

**Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

Campus Benjamin Franklin

aus der Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz

Direktor: Prof. Dr. med. Achim Schneider, M.P.H.

**Die Co-Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und  
der Rezeptoren der Epidermal Growth Factor (EGF)-Familie  
(HER-1, HER-2, HER-3, HER-4) in humanen invasiv-duktalem  
Mammakarzinomen sowie in Nacktmaus-Modellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
Medizinischen Doktorwürde  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Julia Buchwald  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. D. Ebert

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 22.02.2008

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	Epidemiologie und Ätiologie	4
1.2	Prognostische und prädiktive Faktoren	4
1.3	Problemstellung	6
1.4	Die Cyclooxygenase	7
	1.4.1 <i>Enzymcharakterisierung</i>	7
	1.4.2 <i>Transkriptionale Regulation der COX-2</i>	9
	1.4.3 <i>COX-2 und Neoangiogenese, Proliferation und Invasivität</i>	10
	1.4.4 <i>COX-2 und östrogenabhängiges Tumorwachstum</i>	10
1.5	EGF-Rezeptorfamilie	12
	1.5.1 <i>Wachstumsfaktoren</i>	12
	1.5.2 <i>Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie</i>	12
	1.5.3 <i>Struktur der EGF-Rezeptoren</i>	13
	1.5.4 <i>EGF-verwandte Peptide und Signaltransduktion</i>	14
1.6	Ziel der Arbeit	15
1.7	Fragestellungen der Arbeit	16
<b>2.</b>	<b>Materialien und Gewebe</b>	<b>17</b>
2.1	Patientinnen	17
2.2	Verfahren und Mittel zur Untersuchung	18
	2.2.1 <i>Geräte und Laborhilfen</i>	18
	2.2.2 <i>Verbrauchsmaterialien, Einmalartikel und Chemikalien</i>	18
	2.2.3 <i>Reagenzien und Puffer</i>	19
	2.2.4 <i>Primärantikörper</i>	20
2.3	Herkunft der Tumorgewebe	20
	2.3.1 <i>Präparate von Patientinnen</i>	20
	2.3.2 <i>Zelllinien</i>	20
2.4	Tierversuche	21
	2.4.1 <i>Tiere</i>	21
	2.4.2 <i>Tierhaltung</i>	21
	2.4.3 <i>Transplantate von Mammakarzinomen auf Nacktmäuse</i>	21
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
3.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	22
	3.1.1 <i>Kryoschnitte</i>	22
	3.1.2 <i>Paraffinschnitte</i>	22

---

3.2	Entparaffinieren	22
3.3	Denaturierungsverfahren unter Hitzeeinwirkung	22
3.4	Absättigung unspezifischer Bindungen	23
3.5	Immunhistochemische Färbung	23
	3.5.1 COX-2-Färbung	23
	3.5.2 EGF-Färbungen	24
3.6	Positiv- und Negativkontrollen	24
3.7	Spezifität der Färbungen	25
3.8	Interne Validierung	25
3.9	Auswertungen	26
	3.9.1 Untersuchte klinopathologische Merkmale	26
	3.9.2 Scoring	27
	3.9.3 Statistik	27
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
4.1	Allgemeine Tumorcharakterisierung	28
4.2	Expression der untersuchten Targets	29
4.3	Expression der COX-2 in Abhängigkeit zur Expression der EGF-Rezeptoren	31
	4.3.1 HER-1 und HER-2	31
	4.3.2 HER-3 und HER-4	33
4.4	COX-2-Expression und klinopathologische Merkmale	36
	4.4.1 Tumorstadium	36
	4.4.2 Nodal-Status	36
	4.4.3 Fernmetastasierung	37
	4.4.4 Grading	37
	4.4.5 Tumolvolumen	38
	4.4.6 Proliferationsrate Ki 67	38
	4.4.7 Alter	39
	4.4.8 Menopause	39
	4.4.9 Parität	40
	4.4.10 Expression des Östrogenrezeptors	40
	4.4.11 Expression des Progesteronrezeptors	41
4.5	Experimente mit Mammakarzinom-Zelllinien	42
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
5.1	COX-2-Expression	44
5.2	Expression der EGF-Rezeptoren	45
5.3	COX-2-Expression und klinopathologische Merkmale	47

---

5.3.1	<i>TNM-Stadium, Tumorzellen</i>	47
5.3.2	<i>Grading und Proliferationsrate</i>	48
5.3.3	<i>Alter, Menopause und Parität</i>	50
5.3.4	<i>Hormonabhängiges Tumorzellenwachstum</i>	51
5.4	Zelllinien	53
5.5	Methodenkritik	53
5.6	Nutzen und Risiko von Coxiben	54
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>74</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>75</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom ist nach Erhebungen des Statistischen Bundesamtes die häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland (Statistisches Bundesamt Stand 10/2006). Ungefähr eine von 10 Frauen in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom (Giersiepen et al. 2005), wobei die Inzidenz in Deutschland 55.000 Neuerkrankungen pro Jahr laut der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland beträgt (GEKID, 2006). Für Frauen zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache (Giersiepen et al. 2005) und ist somit nicht nur für jede betroffene Frau, sondern auch aus epidemiologischen und nicht zuletzt gesellschaftsökonomischen Gesichtspunkten von entscheidender Bedeutung. Die relative 5-Jahres-Überlebenszeit beträgt nach aktuellen Schätzungen über alle Tumorstadien gesehen 79 % (GEKID, 2006). Dies stellt eine Verbesserung gegenüber den Ergebnissen der EUROCORE-3-Studie dar, bei der das relative 5-Jahres-Überleben nur auf 75,4 % geschätzt wurde (Sant et al. 2003).

