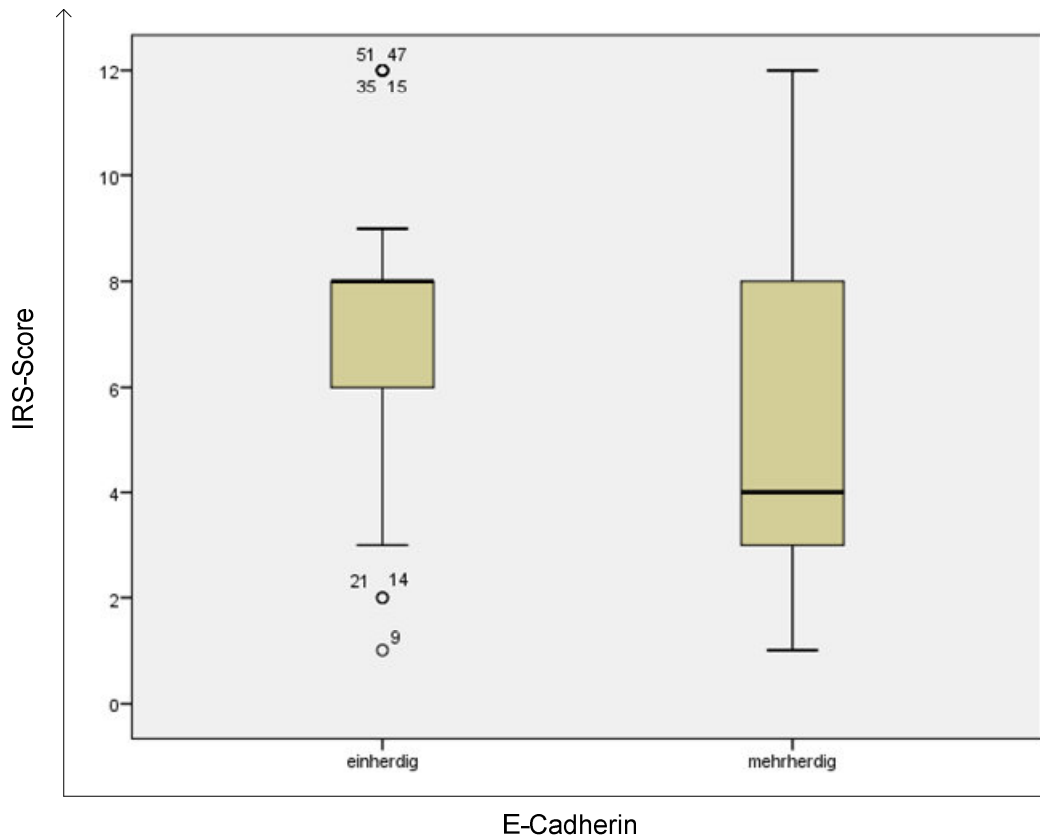
In der unifokalen Gruppe waren drei (5,7%) G1-Tumore. Bei 33 Patientinnen (62,3%) zeigten sich mäßig differenzierte Karzinome und die Mammakarzinome von 17 Patientinnen (32,1%) wurden als schlecht differenziert klassifiziert.

Die mehrherdige Patientengruppe setzte sich aus vier G1-Karzinomen (9,3%), 29 G2-Karzinomen (67,4%) und zehn G3-Karzinomen (23,3%) zusammen.

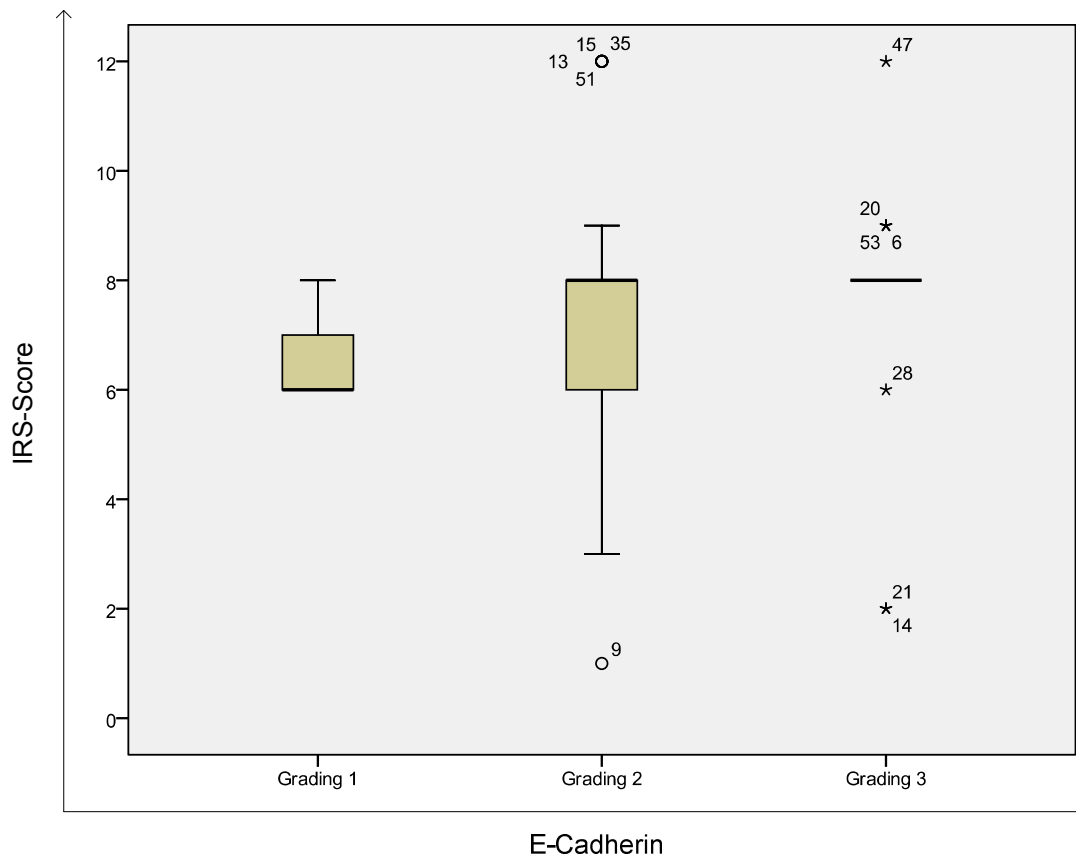
## Ergebnisse

Bei den unifokalen Karzinomen war die E-Cadherin-Expression signifikant ( $p < 0,0001$ ) höher als in der multifokalen/multizentrischen Gruppe (Abbildung 3.2).

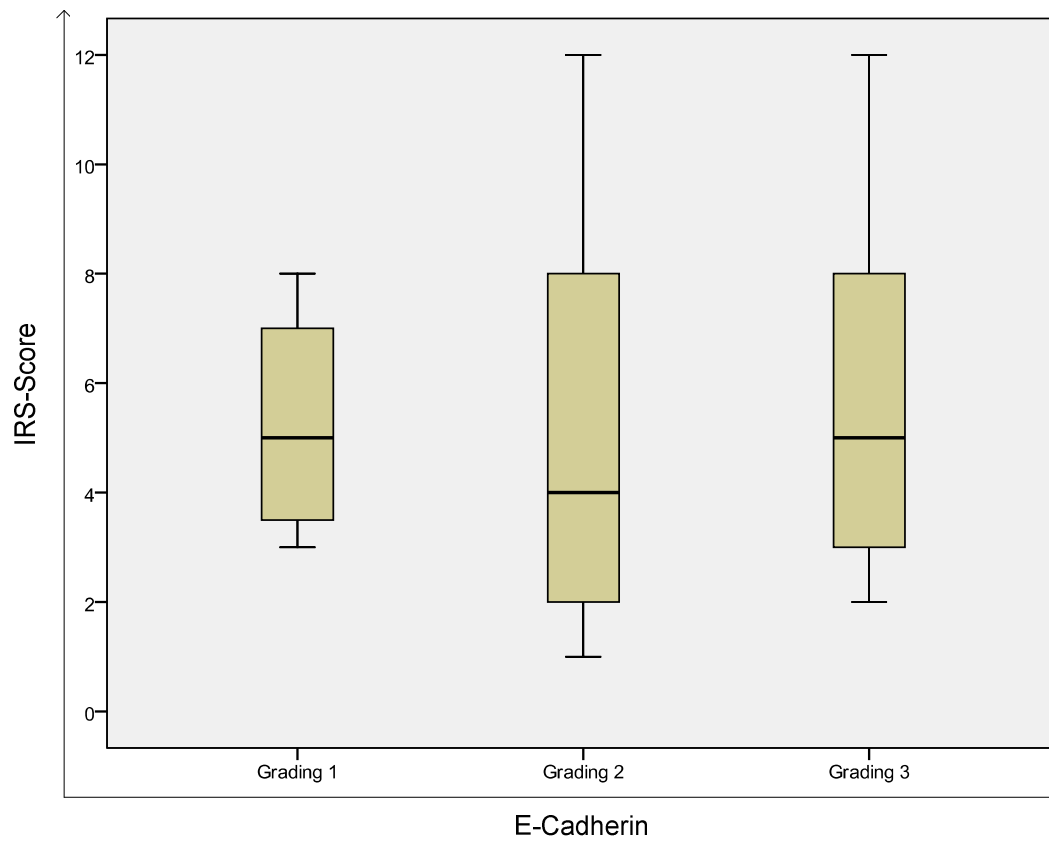
Zwischen Grading und der E-Cadherin-Expression der einherdigen Karzinome bestand keine Signifikanz ( $p = 0,514$ ) (Abbildung 3.3). Ebenso wenig konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Grading und der E-Cadherin-Expression der mehrherdigen Karzinome ( $p = 0,887$ ) nachgewiesen werden (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.2: E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores bei Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen**