Ein überproportional hohes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken, haben BRCA-1 und BRCA-2-(breast cancer gen) Mutationsträgerinnen (Frank et al. 2002). Bei diesen Genen, die auf dem langen Arm des Chromosoms 17 in 17q21 bzw. auf Chromosom 13q lokalisiert sind, handelt es sich um Tumorsuppressorgene. Bei etwa 5 % aller an Brustkrebs erkrankten Frauen folgt die Erkrankung einem autosomal dominanten Erbgang.

Heterozygote BRCA1-Mutationsträgerinnen haben ein Risiko von 60–80 %, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken. Für Trägerinnen von Mutationen im BRCA-1-Gen ist auch das Risiko für das Auftreten eines Ovarialkarzinoms erhöht; so erkranken 25–40 % bis zum 75. Lebensjahr (Kiechle et al. 2003, Antoniou et al. 2003). Auch das Risiko für ein kontralaterales Mammakarzinom ist signifikant erhöht und abhängig vom Ersterkrankungsalter (Verhoog et al. 2000). Bei Ersterkrankung vor dem 50. Lebensjahr haben nach zehn Jahren rund 40 % ein kontralaterales Mammakarzinom, nach dem 50. Lebensjahr nur rund 12 % (Metcalf et al. 2004).

### 1.2 Prognostische und prädiktive Faktoren

Mammakarzinome werden entsprechend ihres histologischen Phänotyps klassifiziert. Bei Ausbildung mehrerer Tumorkomponenten ist der dominierende Anteil maßgeblich. Unter den invasiven Mammakarzinomen ist das invasiv-duktales Karzinom mit 70–80 % der bei weitem häufigste Tumortyp (Deutsche Krebsgesellschaft, nationale S3 Leitlinie Mammakarzinom, 2006).

Gegenwärtig ist das klinische Staging mit Hilfe der TNM-Klassifikation, wie sie in Tabelle 1.1 dargestellt ist, zur Abschätzung des individuellen Krankheitsverlaufs der erste Schritt in der Tumoreinteilung. Es werden Tumorgröße (T), axillärer Lymphknotenstatus (N) und die Fern-

metastasierung (M) beurteilt, wobei der wichtigste Parameter der Befall der ipsilateralen axillären Lymphknoten ist. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der befallenen Lymphknoten mit der Überlebenszeit und dem Risiko, an einem Rezidiv zu erkranken (Carter et al. 1989). Patientinnen mit negativem Nodal-Status entwickeln in den nächsten 10 Jahren nach Diagnosestellung in 20–30 % der Fälle ein Rezidiv, in der Gruppe der nodalpositiven sind es 70 % (Veronesi et al. 1993).

**Tab. 1.1:** TNM-Klassifikation (modifiziert nach UICC, 2002)

<b>T</b>	<b>Ausdehnung des Primärtumors</b>
<b>T<sub>0</sub></b>	kein Anhalt für Primärtumor
<b>T<sub>1</sub></b>	≤ 2 cm
<b>T<sub>2</sub></b>	> 2 bis 5 cm
<b>T<sub>3</sub></b>	> 5 cm
<b>T<sub>4</sub></b>	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
<b>N</b>	<b>Regionale Lymphknoten</b>
<b>N<sub>0</sub></b>	keine Lymphknotenmetastasen
<b>N<sub>1</sub></b>	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
<b>N<sub>2</sub></b>	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert
<b>N<sub>3</sub></b>	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
<b>M<sub>0</sub></b>	keine Fernmetastasen nachweisbar
<b>M<sub>1</sub></b>	Fernmetastasen vorhanden

Für Therapieentscheidungen werden nach den aktuellen Empfehlungen Alter, Nodalstatus, Tumorgröße, Grading sowie der Hormonrezeptorstatus zur Einschätzung des Ansprechens auf eine endokrine Therapie bestimmt (Goldhirsch et al. 2005, Eiermann 2003, Harbeck et al. 2001). Der HER-2-Status ist für die Indikationsstellung zur adjuvanten Trastuzumab-Behandlung notwendig (AGO, 2006), für die Art der endokrinen Therapie jedoch ohne Bedeutung (Bundred et al. 2001). HER-2 ist bei 20–30 % der invasiven Mammakarzinome (Homaei-Shandiz et al. 2006, Slamon et al. 1989) überexprimiert und in diesen Fällen wird bei Mammakarzinomen mit Lymphknotenbefall oder bei nodal negativer Erkrankung mit zusätzlichen Risikofaktoren die Gabe von Trastuzumab empfohlen (AGO, Organkommission Mammakarzinom 2006).

Bei positivem Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren profitieren die Patientinnen von einer endokrinen Therapie. Gemäß den aktuellen Empfehlungen der Arbeits-

gemeinschaft Gynäkologische Onkologie sollte bei hormonempfindlichen Tumoren für Patientinnen in der Postmenopause eine Hormontherapie Bestandteil eines multimodalen Therapieregimes sein (Jackisch et al. 2006). Die ATAC-Studie lässt im Behandlungsregime den Schluss zu, dass eine adjuvante Therapie mit Anastrozol der Tamoxifen-Monobehandlung sowohl im Hinblick auf die Zeitspanne des rezidivfreien Überlebens als auch in der Häufigkeit eines kontralateralen Mammakarzinoms überlegen ist (Howell et al. 2005). Patientinnen mit Östrogenrezeptor negativen Tumoren profitieren nicht von dieser Therapie (Sattler et al. 2001).

### **1.3 Problemstellung**

Der Überexpression einzelner Rezeptoren beim Mammakarzinom wird eine prädiktive Relevanz zugeschrieben. Eine Überexpression des HER-2-Onkoproteins, wie sie etwa 20–30 % der invasiven Mammakarzinome zeigen (Slamon et al. 1987), werden in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose, einem erhöhten Risiko der Metastasierung und einer vermehrten Neigung zu Rezidiven (Lopez-Guerrero et al. 2006, Tetu et Brisson 1994, Tandon et al. 1989) gebracht. Doch Trastuzumab ist nur für die Therapie bei Patientinnen mit HER-2-überexprimierendem Mammakarzinom mit Lymphknotenbefall sowie bei nodal negativer Erkrankung mit zusätzlichen Risikofaktoren wie einer Tumorgröße von  $\geq 1\text{cm}$  zugelassen (AGO, Organkommission Mammakarzinom 2006), so dass dieser Therapieansatz nur für eine kleine Gruppe von Patientinnen in Frage kommt.

In verschiedenen Karzinomen fand man eine Überexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), einem Schlüsselenzym in der Synthese der Prostaglandine, wie zum Beispiel in Karzinomen von Kolon, Lunge, Mamma und bei der familiären Adenomatosis coli (Soslow et al. 2000, Maekawa et al. 1998, Eberhart et al. 1994). Insbesondere bei Patienten mit familiärer Adenomatosis coli, die fast alle im Laufe ihres Lebens ein Kolonkarzinom entwickeln, konnte nachgewiesen werden, dass unter der Therapie mit spezifischen COX-2-Inhibitoren nicht nur die Größe der Polypen, sondern auch ihre Anzahl signifikant abnahm (Steinbach et al. 2000).

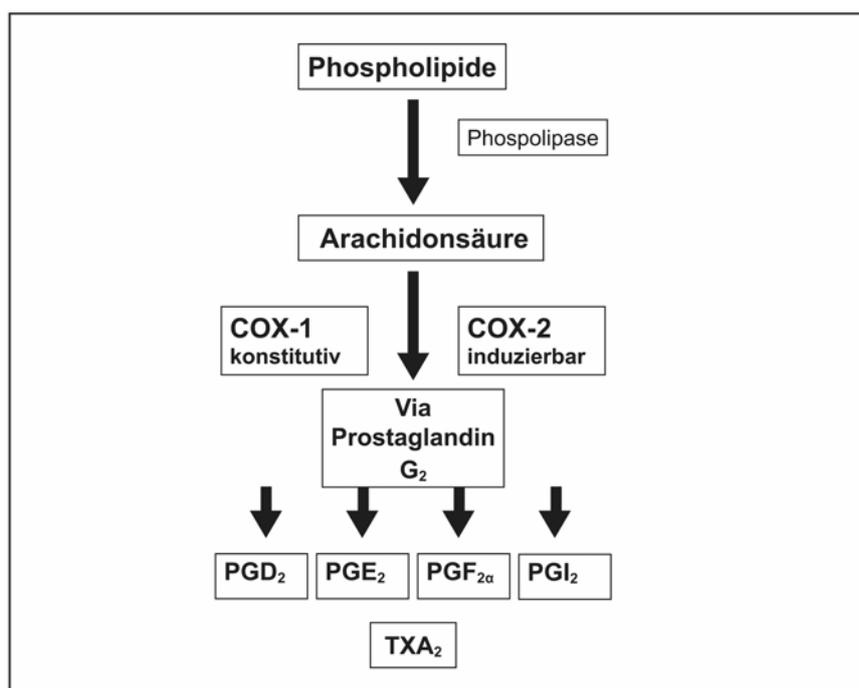
Die Ergebnisse bezüglich der Häufigkeit der COX-2-Expression in Mammakarzinomen sind sehr unterschiedlich (Leo et al. 2006, Ristimäki et al. 2002, Soslow et al. 2000, Hwang et al. 1998, Parrett et al. 1997, Karmali et al. 1983). Ein erhöhter COX-2-Level ist assoziiert mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf (Schmitz et al. 2006), einer großen Tumorgröße (Gunnarsson et al. 2006), einem hohen histologischen Grad (Surowiak et al. 2005, Park et al. 2006), einer hohen Proliferationsrate (Chow et al. 2005), einer hohen p53-Expression (Cho et al. 2006), einem positiven Lymphknotenstatus (Surowiak et al. 2005), sowie einem positiven HER-2- (Cho et al. 2006, Howe et al. 2005) und negativen Hormonrezeptor-Status (Ristimäki et al. 2002, McCarthy et al. 2006). Patientinnen, bei denen eine Überexpression von COX-2 vorliegt, haben eine deutlich schlechtere Prognose (Singh et al. 2006, Park et al. 2006, Surowiak et al. 2005), besonders in Fällen, in denen der Östrogenrezeptorstatus positiv ist (Ristimäki et al. 2002).