**Abbildung 3.3: Verteilung der E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit einherdigen Mammakarzinomen**



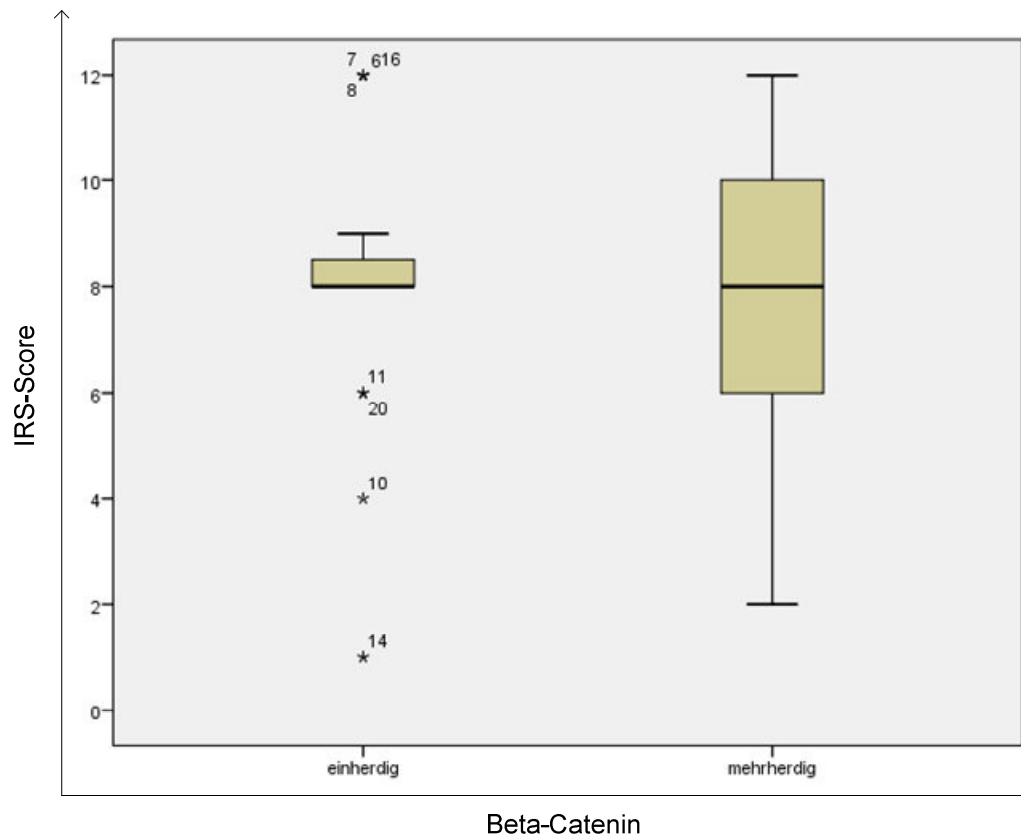
**Abbildung 3.4: Verteilung der E-Cadherin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit mehrherdigen Mammakarzinomen**

### 3.3 Beta-Catenin

#### 3.3.1 Matched-Pair-Gruppe

Die Matched-Pair-Analyse der 23 Patientenpaare zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den ein- und mehrherdigen Karzinomen hinsichtlich der Beta-Catenin-Expression (Abbildung 3.5). Der p-Wert lag bei 0,636.

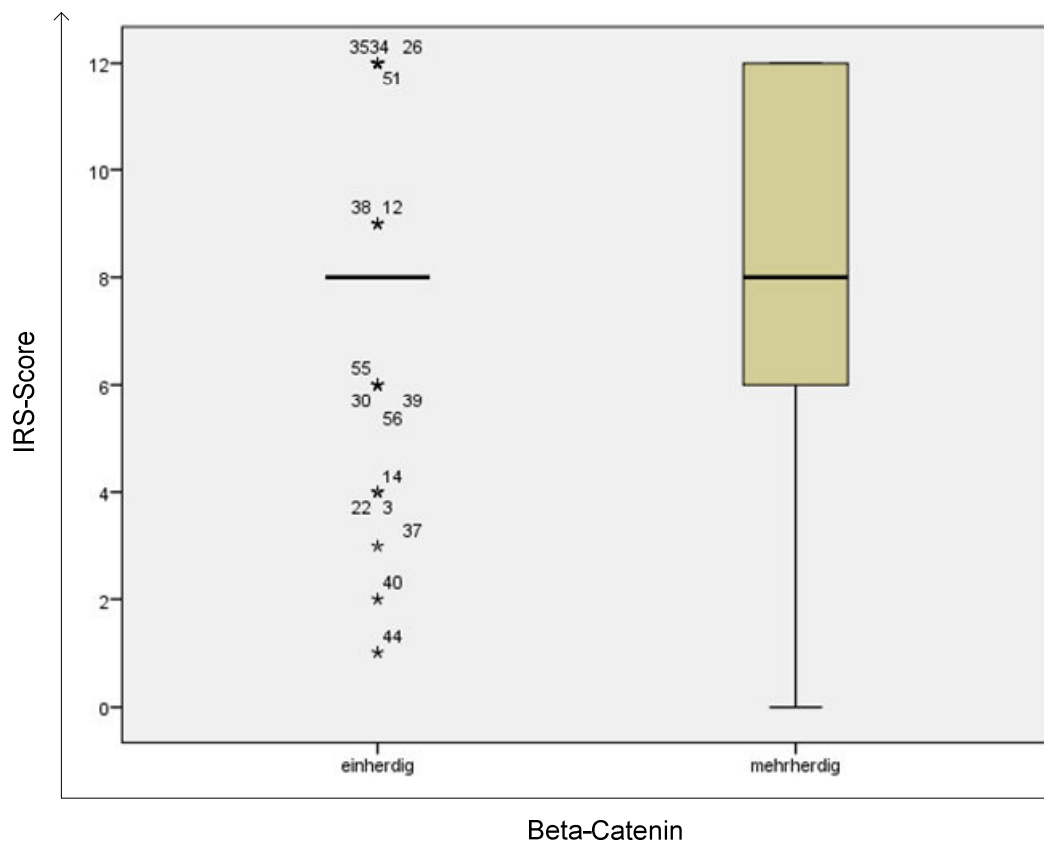
Die Beta-Catenin-Expression war unabhängig vom Grading ( $p=0,301$ ).



**Abbildung 3.5: Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores bei Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen, gematched nach Grading, Lymphknoten- und Größenstadium des Tumors**

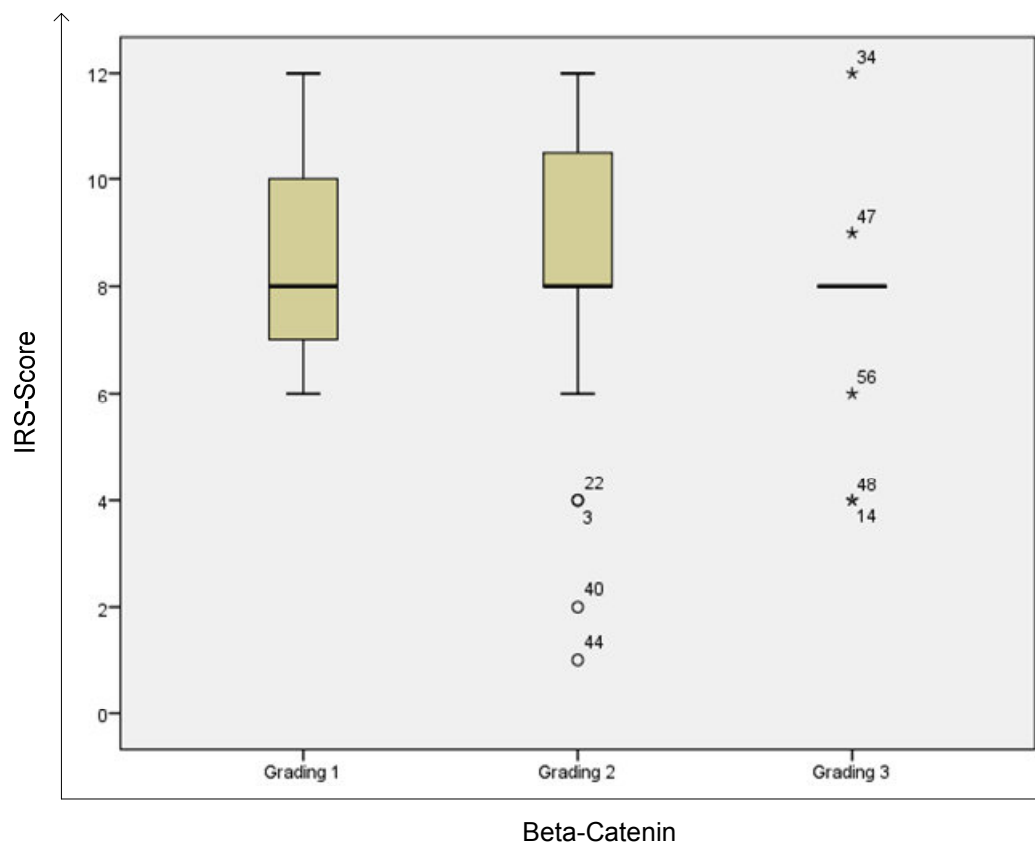
### 3.3.2 Gesamtkollektiv

Im Gesamtkollektiv wurde die Beta-Catenin-Expression bei 57 einherdigen und 55 mehrherdigen Mammakarzinomen ermittelt. Zwischen den beiden Gruppen zeigte sich ebenfalls nahezu kein Unterschied in der Expression ( $p=0,914$ ) (Abbildung 3.6). Die Beta-Catenin-Expression zeigte weder bei den unifokalen ( $p=0,635$ ) (Abbildung 3.7) noch bei den multifokalen/multizentrischen Karzinomen ( $p=0,564$ ) (Abbildung 3.8) einen signifikanten Zusammenhang zum Grading.

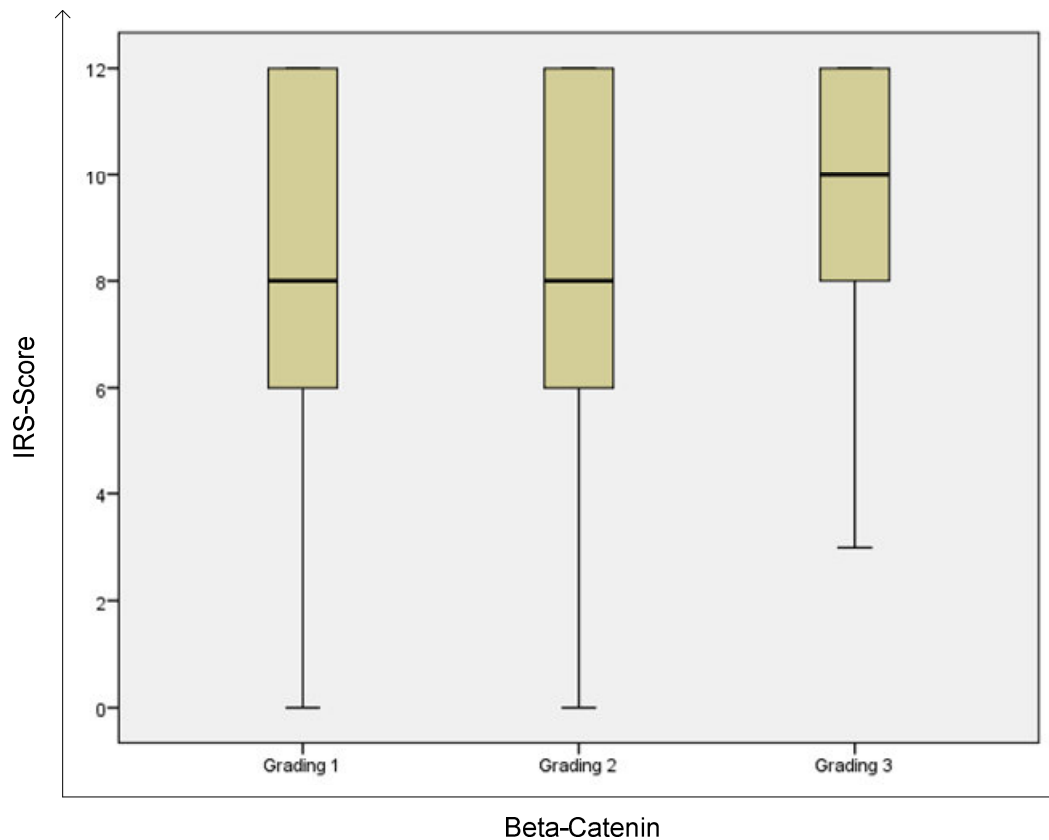


**Abbildung 3.6: Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores bei Patientinnen mit einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinomen**





**Abbildung 3.7: Verteilung der Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit einherdigen Mammakarzinomen**



**Abbildung 3.8: Verteilung der Beta-Catenin-Expression anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit mehrherdigen Mammakarzinomen**

### 3.4 Mucin-1

#### 3.4.1 Mucin-1-Darstellung mittels PankoMab

Der humanisierte Anti-Mucin-1-Antikörper namens PankoMab erkennt spezifisch membrangebundenes, tumorassoziiertes Mucin-1.

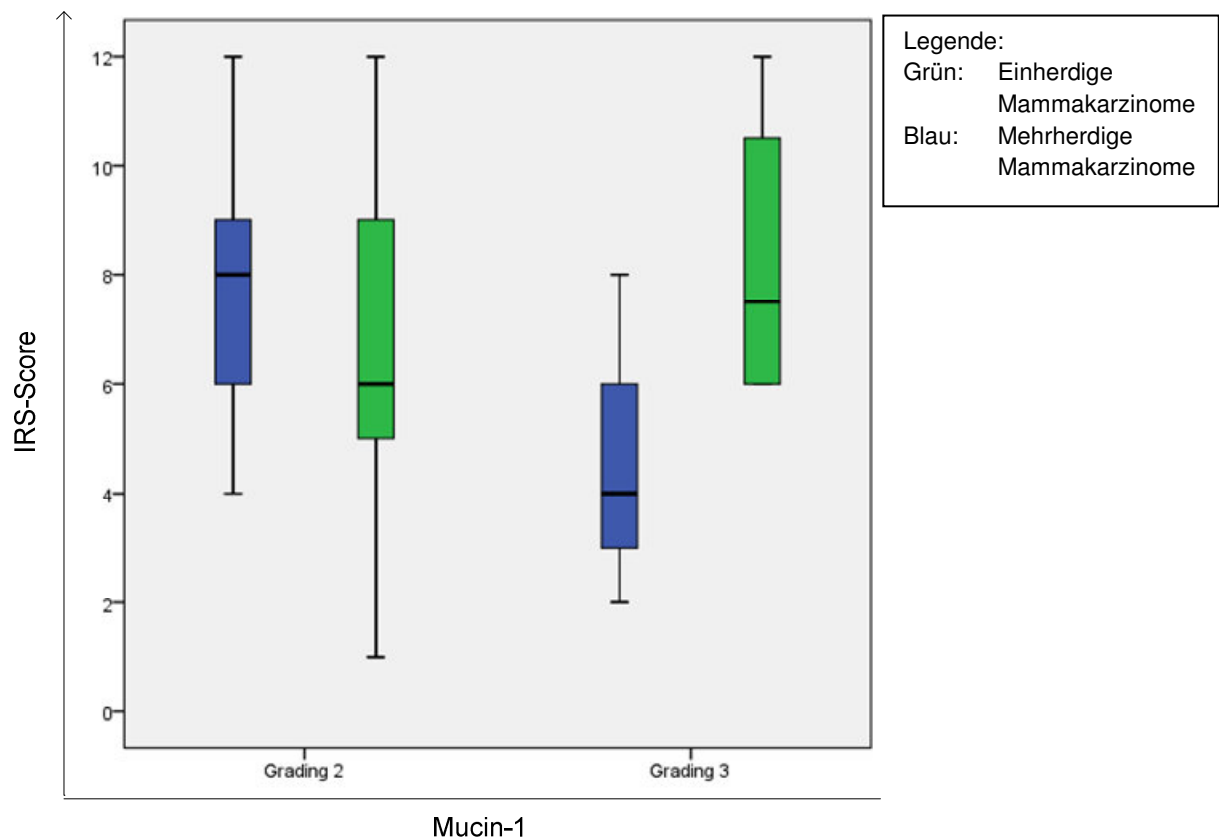
##### 3.4.1.1 Matched-Pair-Gruppe

Zwischen den ein- und mehrherdigen Karzinomen der Matched-Pair-Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Mucin-1-Expression ( $p=0,840$ ). Auch innerhalb der mäßig differenzierten Karzinome und der schlecht differenzierten Karzinome zeigte sich im Hinblick auf die Mucin-1-Expression zwischen ein- und

mehrherdigen Mammakarzinomen kein signifikanter Unterschied (Abbildung 3.9). Der p-Wert der mäßig differenzierten Karzinome lag bei 0,319, der p-Wert der schlecht differenzierten Mammakarzinome betrug 0,080.

Jedoch zeigte sich im Hinblick auf das Grading bei den unifokalen Mammakarzinomen ein leichter Anstieg der Mucin-1-Expression vom mäßigen in den schlecht differenzierten Zustand ( $p=0,534$ ), während die mehrherdigen Karzinome einen signifikanten Abfall der Mucin-1-Expression mit steigendem Grading zeigten ( $p=0,023$ ) (Abbildung 3.9).

Innerhalb der multifokalen/multizentrischen Karzinome der Matched-Pair-Analyse bestand eine signifikante negative Korrelation (nach Spearman) von  $-0,485$  ( $p=0,019$ ) zwischen dem Grading und der Mucin-1-Expression.



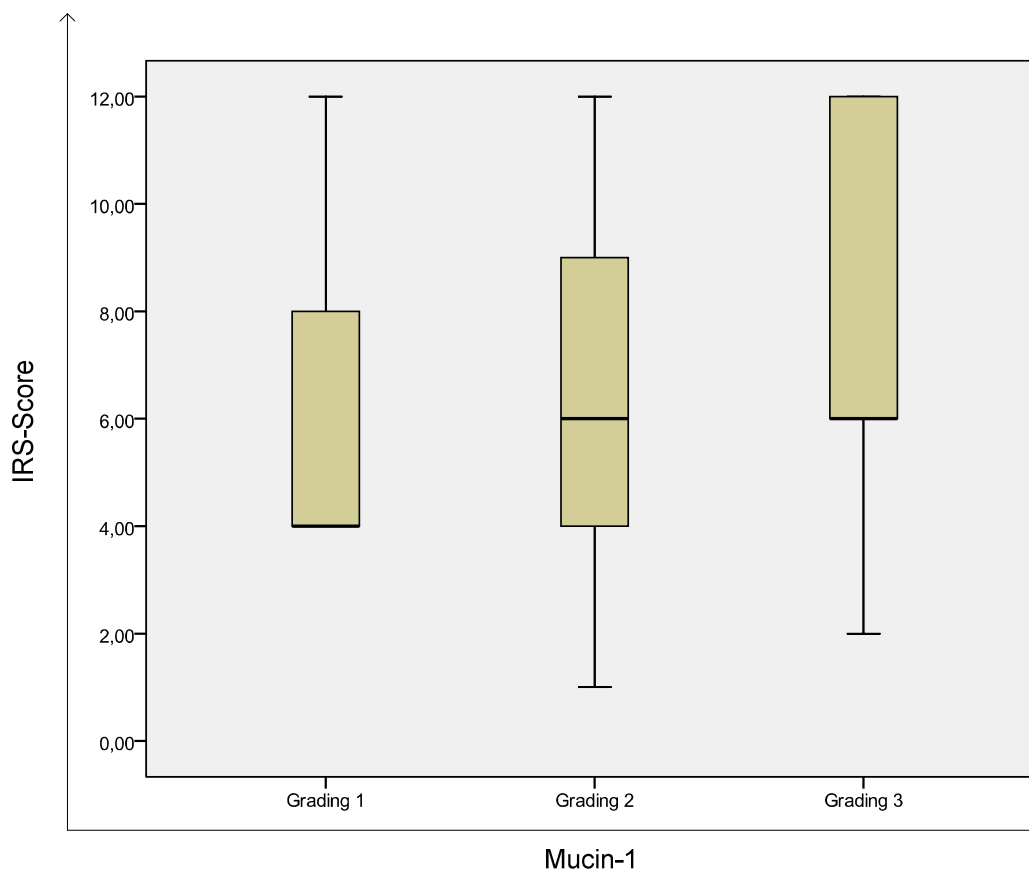
**Abbildung 3.9:** Darstellung der Mucin-1-Expression (PankoMab) anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei Patientinnen mit einherdigen (grün) und mehrherdigen (blau) Mammakarzinomen

### 3.4.1.2 Gesamtkollektiv

Es wurden 57 einherdige und 55 mehrherdige Mammakarzinome auf eine Mucin-1-Expression hin untersucht.