Andere Studien stützen eher die Hypothese einer Expression von COX-2 in frühen Tumorstadien ohne Korrelation mit klinopathologischen Variablen (Leo et al. 2006, Nakopoulou et al. 2005, Ranger et al. 2004). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit unspezifischen, aber auch mit spezifischen COX-2-Inhibitoren eine Rückbildung des Mammakarzinoms bewirken kann (Harris et al. 2000, Kundu et al. 2000). Auch die Inzidenz der Mammakarzinome konnte in Studien an Mäusen durch Inhibition der Cyclooxygenase-2 reduziert werden (Howe et al. 2002).

## 1.4 Die Cyclooxygenase

### 1.4.1 Enzymcharakterisierung

Die Cyclooxygenase (COX) konvertiert als intrazelluläre Prostaglandinsynthase bei der Biosynthese der Prostaglandine Arachidonsäure in Prostaglandin  $G_2$  ( $PGG_2$ ) (Smith et al. 1996). Aus dem instabilen  $PGG_2$  werden über  $PGH_2$ , mittels spezifischer Isomerasen, die Prostaglandine  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGD_2$ ,  $PGI_2$  und  $TxA_2$  gebildet (Hershman 1996, Smith et al. 1996). Eine Übersicht über die Synthese der Prostaglandine ist in Abbildung 1.1 wiedergegeben. Prostaglandine spielen allgemein bei der Hämostase (Rabausch et al. 2005), der Aggregation von Thrombozyten (Buerkle et al. 2004), der Reproduktion (Kennedy et al. 1999), der Magen- (Masferrer et al. 1996) und Nierenfunktion (Kennedy et al. 1999), aber auch in inflammatorischen und neoplastischen Geweben eine wesentliche Rolle (Smith et al. 1996). Insbesondere die Prostaglandine  $E_2$  und  $F_{2\alpha}$  gelten für verschiedene Zelltypen als proliferationssteigernde Mitogene (Wu 1996).



**Abb. 1.1:**  
Synthese der Prostaglandine  
(Davies et al. 2002)

**Abkürzungen:**  
Prostaglandin  $D_2$  ( $PGD_2$ )  
Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ )  
Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ )  
Prostaglandin  $I_2$  ( $PGI_2$ )  
Thromboxan  $A_2$  ( $TxA_2$ )

Die Cyclooxygenase existiert in zwei Isoformen, der Cyclooxygenase-1 (COX-1) (Hemler et al. 1976, Miyamoto et al. 1976) und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Xie et al. 1991). Die Cyclooxygenase-1 ist in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert (Smith et al. 1996), wohingegen die Cyclooxygenase-2 in entzündlichen und neoplastischen Geweben durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Onkogene induziert wird (Goulet et al. 2004, Herschman 1996). Inzwischen wurden weitere Isoenzyme, die Cyclooxygenase-3 (COX-3), sowie partielle Proteine der COX-1 charakterisiert, deren Funktion noch nicht eindeutig ergründet ist (Chandrasekharan et al. 2002).

Die biologischen Funktionen, die die Cyclooxygenase-2 im Organismus unterhält, sind vielfältig: In Studien an COX-2-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass Fertilität, Ovulation und Implantation von einer funktionsfähigen Cyclooxygenase-2 abzuhängen scheinen (Lim et al. 1997). Auch die Entwicklung der Nieren (Dinchuk et al. 1995), des Ductus arteriosus Botalli (Loftin et al. 2001), die T-Zell-Differenzierung und die Entwicklung des Thymus (Rocca et al. 1999) ist ohne Cyclooxygenase-2 nicht defektfrei möglich.