Die Mucin-1-Expression unterschied sich zwischen der Gruppe der ein- und mehrherdigen Karzinome nicht signifikant ( $p=0,183$ ).

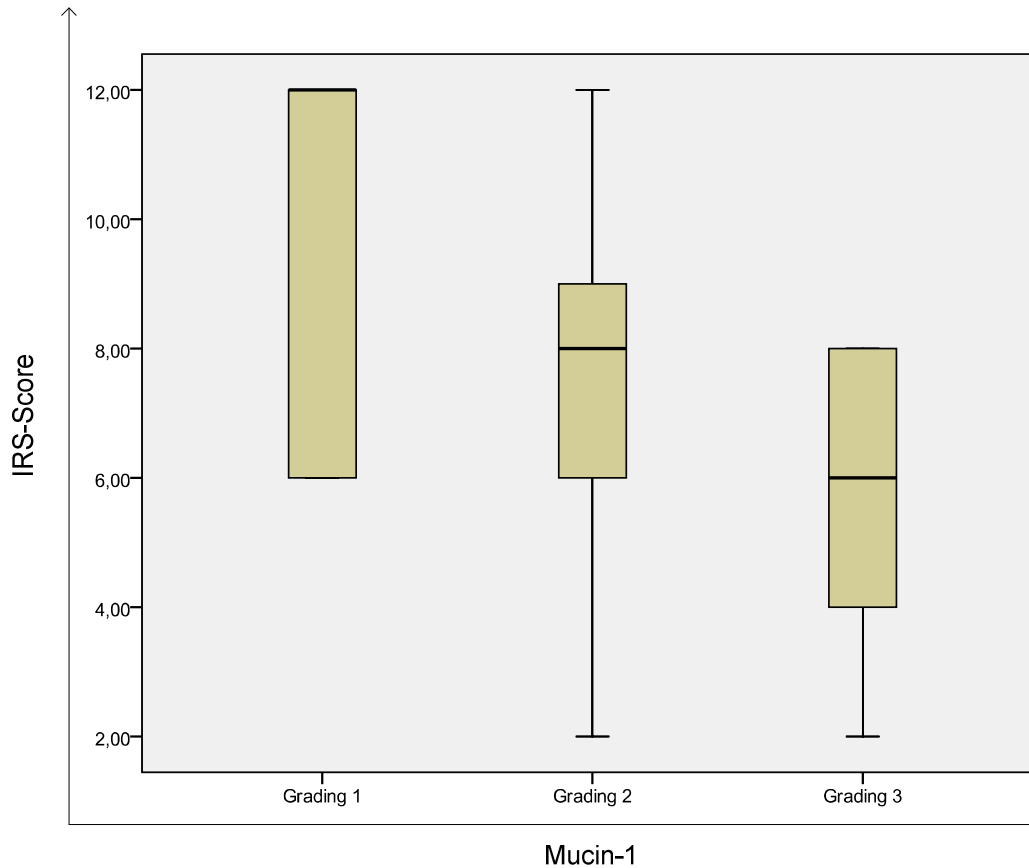
Bei den unifokalen Mammakarzinomen stieg die Mucin-1-Expression leicht und nicht signifikant ( $p=0,840$ ) mit schlechterer Differenzierung der Tumorzellen (Abbildung 3.10 und im Anhang unter Punkt 7.2 Bild 3, Bild 4 und Bild 5).



**Abbildung 3.10: Verteilung der Mucin-1-Expression (PankoMab) anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei unifokalen Mammakarzinomen**

In der mehrherdigen Gruppe zeigte sich hingegen ein anderes Expressionsmuster. Die Mucin-1-Expression nahm mit steigendem Grading signifikant ab ( $p=0,027$ ). So war eine starke Mucin-1-Expression mit einer guten Tumordifferenzierung, eine schwache Mucin-1-Expression mit einer schlechten Tumordifferenzierung vergesellschaftet. Damit zeigten die multifokalen/multizentrischen Karzinome eine

signifikante negative Korrelation (nach Spearman) von  $-0,368$  zwischen der Mucin-1-Expression und dem Grading ( $p=0,006$ ). (Abbildung 3.11 und im Anhang unter Punkt 7.2 Bild 6, Bild 7 und Bild 8)



**Abbildung 3.11: Verteilung der Mucin-1-Expression (PankoMab) anhand des IRS-Scores in Abhängigkeit vom Grading bei multifokalen/multizentrischen Mammakarzinomen**

### **3.4.2 Vergleich der Mucin-1-Darstellung mittels PankoMab, VU-4-H5 und DF3**

Wir verglichen die Mucin-1-Darstellung der 46 Matching-Patientinnen durch die Mucin-1-Antikörper PankoMab, VU-4-H5 und DF3. Die Mucin-1-Expression, die sich durch den PankoMab-Antikörper zeigte, wurde unter Punkt 3.4.1.1 bereits ausführlich beschrieben. Er zeigte bei den mehrherdigen Karzinomen eine signifikant reduzierte Mucin-1-Expression mit steigendem Grading ( $p=0,023$ ) (Abbildung 3.9). Die Antikörper VU-4-H5 ( $p=0,581$ ) und DF3 ( $p=0,764$ ) zeigten keine signifikante

Abhängigkeit zwischen Grading und Mucin-1-Expression. Bezüglich der unifokalen Karzinome ergaben sich bei keinem der Mucin-1-Antikörper signifikante Ergebnisse. Die ebenfalls bereits unter Punkt 3.4.1.1 erwähnte negative Korrelation zwischen Differenzierungsgrad und Mucin-1-Expression bei mehrherdigen Karzinomen fand sich zwar bei allen Mucin-1-Antikörpern, war jedoch nur bei PankoMab signifikant.

### **3.5 Verhältnis der Moleküle E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1**

#### **3.5.1 Matched-Pair-Analyse**

Korrelationen zwischen den Molekülen E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1 (PankoMab) wurden für die einherdigen und mehrherdigen Mammakarzinome der Matched-Pair-Gruppe berechnet. Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen nach Spearman.

#### **3.5.2 Gesamtkollektiv**

Die Karzinome der unifokalen Gruppe zeigten eine signifikante positive Korrelation nach Spearman von 0,400 zwischen der E-Cadherin- und der Beta-Catenin-Expression ( $p=0,003$ ). Die E-Cadherin- und die Mucin-1-Expression korrelierten nicht signifikant miteinander (Korrelationskoeffizient:  $-0,049$ ;  $p=0,726$ ). Zwischen der Beta-Catenin- und der Mucin-1-Expression bestand eine nicht signifikante ( $p=0,057$ ) positive Korrelation (Korrelationskoeffizient:  $0,253$ ). Betrachtete man jedoch allein die mäßig differenzierten unifokalen Karzinome, zeigte sich eine positive signifikante ( $p=0,014$ ) Korrelation nach Spearman von  $0,411$  zwischen Beta-Catenin und Mucin-1.

Bei den mehrherdigen Mammakarzinomen konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den untersuchten Molekülen nachgewiesen werden. (Korrelationskoeffizient zwischen E-Cadherin- und Beta-Catenin-Expression:  $0,142$ ;  $p=0,359$ ; Korrelationskoeffizient zwischen Beta-Catenin- und Mucin-1-Expression:

## Ergebnisse

---

0,091;  $p=0,507$ ; Korrelationskoeffizient zwischen E-Cadherin- und Mucin-1-Expression:  $-0,048$ ;  $p=0,757$ ).

## 4 Diskussion

Die TNM-Klassifikation wurde im Laufe der letzten Jahrzehnte regelmäßig überarbeitet und den neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen angepasst. Tumorgröße, Lymphknotenbeteiligung, Grading und Metastasierung blieben dabei die zentralen Elemente. Mehrherdige Mammakarzinome nehmen jedoch einen gesonderten Stellenwert ein. Die tatsächliche Tumorlast bei multifokalen und multizentrischen Mammakarzinomen wird auch in der aktuellen TNM-Klassifikation nicht berücksichtigt.

Jedoch verdichten sich die Hinweise auf eine unterschiedliche Prognose ein- und mehrherdiger Mammakarzinome bei identischem Tumorstadium. Ob die Prognoseunterschiede an einer unterschätzten Tumorlast oder an andersartiger Tumorbiologie liegen, ist bislang unklar.

Im Jahr 2010 verglichen wir Patientinnen mit ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen in einer Matched-Pair-Studie hinsichtlich ihrer Prognose [20]. Die Patientinnen wurden je nach Herdigkeit des Karzinoms in zwei Gruppen von 288 Patientinnen aufgeteilt. Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus und Grading waren Matchkriterien und somit in beiden Gruppen gleich verteilt ( $p=1,0$ ). Der Vergleich von ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen zeigte, dass bei gleichem TNM-Stadium ein vermindertes Gesamtüberleben und ein höheres Risiko für Lokalrezidive und Fernmetastasen auf Seiten der mehrherdigen Karzinome bestand. Mehrherdige Karzinompatientinnen wiesen somit eine schlechtere Prognose auf. Die Ergebnisse zeigten die Mehrherdigkeit als einen unabhängigen Prognosefaktor auf, der in der aktuellen TNM-Klassifikation nicht adäquat berücksichtigt wird. Jedoch wurden keine Unterschiede in der Tumorbiologie untersucht. Deshalb nahm sich diese Arbeit zum Ziel, die Tumorbiologie als eine denkbare Ursache der Prognoseunterschiede zwischen unifokalen und multifokalen/multizentrischen Mammakarzinomen näher zu beleuchten.