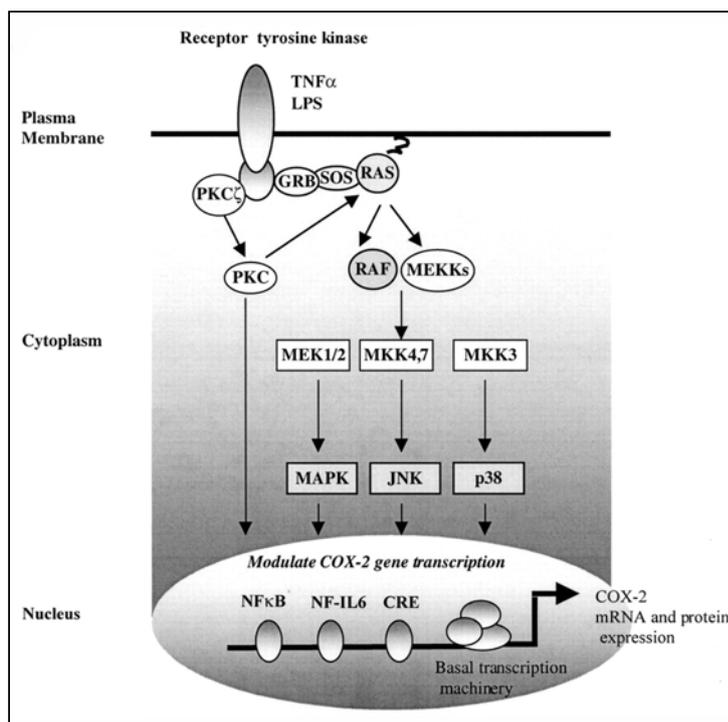
Die Expression der COX-2 spricht auch auf die Aktivierung der verschiedenen Onkogene, unter anderem auch des HER-2, an (Howe et al. 2005, Subbaramaiah et al. 1999). Bei Patientinnen mit Mammakarzinom fand sich eine positive Assoziation zwischen der HER-2- und der COX-2-Expression (Subbaramaiah et al. 2006, Subbaramaiah et al. 1999).

Die Aktivität der Cyclooxygenase, und damit die Prostaglandinsynthese, wird durch die nicht zwischen COX-1 und COX-2 unterscheidenden, peripheren Analgetika wie beispielsweise Acetylsalicylsäure und nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), wie Ibuprofen, inhibiert. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die regelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, deutlich senken konnte (Rahme et al. 2005, Cotterchio et al. 2001, Sharpe et al. 2000, Harris et al. 1999, Harris et al. 1996, Schreinemachers et al. 1994), wobei aber auch die Rate an Nebenwirkungen, wie eine ulzerogene Wirkung auf die Magenschleimhaut, anstieg. Mittels endoskopischer Studien konnte gezeigt werden, dass selektive COX-2-Inhibitoren seltener zu chemisch-toxischen Gastritiden führen, da sie kausal an der intrazellulären Cyclooxygenase-2 ansetzen (Langmann et al. 1999). Vor dem Hintergrund der Möglichkeit, Medikamente zu entwickeln, die gastrointestinale Unverträglichkeit als häufigste Nebenwirkung von NSAIDs vermindern können, kamen mehrere COX-2-spezifische Medikamente auf den Markt (Devchand et al. 2005). Inzwischen sind einige dieser Medikamente wieder zurückgezogen worden, da es zu vermehrtem Auftreten schwerer kardiovaskulärer Komplikationen kam. In der VIGOR (VIOXX Gastrointestinal Outcome Research)-Studie (Brombardi et al. 2000), in der eine mit 50mg/die hoch dosierte Einnahme von Rofecoxib gegen das unspezifische Naproxen (500mg/1-0-1) bei Patienten, die mehrheitlich an Rheumatoider Arthritis litten, getestet wurde, fiel auf, dass die Inzidenz von Myokardinfarkten in der Rofecoxib-Gruppe höher, die Mortalität jedoch in beiden Gruppen identisch war. Bei der Inter-

pretation der Studien gilt es zu bedenken, dass Rheumatoide Arthritis ein Erkrankung ist, die per se mit einem odds ratio von etwa 50 % für das Erleiden eines Myokardinfarktes behaftet ist im Vergleich zu Patienten ohne Arthritis oder mit Osteoarthritis (Watson et al. 2003). In der APPROVe (Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX)-Studie, die letztendlich zur Rücknahme führte, gab es in der Rofecoxib-Gruppe mehr thrombembolische Ereignisse und ein vermehrtes Auftreten von Herzversagen oder Lungenödem bei gleicher Gesamtmortalität (Bresalier et al. 2005). Die EMEA (European Medicines Agency) nahm die Wirkstoffe Rofecoxib und Valdecoxib vom Markt und ergänzte Anwendungsbeschränkungen bei Celecoxib (EMEA press release 2005).

### 1.4.2 Transkriptionale Regulation der COX-2

HER-2 aktiviert als Mitglied der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen die COX-2-Transkription (Lanza-Jacoby et al. 2006, Tortora et al. 2003) unter anderem über die Stimulation der mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) und der Proteinkinase C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ). Über diesen Signaltransduktionsweg wird die Transkription des COX-2-Gens induziert und die Produktion der für die Cyclooxygenase-2 benötigten Proteine gesteigert, so dass vermehrt COX-2 gebildet und exprimiert wird, bzw. bei fehlender COX-2-Expression HER-2-induzierte Tumoren geringere Volumina und Vaskularisation aufweisen (Howe et al. 2005). Eine schematische Darstellung der Signaltransduktionswege, die die COX-2-Expression beeinflussen, ist in Abbildung 1.2 dargestellt.



**Abb. 1.2:**  
COX-2-Expression beeinflussende  
Signaltransduktionswege  
(Davies et al. 2002)

#### Abkürzungen:

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )  
Lipopolysaccharide (LPS)  
Proteinkinase C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ )  
mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)  
cyclisches Adenosinmonophosphat  
response element (CRE)

Im Tiermodell ließ sich demonstrieren, dass der simultane Einsatz von COX-2- und EGFR-Inhibitoren, die Phosphorylierung der extrazellulären signalregulierten Kinase 1/2 vollständig unterbinden und supra-additive Effekte bezüglich der Induzierung von Apoptose erzeugen konnten (Lanza-Jacoby et al. 2006). Andere Studien an nodal negativen Tumoren konnten allerdings einen Signalweg via HER-2, Proteinkinase-1 oder -2 oder auch via stress-induzierbarer Kinase p38 nicht belegen und vermuten andere Regulationsmechanismen (Schmitz et al. 2006).

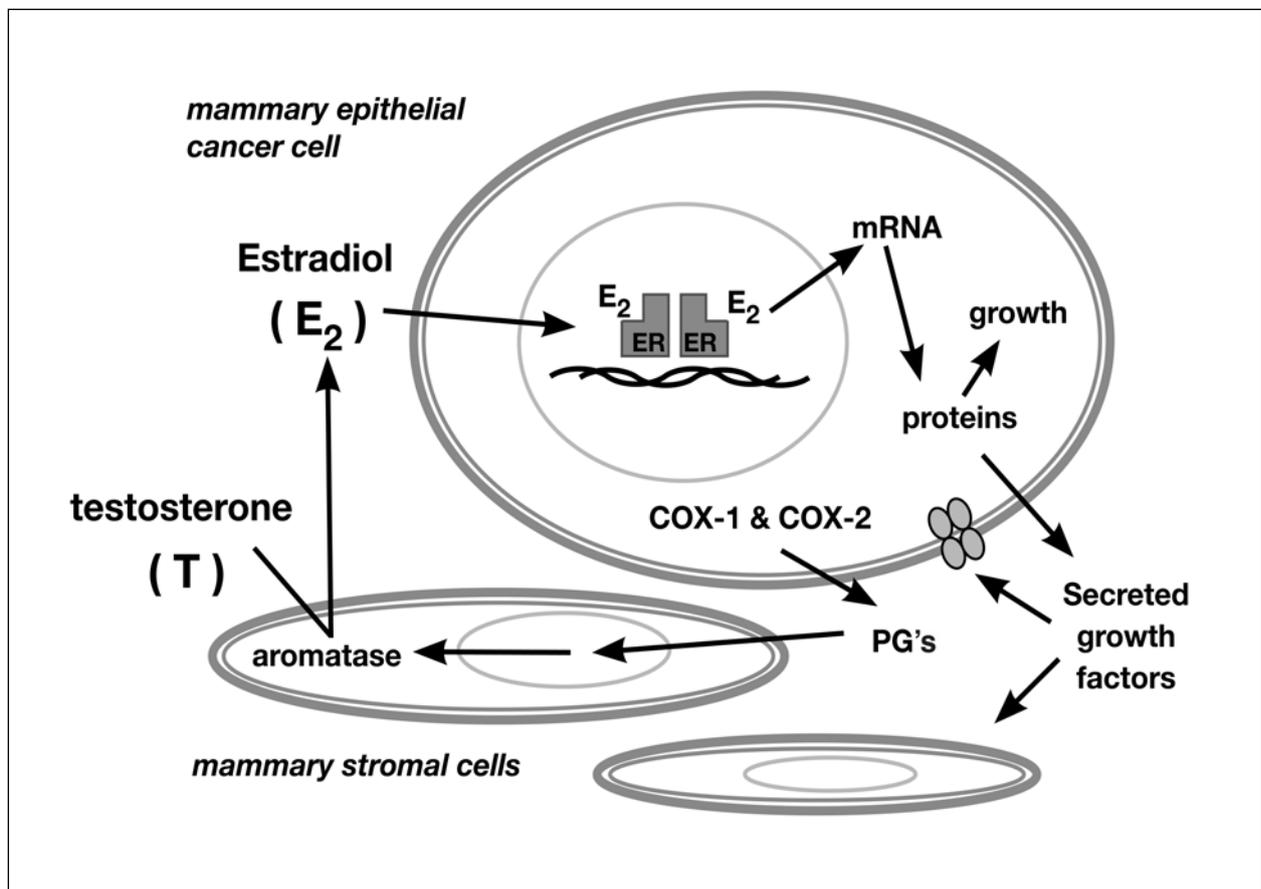
### **1.4.3 COX-2 und Neoangiogenese, Proliferation und Invasivität**