Die Zell-Zell-Adhäsion ist essentiell für den Erhalt der Epithelstruktur und des Zellverbandes. Während der Krebsentstehung kommt es zur Störung dieser



Zell-Zell-Adhäsion, die im gesunden Organismus wesentlich durch die Cadherine erhalten wird. Im Epithelgewebe ist E-Cadherin für den Erhalt des Zellverbandes verantwortlich. E-Cadherin gilt als Tumorsuppressorprotein [21, 27], da der Rückgang der E-Cadherin-Expression mit einer begleitenden Tumorprogression assoziiert wird. Dies konnte bereits bei vielen Krebsarten epithelialer Herkunft beobachtet werden, wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom [24, 39], Magenkarzinom [28], Kolonkarzinom [40] und auch dem Mammakarzinom [21, 41-42]. Nach der immunhistochemischen Studie von Mohammadizadeh et al. [43] geht die Herabregulation dieses Oberflächenmoleküls mit schlechter Prognose und einem niedrigeren Differenzierungsgrad bei seinen 108 Patientinnen einher, die vom invasiv duktalem Mammakarzinom betroffen waren. Lialiaris et al. [44] beschreiben in ihrer immunhistochemischen Studie ebenfalls eine erhöhte E-Cadherin-Expression bei gut differenzierten invasiv duktalem Mammakarzinomen. Die Ergebnisse beider Arbeitsgruppen sprechen für E-Cadherin als einen prognostischen Marker für Brustkrebs.

Auch in unserer Studie war die E-Cadherin-Expression der mehrherdigen Mammakarzinome im Vergleich zu den einherdigen Karzinomen signifikant reduziert. Diese Ergebnisse sprechen für ein aggressiveres Tumorverhalten der mehrherdigen Mammakarzinome und spiegeln die schlechtere Prognose dieser Tumoren wider. Jedoch fehlt in unserer Studie die Differenzierung in histologische Subtypen bei außerdem geringer Fallzahl von 98 Patientinnen aufgrund des Wegfalls der lobulären Karzinome.

Zhang et al. [45] beschrieben 2007 andere Ergebnisse wie Mohammadizadeh (2009) und Lialiaris (2010). Die Arbeitsgruppe untersuchte 94 invasiv duktalem Mammakarzinome immunhistochemisch und stellte eine erhöhte E-Cadherin-Expression bei einem späten Tumorstadium und bei Rezidivaufreten fest. Entgegen oben genannter Ergebnisse wurde hier eine erhöhte E-Cadherin-Expression mit einem schlechteren Krankheitsausgang in Verbindung gebracht. Dieses Ergebnis widerspricht der allgemeinen Annahme von E-Cadherin als Tumorsuppressor und zeigt, dass die Rolle von E-Cadherin in der Tumorprogression weiterhin nicht hinreichend geklärt ist.

In der gleichen Studie berichteten Zhang et al von der Unabhängigkeit der E-Cadherin-Expression vom Grading. Nurismah et al. [46] sprachen sich in ihrer

Arbeit zwar für einen Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Expression und histologischem Subtyp aus, nicht aber für einen Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Expression und Differenzierungsgrad von invasiven Mammakarzinomen. Auch wir konnten im Hinblick auf die Expression von E-Cadherin bezüglich der Tumordifferenzierung innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellen, wobei die Anzahl der G1-Karzinome zu gering für eine wegweisende Aussage war.

Im Gegensatz dazu untersuchten Dian et al. [47] 2010 die Expression von E-Cadherin bei 100 Ovarialkarzinomen. Die Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression und der histologischen Differenzierung der Ovarialkarzinome und sprachen damit für eine Abhängigkeit zwischen E-Cadherin-Expression und Grading.

An der Zell-Zell-Adhäsion ist auch Beta-Catenin, ein Regulator des Wnt-Signalweges beteiligt.

In einer immunhistochemischen Studie von Lopez-Knowles et al. [48] wurde die Beta-Catenin-Expression an 292 invasiv duktalem Mammakarzinomen beschrieben. Die Autoren fanden bei schlecht differenzierten Tumoren eine hohe zytoplasmatische Expression. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine starke zytoplasmatische Beta-Catenin-Expression mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert sein könnte. Im Gegensatz dazu beschrieben Zhang et al [45] eine verminderte Beta-Catenin-Expression bei Patientinnen mit befallenen Lymphknoten und bei Karzinomen mit einer c-erbB2-Überexpression. Es wurden jedoch ausschließlich Zellen als positiv gewertet, die eine Färbung der Zellmembran aufwiesen. Eine Färbung des Zytoplasmas wurde ohne Rücksicht auf den Stärkegrad der Färbung als negativ eingestuft. Hierdurch kommt es zu einem Informationsverlust. Dennoch ergänzen sich die beiden Studien in sofern gut, als dass die zytoplasmatische Lokalisation von Beta-Catenin als Pathologie eingestuft wird, während eine Beta-Catenin-Expression an der Membran als physiologisch gilt. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen der beiden Arbeiten wider. Die Arbeitsgruppe um Bukholm et al. [49] veröffentlichte 2006 eine Studie über das Expressionsmuster der Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin, Alpha-Catenin, Beta-Catenin und Gamma-Catenin in T1 und T2 klassifizierten Mammakarzinomen. Allein E-Cadherin zeigte

eine signifikante Reduktion in T2 diagnostizierten Tumoren im Vergleich zu T1 diagnostizierten Karzinomen. Beta-Catenin zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. 2009 untersuchten Abd El-Rehim et al. [50] invasiv duktales Mammakarzinome bezüglich der Färbelocalisation von Beta-Catenin. Eine reduzierte Beta-Catenin-Expression an der Zellmembran war assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und negativem Östrogenrezeptorstatus. Eine hohe zytoplasmatische Expression fand sich bei Tumoren mit großem Durchmesser, schlechter Differenzierung und Lymphknotenpositivität. Die Ergebnisse gewichten die Bedeutung der zellulären Lokalisation von Beta-Catenin. Die Färbelocalisation wurde in unserer Studie nicht bewertet, was ein Grund dafür sein könnte, dass wir keine signifikanten Unterschiede im Beta-Catenin-Expressionsverhalten nachweisen konnten.

Das Glykoprotein Mucin-1, ein Transmembranmolekül, wird in vielen Karzinomen überexprimiert.

Wir konnten feststellen, dass in mehrherdigen Mammakarzinomen die Mucin-1-Expression, die mittels PankoMab ermittelt wurde, mit steigendem Grading (von G1 zu G3) signifikant abnahm, während sie in der unifokalen Gruppe leicht zunahm.

Auch andere Studien [51-53] verknüpfen eine hohe Mucin-1-Expression mit einem besseren Differenzierungsgrad. So wiesen die Ergebnisse von Lundy et al. [52] auf eine geringere Kernpolymorphie und eine bessere histologische Differenzierung der untersuchten Mammakarzinome bei höherer Mucin-1-Expression. Die Arbeitsgruppe um Rahn et al. [53] untersuchte 71 Brustkrebs-Patientinnen auf eine Mucin-1-Expression. Karzinome mit einer niedrigeren Expression zeigten dabei eine stärkere Kernpolymorphie als Karzinome mit höherer Expression. Van der Vegt et al. [51] beschrieben in ihrer Studie nicht nur, dass eine apikale Mucin-1-Expression mit guter Tumordifferenzierung, sondern auch mit einer kleineren TumorgroÙe und einem erhöhten Gesamtüberleben assoziiert ist. Die Ergebnisse von Van der Vegt werden von weiteren Arbeitsgruppen [54-55] untermauert, die ebenfalls ein verbessertes Überleben bei einer stärkeren Mucin-1-Expression der Mammakarzinomzellen beobachteten. Auch Walker et al. [56] stellten fest, dass eine höhere Mucin-1-Expression bei Mammakarzinomen mit niedrigerem Rezidivauftreten und einer höheren Überlebensrate der Patientinnen einhergeht.

Nach den Ergebnissen oben genannter Studien [51-53] und unserer mehrherdigen Karzinomgruppe scheint es einen direkten Zusammenhang zwischen Mucin-1-Expression und Aggressivität eines Tumors zu geben.

Unsere Resultate in der unifokalen Gruppe konnten dies jedoch nicht bekräftigen.

Es wurde aber in keiner der anderen Studien eine Unterteilung der Mammakarzinome nach Herdigkeit vorgenommen. Des Weiteren zeigen einige Autoren [51, 57] die Bedeutung der Lokalisation der Mucin-1-Expression auf. Während die intrazelluläre Mucin-1-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht, befindet sie sich im gesunden Gewebe oder gut differenziertem Karzinomgewebe apikal. Da in unserer Studie auf die Färbelokalisation nicht näher eingegangen wurde, ist auch dies als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Vergleichsgruppen möglich.

Die 46 Patientinnen der Matched-Pair-Analyse dienten außerdem für einen Vergleich von drei Mucin-1-Antikörpern. Wir verglichen PankoMab, VU-4-H5 und DF3 im Hinblick auf ihre Aussagekraft bezüglich der Mucin-1-Expression. Allein der inzwischen humanisierte Mucin-1-Antikörper PankoMab hob Unterschiede in der Mucin-1-Expression zwischen ein- und mehrherdigen Karzinomen hervor. Nur er verdeutlichte auch die signifikant unterschiedliche Mucin-1-Expression je nach Differenzierungsgrad der mehrherdigen Karzinome. Auf die Bedeutung des PankoMab-Antikörpers beim Ovarialkarzinom verweisen neuere Daten unserer Arbeitsgruppe [58]. Paraffinschnitte von 142 Ovarialkarzinomen wurden auf Mucin-1 untersucht. Der PankoMab-Antikörper zeigte positive Färbereaktionen bei den untersuchten serösen, endometrioiden, muzinösen, und klarzelligen Subtypen. Der PankoMab-Antikörper, der sich in der Vergangenheit als höchst spezifisch für nicht-gesheddetes Tumor-Mucin-1 erwies, könnte somit als Kandidat für einen therapeutischen Antikörper zur Behandlung des Ovarialkarzinoms in Erwägung gezogen werden.

Dian et al. [59] verglichen ebenfalls die für diese Arbeit verwendeten Mucin-1-Antikörper beim duktalem Mammakarzinom. Die Kombination aus PankoMab- und VU-4-H5-Färbung scheint demnach eine Möglichkeit zur Prognosebestimmung des Mammakarzinoms zu sein. In seiner Arbeit konnte eine signifikante Korrelation zwischen steigendem Grading und steigender Färbeintensität

durch VU-4-H5 festgestellt werden. Diese Ergebnisse konnten durch vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. Jedoch muss die in unserer Studie hierfür verwendete Fallzahl von nur 46 Patientinnen sowie die Verwendung unterschiedlicher histologischer Subtypen berücksichtigt werden. Dian et al. stellten mit dem PankoMab-Antikörper eine negative Korrelation zwischen der Mucin-1-Expression und dem Differenzierungsgrad fest, die jedoch nicht signifikant war. Möglicherweise ist dies auf eine fehlende Unterteilung der Mammakarzinome nach Herdigkeit zurückzuführen.