Einer der Mechanismen, mit dem PGE<sub>2</sub> das Tumorstadium steigert, ist die Induzierung der Neoangiogenese (Howe et al. 2005). Die Neubildung von Gefäßen ist für eine ausreichende Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen ab einem Durchmesser von mehr als 2 mm unabdingbar (Hanahan et al. 1996). Darüber hinaus fördert die Hypoxie des Tumorgewebes über ein hypoxie-abhängiges Element in seinem Gen die Expression der COX-2-mRNA (Rozic et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Dichte der Vaskularisation in Tumoren mit Cyclooxygenase-2-Expression deutlich höher war als in Tumoren ohne COX-2-Expression (Chang et al. 2004, Costa et al. 2002). In-vitro-Studien zeigen, dass Celecoxib, ein selektiver COX-2-Inhibitor, die Neoangiogenese in Tumoren reduzieren kann (Basu et al. 2005, Tortora et al. 2003, Masferrer et al. 2000). Durch Versuche an Zelllinien fand man heraus, dass Cyclooxygenase-2 direkt mit der Proliferation, Zellmigration und -invasion sowie der Dichte von Zellmatrixproteinen in Zusammenhang zu bringen ist und möglicherweise eine Schlüsselstelle in der Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen darstellt (Larkins et al. 2006).

### **1.4.4 COX-2 und östrogenabhängiges Tumorstadium**

Bei etwa 60 % aller Patientinnen mit einem Mammakarzinom wächst der Tumor hormonabhängig (Richards et al. 2002, Brueggemeier et al. 1999). Östrogen wird lokal durch intrazelluläre Synthese produziert, weshalb in diesen Fällen die intrazelluläre Aromatase Cytochrom P450<sub>arom</sub> (Synonym Östrogensynthase) verstärkt exprimiert ist (Gunnarsson et al. 2006, Goss et Strasser 2001, Harris et al. 1999, Brodie et al. 1998). Das durch die Cyclooxygenase produzierte PGE<sub>2</sub> stimuliert die Östrogensynthese, indem es die intrazelluläre cAMP-Konzentration promotor-gesteuert erhöht (Gunnarsson et al. 2006). Es wurde eine positive Beziehung zwischen der Aromatase- und der COX-2-Expression gefunden (Subbaramaiah et al. 2006, Brodie et al. 2001, Zhao et al. 1996). Die Vermutung liegt nahe, dass COX-2 mittels autokriner und parakriner Mechanismen am hormonabhängigen Tumorstadium indirekt durch lokale Stimulation der Östrogenproduktion beteiligt ist (Brueggemeier et al. 2005, Richards et al. 2002). Eine hohe Konzentration Östradiol kann wiederum durch vermehrte Transkription und Translation die COX-2-Expression induzieren (Brueggemeier et al. 2005). Eine modellhafte Darstellung der

autokrinen und parakrinen Stimulation zur Regulation der Expression von Cyclooxygenase-2 und Aromatase in Mammakarzinomzellen zeigt Abbildung 1.3.



**Abb. 1.3:**  
Modell der autokrinen und parakrinen Stimulation zur Regulation der Expression von COX-2 und Aromatase in Mammakarzinomzellen (Richards et al. 2002)

Auch die Überexpression von HER-2 ist mit einer erhöhten Aktivität der Aromatase verbunden (Subbaramaiah et al. 2006). In-vitro-Studien legen die Vermutung nahe, dass die Cyclooxygenase-2 das entscheidende Verbindungsglied im Regelkreis zwischen HER-2-Expression und der Aromatase ist, konnte doch die HER-2-induzierte Prostaglandinsynthese und Aktivität der Aromatase durch Inhibition der Cyclooxygenase-2 unterbunden werden (Subbaramaiah et al. 2006). In einer Planungsstudie wurde die Kombination von Exemestan und Celecoxib bei Patientinnen mit Östrogenrezeptor positiven Tumoren eingesetzt und bei einer „treatment-success“-Rate von 60 % kann man auf folgende Phase-III-Studien gespannt sein (Canney et al. 2006). Eine erhöhte Konzentration des Progesteronrezeptors wurde besonders in Tumoren höherer Tumorstadien gefunden. Östrogen könnte zu einer Hochregulation des Progesteronrezeptors führen (Smith et al. 2003).