In unserer Arbeit untersuchten wir auch die Korrelationen zwischen den Molekülen E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1.

Bei der unifokalen Gruppe bestand im Gesamtkollektiv eine signifikante positive Korrelation zwischen der Beta-Catenin- und der E-Cadherin-Expression.

Die positive Korrelation dieser beiden Moleküle konnte bereits auch in anderen Studien festgestellt werden. Zhang et al. [45] berichteten 2007 von einer simultanen Reduktion von E-Cadherin und Beta-Catenin bei 25% seiner Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinom. Die Arbeitsgruppe um Prasad et al. [60] beschrieb 2009 ebenfalls einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen E-Cadherin- und Beta-Catenin-Verlust der Zellmembranen.

Für multifokale und multizentrische Karzinome konnten wir die positive Korrelation zwischen E-Cadherin und Beta-Catenin nicht mit Signifikanz bestätigen. Dies könnte daran liegen, dass der E-Cadherin-Verlust bei mehrherdigen Karzinomen laut unserer Studie deutlich ausgeprägter ist als bei einherdigen Tumoren. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein instabilerer E-Cadherin/Beta-Catenin-Komplex für mehrherdige Karzinome annehmen, der wiederum als Ursache der höheren Aggressivität in Betracht kommt.

In der Vergangenheit wurde bereits auch über das Verhältnis von Mucin-1 zum E-Cadherin/Beta-Catenin-Komplex geforscht. Kondo et al. [61] untersuchten im Jahre 1998 zwei Brustkrebszelllinien (YMB-S und ZR-75-1S) und fanden heraus, dass E-Cadherin durch eine Überexpression von Mucin-1 supprimiert wird. Die Arbeitsgruppe um Yuan et al. [62] demonstrierte 2007 an Pankreas- und Brustkrebszellen, dass die Reduzierung von Mucin-1 eine erhöhte E-Cadherin-Expression induziert und dass eine Verminderung der Mucin-1-Expression zur

vermehrten Bildung von E-Cadherin/Beta-Catenin-Komplexen führt. Li et al. [63] beschrieben eine Hemmung der Ausbildung von E-Cadherin/Beta-Catenin-Komplexen bei einer Überexpression von Mucin-1. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte das oben beschriebene inverse Verhältnis zwischen der Mucin-1- und der E-Cadherin-Expression sowohl bei den einherdigen als auch bei den mehrherdigen Karzinomen des Gesamtkollektivs beobachtet werden, jedoch ohne statistische Signifikanz. Das Phänomen einer ebenfalls negativen Korrelation zwischen der Mucin-1-Expression und einer allgemeinen Beta-Catenin-Expression in Mammakarzinomzellen [62] kann diese Arbeit nicht bestätigen. Wir fanden eine positive Korrelation zwischen diesen beiden Molekülen, die bei den unifokalen Tumoren mit mäßigem Differenzierungsgrad (G2) Signifikanz zeigte. Wie bereits beschrieben untersuchten Yuan et al. [62] Mamma- und Pankreaskarzinomzellen. Bei den Pankreaskarzinomzellen beobachtete die Arbeitsgruppe mittels Western Blot bei verminderter Mucin-1-Expression ein Ansteigen der zytoplasmatischen Beta-Catenin-Konzentration, aber keine Veränderung der Beta-Catenin-Konzentration im Nukleus. Die Lokalisation der Beta-Catenin-Konzentration wurde jedoch in der Mammakarzinomzelllinie nicht beschrieben. Die fehlende Beurteilung der Färbelokalisation in unserer Arbeit könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Korrelation zwischen Mucin-1 und Beta-Catenin in der Arbeit von Yuan im Vergleich zu unserer Studie sein.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Mucin-1-Expression bei ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen können für die Verbesserung therapeutischer Ansätze von Bedeutung sein. Mucin-1 gilt als Ziel für eine Antikörper-vermittelte Therapie [32, 34, 64-66]. Ein weiterer therapeutischer Ansatz beinhaltet Mucin-1 als Ziel für eine Immuntherapie mit Hilfe von Impfstoffen [32-33, 64, 67]. Bei einer möglichen therapeutischen Anwendung von Mucin-1 könnte interessant sein, dass multifokale/multizentrische Mammakarzinome in schlecht differenzierten Tumorstadien eine wesentlich niedrigere Mucin-1-Expression zu haben scheinen als ein gut differenziertes mehrherdiges Mammakarzinom oder ein schlecht differenziertes unifokales Karzinom. Somit wäre die Wirksamkeit solcher Therapien bei mehrherdigen schlecht differenzierten Mammakarzinomen möglicherweise

reduziert. Diese Arbeit kann dabei behilflich sein diese neuen Medikamente gezielter adäquat einzusetzen.

Speziell der Anti-Mucin-1-Antikörper PankoMab könnte sich in Zukunft auch beim Mammakarzinom als möglicher Marker erweisen.

E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1 werden alle in Zusammenhang mit der Onkogenese von Brustkrebs gebracht. Jedoch wurde bislang in wenigen Mammakarzinomstudien eine Unterteilung nach Herdigkeit vorgenommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine unterschiedliche Tumorbilologie in Abhängigkeit von der Herdigkeit eine wesentliche Rolle spielt. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse über das unterschiedliche Expressionsverhalten von E-Cadherin und Mucin-1 bei ein- und mehrherdigen Mammakarzinomzellen unterstützen diese Annahme. Weitere Studien werden nötig sein, um Unterschiede in der Tumorbilologie zu erforschen und die neuen Informationen schließlich in das Gesamtkonzept der individuellen Therapiegestaltung zu integrieren.

## 5 Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung:

Die aktuelle TNM-Klassifikation berücksichtigt bis dato nicht die tatsächliche Tumorlast bei mehrherdigen Mammakarzinomen. Neuere Daten weisen darauf hin, dass mehrherdige Karzinome im Vergleich zu einherdigen Karzinomen bei identischem TNM-Stadium eine schlechtere Prognose hinsichtlich Gesamtüberleben und Rezidivaufreten haben. Ziel dieser Studie war es, mögliche Unterschiede in der Tumorbiologie von ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen zu evaluieren.

Material und Methoden:

Wir verglichen retrospektiv 57 einherdige mit 55 mehrherdigen Mammakarzinompatientinnen. Aus diesem Gesamtkollektiv isolierten wir eine Matched-Pair-Gruppe mit 46 Patientinnen, deren Kollektive hinsichtlich Tumorgröße, Grading und Lymphknotenstatus übereinstimmten. Die Paraffinschnitte jeder Patientin wurden immunhistochemisch auf die Expression von E-Cadherin, Beta-Catenin und Mucin-1 untersucht.

Ergebnisse:

Die E-Cadherin-Expression war bei den mehrherdigen Mammakarzinomen signifikant reduziert gegenüber den einherdigen Karzinomen (Gesamtkollektiv:  $p < 0,0001$ ; Matched-Pair-Gruppe:  $p = 0,024$ ). Die Beta-Catenin-Expression unterschied sich zwischen ein- und mehrherdigen Karzinomen kaum. Bei den multifokalen/multizentrischen Karzinomen nahm die Mucin-1-Expression mit steigendem Grading signifikant ab (Gesamtkollektiv:  $p = 0,027$ ; Matched-Pair-Gruppe:  $p = 0,023$ ), während sie bei den unifokalen Karzinomen leicht zunahm.

Eine signifikante ( $p = 0,003$ ) positive Korrelation bestand zwischen der Expression von Beta-Catenin und E-Cadherin in der unifokalen Gruppe des Gesamtkollektivs.

Schlussfolgerung:

Erstmals wurden Oberflächenmoleküle bei ein- und mehrherdigen Mammakarzinomherden vergleichend untersucht. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse weisen auf eine unterschiedliche Tumorbiologie zwischen ein- und mehrherdigen Mammakarzinomzellen. Weitere Studien werden nötig sein, um die



## Zusammenfassung

---

Tumorbiologie im Hinblick auf die Herdigkeit zu untersuchen. Die Forschung nach neuen und zielgerichteten Therapieansätzen bei mehrherdigen Mammakarzinomen sollte weiter vorangetrieben werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. 55(2): p. 74-108.
2. Robert-Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends, 7.Ausgabe (vom 23.02.2010)
3. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.
7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). Berlin, 2010
4. Basis-Statistiken C50: Mammakarzinom (Frauen); Tumorregister München am Tumorzentrum München (Hrsg.); 2011
5. Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 25 - Brustkrebs; Robert-Koch-Institut (Hrsg.); 2005
6. Stufe-3-Leitlinien "Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland"; U.-S.Albert; 2008
7. Faverly, D.R., et al., *Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: clinical implications*. Semin Diagn Pathol, 1994. 11(3): p. 193-8.
8. Mammographie-Handbuch für die tägliche Praxis; G.Roth-Ganter; 2002
9. Mammakarzinom: Operative Behandlungskonzepte; R.Jakesz, M.Frey; 2007
10. The practice of mammography: pathology, technique, interpretation, adjunct modalities; D. J. Dronkers, J. Hendriks; 2002
11. Mammakarzinom: Manual Diagnostik und Therapie; A.C.Regierer, K.Possinger; 2005
12. National Cancer Institute, USA - [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov) (vom 02.06.2010)
13. Sinn, H.P., B. Helmchen, and C.H. Wittekind, *[TNM classification of breast cancer: changes and comments on the 7th edition]*. Pathologe, 2010. 31(5): p. 361-6.
14. Benson, J.R., et al., *The TNM staging system and breast cancer*. Lancet Oncol, 2003. 4(1): p. 56-60.

15. Escobar, P.F., et al., *The 2003 revised TNM staging system for breast cancer: results of stage re-classification on survival and future comparisons among stage groups*. Ann Surg Oncol, 2007. 14(1): p. 143-7.
16. Sobin, L.H. and F.L. Greene, *Multifocal/multicentric breast carcinoma*. Cancer, 2004. 100(11): p. 2488-9; author reply 2489.
17. Boyages, J., U.W. Jayasinghe, and N. Coombs, *Multifocal breast cancer and survival: Each focus does matter particularly for larger tumours*. Eur J Cancer, 2010.
18. Coombs, N.J. and J. Boyages, *Multifocal and multicentric breast cancer: does each focus matter?* J Clin Oncol, 2005. 23(30): p. 7497-502.
19. Andea, A.A., et al., *Pathologic analysis of tumor size and lymph node status in multifocal/multicentric breast carcinoma*. Cancer, 2002. 94(5): p. 1383-90.
20. Weissenbacher, T.M., et al., *Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified?* Breast Cancer Res Treat, 2010. 122(1): p. 27-34.
21. Baranwal, S. and S.K. Alahari, *Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 384(1): p. 6-11.
22. Schmalhofer, O., S. Brabletz, and T. Brabletz, *E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2009. 28(1-2): p. 151-66.
23. Natalwala, A., R. Spychal, and C. Tselepis, *Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract*. World J Gastroenterol, 2008. 14(24): p. 3792-7.
24. Perl, A.K., et al., *A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma*. Nature, 1998. 392(6672): p. 190-3.
25. Alford, D. and J. Taylor-Papadimitriou, *Cell adhesion molecules in the normal and cancerous mammary gland*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1996. 1(2): p. 207-18.
26. Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie; M.Eder, P.Gredigk; 1986
27. Berx, G. and F. Van Roy, *The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression*. Breast Cancer Res, 2001. 3(5): p. 289-93.

28. Margineanu, E., C.E. Cotrutz, and C. Cotrutz, *Correlation between E-cadherin abnormal expressions in different types of cancer and the process of metastasis*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2008. 112(2): p. 432-6.
29. Weigelt, B., et al., *The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type*. J Pathol, 2010. 220(1): p. 45-57.
30. Takahashi-Yanaga, F. and T. Sasaguri, *The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery*. J Pharmacol Sci, 2007. 104(4): p. 293-302.
31. Carraway, K.L., V.P. Ramsauer, and C.A. Carraway, *Glycoprotein contributions to mammary gland and mammary tumor structure and function: roles of adherens junctions, ErbBs and membrane MUCs*. J Cell Biochem, 2005. 96(5): p. 914-26.
32. Kufe, D.W., *Mucins in cancer: function, prognosis and therapy*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(12): p. 874-85.
33. Apostolopoulos, V., I.F. McKenzie, and G.A. Pietersz, *Breast cancer immunotherapy: current status and future prospects*. Immunol Cell Biol, 1996. 74(5): p. 457-64.
34. Kufe, D.W., *Targeting the human MUC1 oncoprotein: a tale of two proteins*. Cancer Biol Ther, 2008. 7(1): p. 81-4.
35. Singh, P.K. and M.A. Hollingsworth, *Cell surface-associated mucins in signal transduction*. Trends Cell Biol, 2006. 16(9): p. 467-76.
36. Carraway, K.L., et al., *Cell signaling through membrane mucins*. Bioessays, 2003. 25(1): p. 66-71.
37. Niv, Y., *MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations*. World J Gastroenterol, 2008. 14(14): p. 2139-41.
38. In Anlehnung an: Praxis der Immunhistochemie; H.Höfer, K.-M.Müller; 2000
39. Okimura, A., et al., *Immunohistochemical analyses of E-cadherin, beta-catenin, CD44s, and CD44v6 expressions, and Ki-67 labeling index in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and associated invasive carcinomas*. Med Mol Morphol, 2009. 42(4): p. 222-9.
40. Lugli, A., et al., *Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, beta-catenin and E-cadherin in colorectal cancer: a tissue microarray-based analysis*. Histopathology, 2007. 50(4): p. 453-64.

41. Makdissi, F.B., et al., *Expression of E-cadherin, Snail and Hakai in epithelial cells isolated from the primary tumor and from peritumoral tissue of invasive ductal breast carcinomas*. Braz J Med Biol Res, 2009. 42(12): p. 1128-37.
42. Lapyckyj, L., et al., *Expression analysis of epithelial cadherin and related proteins in IBH-6 and IBH-4 human breast cancer cell lines*. J Cell Physiol, 2010. 222(3): p. 596-605.
43. Mohammadizadeh, F., et al., *Correlation of E-cadherin expression and routine immunohistochemistry panel in breast invasive ductal carcinoma*. Cancer Biomark, 2009. 5(1): p. 1-8.
44. Lialiaris, T.S., et al., *Prognostic and predictive factors of invasive ductal breast carcinomas*. J BUON, 2010. 15(1): p. 79-88.
45. Zhang, Y.G., et al., *Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas*. Chin Med J (Engl), 2007. 120(18): p. 1597-605.
46. Nurismah, M.I., et al., *E-cadherin expression correlates with histologic type but not tumour grade in invasive breast cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2008. 9(4): p. 699-702.
47. Dian, D., A. Bruning, and I. Mylonas, *E-cadherin as a prognostic marker in human serous carcinomas of the ovary: an immunohistochemical analysis*. Arch Gynecol Obstet, 2010.
48. Lopez-Knowles, E., et al., *Cytoplasmic localization of beta-catenin is a marker of poor outcome in breast cancer patients*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. 19(1): p. 301-9.
49. Bukholm, I.R., J.M. Nesland, and G. Bukholm, *Expression of adhesion proteins E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and gamma-catenin is different in T1 and T2 breast tumours*. Pathology, 2006. 38(5): p. 403-7.
50. Abd El-Rehim, D. and M.M. Ali, *Aberrant expression of beta-catenin in invasive ductal breast carcinomas*. J Egypt Natl Canc Inst, 2009. 21(2): p. 185-95.
51. van der Vegt, B., et al., *The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma*. Histopathology, 2007. 51(3): p. 322-35.
52. Lundy, J., et al., *Monoclonal antibody DF3 correlates with tumor differentiation and hormone receptor status in breast cancer patients*. Breast Cancer Res Treat, 1985. 5(3): p. 269-76.

53. Rahn, J.J., et al., *The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature*. Cancer, 2001. 91(11): p. 1973-82.
54. Ellis, I.O., et al., *Immunocytochemical staining of breast carcinoma with the monoclonal antibody NCRC 11: a new prognostic indicator*. Br Med J (Clin Res Ed), 1985. 290(6472): p. 881-3.
55. Baildam, A.D., et al., *The expression of milk fat globule antigens within human mammary tumours: relationship to steroid hormone receptors and response to endocrine treatment*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. 25(3): p. 459-67.
56. Walker, R.A., *Assessment of milk fat globule membrane antibodies and lectins as markers of short-term prognosis in breast cancer*. Br J Cancer, 1990. 62(3): p. 462-6.
57. de Oliveira, J.T., et al., *MUC1 expression in canine malignant mammary tumours and relationship to clinicopathological features*. Vet J, 2009. 182(3): p. 491-3.
58. Kuhn, C., Jeschke, U., Mayr, D., et al., *Test of humanised mucin-1 antibodies Pankomab on the binding behavior of ovarian carcinoma*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2009. 69(5): p.461-461.
59. Dian, D., et al., *Evaluation of a novel anti-mucin 1 (MUC1) antibody (PankoMab) as a potential diagnostic tool in human ductal breast cancer; comparison with two established antibodies*. Onkologie, 2009. 32(5): p. 238-44.
60. Prasad, C.P., et al., *Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast*. BMC Cancer, 2009. 9: p. 325.
61. Kondo, K., et al., *Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines*. Cancer Res, 1998. 58(9): p. 2014-9.
62. Yuan, Z., et al., *Down-regulation of MUC1 in cancer cells inhibits cell migration by promoting E-cadherin/catenin complex formation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 362(3): p. 740-6.
63. Li, Y., et al., *Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin*. Mol Cell Biol, 1998. 18(12): p. 7216-24.
64. Singh, R. and D. Bandyopadhyay, *MUC1: a target molecule for cancer therapy*. Cancer Biol Ther, 2007. 6(4): p. 481-6.
65. Persson, J., et al., *Molecular evolution of specific human antibody against MUC1 mucin results in improved recognition of the antigen on tumor cells*. Tumour Biol, 2009. 30(4): p. 221-31.

66. Raina, D., et al., *Direct targeting of the mucin 1 oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2009. 69(12): p. 5133-41.
67. Yang, H., N.H. Cho, and S.Y. Seong, *The Tat-conjugated N-terminal region of mucin antigen 1 (MUC1) induces protective immunity against MUC1-expressing tumours*. *Clin Exp Immunol*, 2009. 158(2): p. 174-85.

## 7 Anhang

### 7.1 Übersichtstabelle der Patientencharakteristik

	Mehrherdig (%)	Einherdig (%)	p-Wert
<b>Patientenzahl</b>	23	23	
<b>Alter (Median)</b>	68	57	0,104
<b>Menopausenstatus</b>			0,291
prämenopausal	4 (17,4)	6 (26,1)	
perimenopausal	0	1 (4,3)	
postmenopausal	18 (78,3)	14 (60,9)	
unbekannt	1 (4,3)	2 (8,7)	
<b>Histologie</b>			0,120
duktal	16 (69,6)	15 (65,2)	
lobulär	5 (21,7)	3 (13,0)	
duktal-lobulär	2 (8,7)	1 (4,3)	
medullär	0	1 (4,3)	
mikro-/papillär	0	2 (8,7)	
unbekannt	0	1 (4,3)	

Tabelle 7.1: Patientencharakteristik Matched-Pair-Gruppe

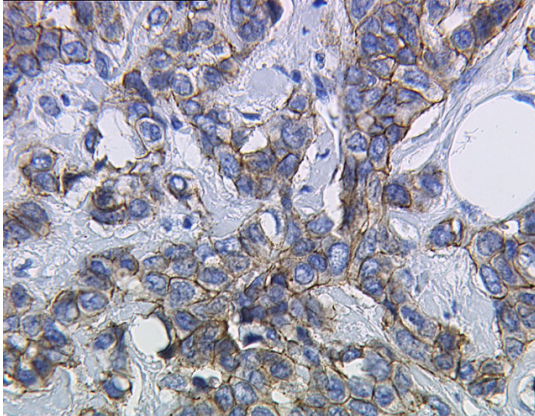


	<b>Mehrherdig (%)</b>	<b>Einherdig (%)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Patientenzahl</b>	55	57	
<b>Alter (Median)</b>	61	59	0,533
<b>Menopausenstatus</b>			0,503
prämenopausal	13 (23,3)	16 (28,1)	
perimenopausal	1 (1,8)	2 (3,5)	
postmenopausal	36 (65,5)	34 (59,6)	
unbekannt	5 (9,1)	5 (8,8)	
<b>Tumorgröße</b>			0,113
pT1a	2 (3,6)	3 (5,3)	
pT1b	8 (14,5)	19 (33,3)	
pT1c	28 (50,9)	18 (31,6)	
pT2	12 (21,8)	15 (26,3)	
pT3	1 (1,8)	0	
pT4b	2 (3,6)	1 (1,8)	
pT4d	1 (1,8)	0	
unbekannt	1 (1,8)	1 (1,8)	
<b>Lymphknotenstatus</b>			0,150
pN0	27 (49,1)	35 (61,4)	
pN1bi	4 (7,3)	7 (12,3)	
pN1biii	18 (32,7)	8 (14,0)	
pN1biv	0	3 (5,3)	
pN2	1 (1,8)	1 (1,8)	
unbekannt	5 (9,1)	3 (5,3)	
<b>Histologie</b>			0,003
duktal	35 (63,6)	39 (68,4)	
lobulär	11 (20,0)	3 (5,3)	
duktal-lobulär	4 (7,3)	3 (5,3)	
mucinös	1 (1,8)	2 (3,5)	
medullär	1 (1,8)	4 (7,0)	
mikro-/papillär	1 (1,8)	2 (3,5)	
tubulär	0	3 (5,3)	
unbekannt	2 (3,6)	1 (1,8)	
<b>Grading</b>			0.068
G1	6 (10,9)	3 (5,3)	
G2	38 (69,1)	35 (61,4)	
G3	10 (18,2)	18 (31,6)	
unbekannt	1 (1,8)	1 (1,8)	

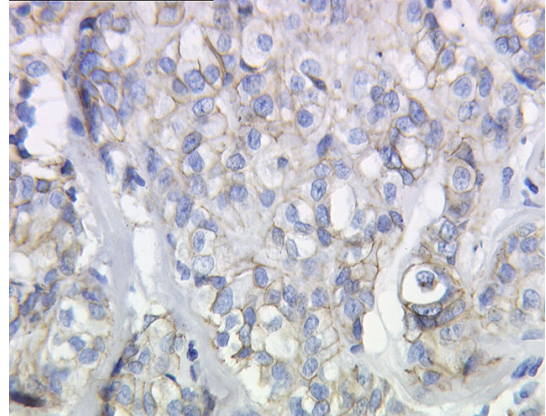
Tabelle 7.2: Patientencharakteristik Gesamtkollektiv

## 7.2 Fotos

**E-Cadherin-Expression** eines Matching-Paares (pT1c, pN0, G2); 25-fache Vergrößerung



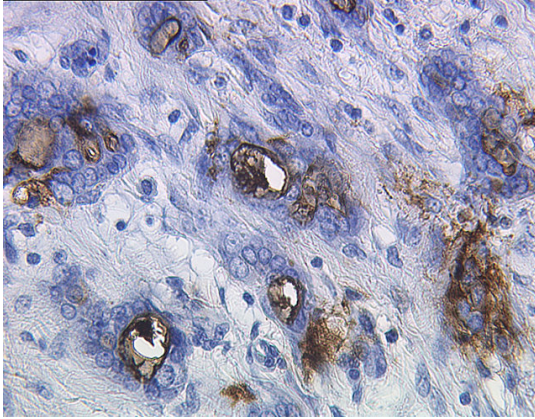
**Bild 1**  
**Unifokales Mammakarzinom**



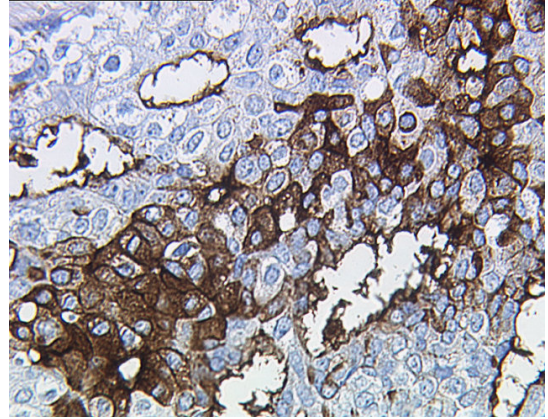
**Bild 2**  
**Multifokales Mammakarzinom**



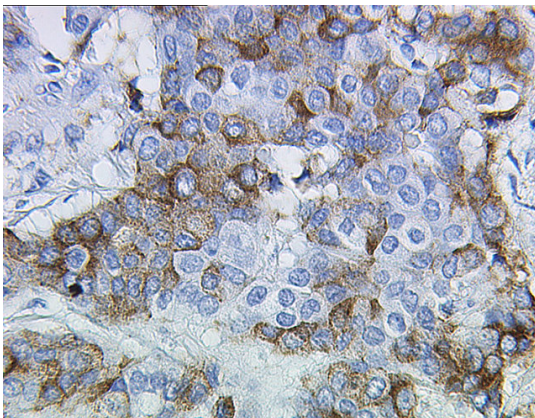
**Mucin-1-Expression** im Gesamtkollektiv bei ein- und mehrherdigen Mammakarzinomen je nach histopathologischer Differenzierung; 25-fache Vergrößerung



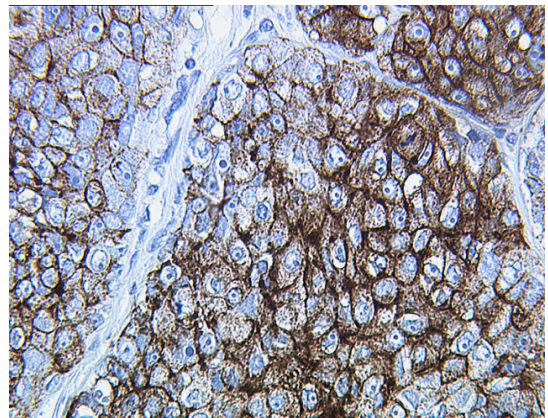
**Bild 3**  
Unifokales Mammakarzinom; G1



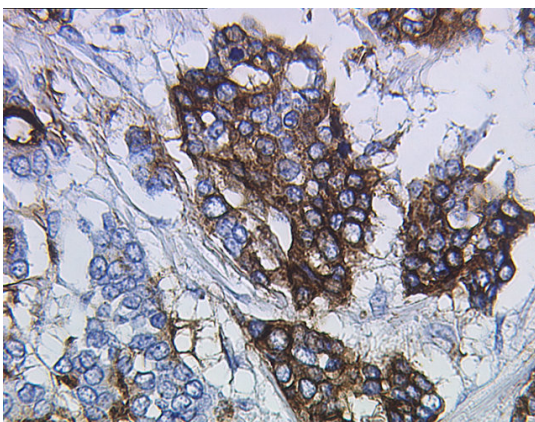
**Bild 6**  
Multifokales Mammakarzinom; G1



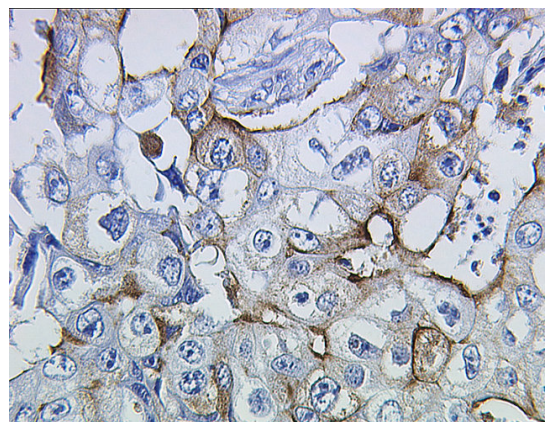
**Bild 4**  
Unifokales Mammakarzinom; G2



**Bild 7**  
Multifokales Mammakarzinom; G2



**Bild 5**  
Unifokales Mammakarzinom; G3



**Bild 8**  
Multizentrisches Mammakarzinom; G3

## Abkürzungsverzeichnis

ABC-Kit	Avidin-Biotin-Komplex-Kit
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CDH1-Gen	Gen, das E-Cadherin kodiert
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonucleinacid (-säure)
Fc-Fragment	Fragment crystalline (nicht-antigenbindendes Molekülende eines Antikörpers)
G1 / 2 / 3	Grading 1 / 2 / 3
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2, erb-B2, c-erbB2
Ig G	Immunglobulin G
Inc.	Incorporated
IRS-Score	Immunreaktiver Score
M	Mol
PBS-Puffer	Phosphate-Borate-Saline-Puffer
pTNM	Pathologische/postoperative histopathologische Klassifikation maligner Tumoren
TNM-Klassifikation	Stadieneinteilung von malignen Tumoren nach Tumorgroße (T), Nodus (N; Lymphknotenstatus), Metastasen (M)
SPSS	Statistical Package for Social Sciences

## **Danksagung**

Besonders danke ich Herrn Prof. U. Jeschke für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Forschungsgruppe, sowie für seine fachkundige Hilfestellung bei auftretenden Fragen und bei der statistischen Ausarbeitung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Weißenbacher, der mich mit viel Engagement während der gesamten Zeit unterstützte und mir mit zahlreichen Ratschlägen im Rahmen der Ausarbeitung und der Korrektur eine große Hilfe war. Vielen Dank für die kompetente Betreuung.

Ich danke Frau PD Dr. D. Mayr für die nachträgliche Datenerhebung einiger fehlender Patientendaten.

Des Weiteren möchte ich Christina Kuhn, Susanne Kunze und Simone Hofmann für die sehr gute Einarbeitung und freundliche Unterstützung im Labor danken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der I. Frauenklinik der Universität München für die herzliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima.

Zuletzt geht ein großer Dank an meine Familie und Matthias, die immer für mich da sind und mich stets unterstützen.