## 1.5 EGF-Rezeptorfamilie

### 1.5.1 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren spielen nicht nur bei der Regulation von Mitoseraten, der Zelldifferenzierung und der Regulation des Zellhaushaltes in gesunden Geweben eine wesentliche Rolle, sondern beeinflussen auch das Wachstum eines Tumors entscheidend (Bazley et Gullick 2005). Viele Karzinomzellen können endogene Wachstumsfaktoren bilden. Sie sind daher von exogenen Faktoren weniger abhängig, da sie sich selbst auf intrakrinem, juxtakrinem, autokrinem oder parakrinem Wege stimulieren können, vorausgesetzt, sie verfügen über die spezifischen Rezeptoren (Brandt et al. 1998, Gullick et al. 1998, Aaronson 1991). Auch die Überexpression dieser Rezeptoren für die Bindung der Wachstumsfaktoren kann bereits bei geringen Konzentrationen endo- oder exogener Wachstumsfaktoren zur Hypersensibilisierung der Tumorzellen führen. Die häufigste Ursache für eine Überexpression der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren ist eine Genamplifikation oder eine erhöhte Transkriptionsrate des Gens. Dabei werden dauerhaft wachstumsfördernde Signale an die Zelle abgegeben, die Zellteilungsrate erhöht sich und es kommt zu unkontrolliertem Tumorwachstum. Die EGF (epidermal growth factor)-verwandten Peptide stellen eine der größten bekannten Familien von Wachstumshormonen dar (Bazley et Gullick 2005, Salomon et al. 1995 A,) und sind komplett in ihrem Genom entschlüsselt (Robinson et al. 2000).

### 1.5.2 Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie

EGF-verwandte Peptide aktivieren die EGF-Rezeptoren. Diese gehören zur erbB-Typ-1-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie. Sie umfasst vier verschiedene Rezeptoren (Robinson et al. 2000) mit wenigstens 30 verschiedenen Liganden (Stein et Staros 2006), und zwar HER-1, HER-2, HER-3 und HER-4 (Bazley et Gullick 2005, Hynes et al. 1994, Rajkumar et al. 1994, Plowman et al. 1993, Kraus et al. 1989). Eine Auflistung der Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie und alternativen Bezeichnungen der Rezeptoren finden sich in Tabelle 1.2.

- HER-1 (EGFR, erbB)
- HER-2 (Her-2/neu, erbB-2)
- HER-3 (erbB-3)
- HER-4 (erbB-4 )

**Tab.1.2:**  
*Mitglieder der EGF-Rezeptorfamilie*

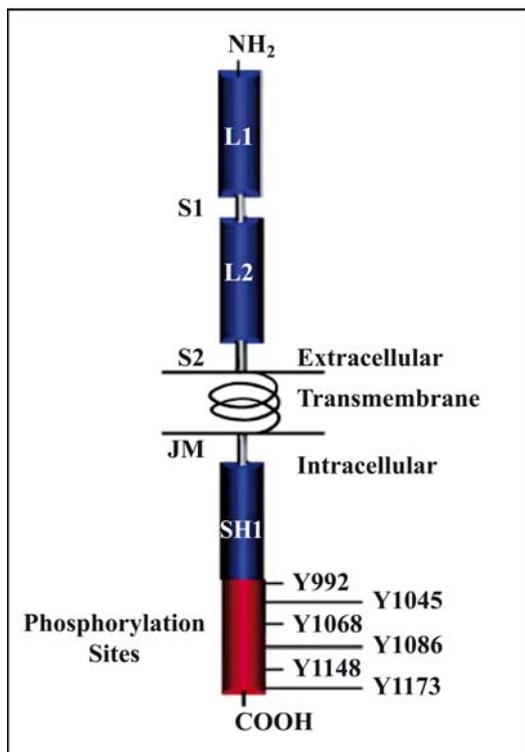
Durch die Übertragung von Wachstumssignalen auf die Zelle sorgen diese Rezeptoren im gesunden Brustdrüsengewebe für ein kontrolliertes Zellwachstum. Im Allgemeinen sind HER-1 und HER-2 eher in proliferierenden, undifferenzierten Geweben zu finden, während HER-3 und HER-4 eher in differenzierten Geweben vorherrschen (Memon et al. 2006, Srinivasan et al.

2000). Eine Einführung in die Struktur und die Signaltransduktion der EGF-Rezeptoren und ihrer Liganden ist im Folgenden dargestellt.

### 1.5.3 Struktur der EGF-Rezeptoren

Der erste entdeckte Rezeptor dieser Familie war der EGF-Rezeptor (hier wegen der einheitlichen Bezeichnung HER-1) (Carpenter et al. 1978). Die transmembranären Rezeptorproteine haben alle eine ähnliche Struktur und werden auf epidermalen Zellen exprimiert.

Eine im Zytoplasma liegende Domäne vermittelt die ligandengesteuerte Tyrosinkinaseaktivität und besitzt Motive zur Tyrosin-Autophosphorylierung (Bazley et Gullick 2005, Srinivasan et al. 2000), eine kurze Juxta- und Transmembransequenz schafft die Verbindung zur extrazellulär liegenden cysteinreichen und glykosylierten Domäne, an die Liganden binden können. Die extrazelluläre Domäne enthält vier Untereinheiten, L1 und L2, bzw. S1 und S2, wobei S1 und S2 cysteinreiche, homologe Regionen sind und L1 und L2 die Ligandenbindungsstellen formen (Ogiso et al. 2002). Eine schematische Skizzierung der Struktur der EGF-Rezeptoren ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

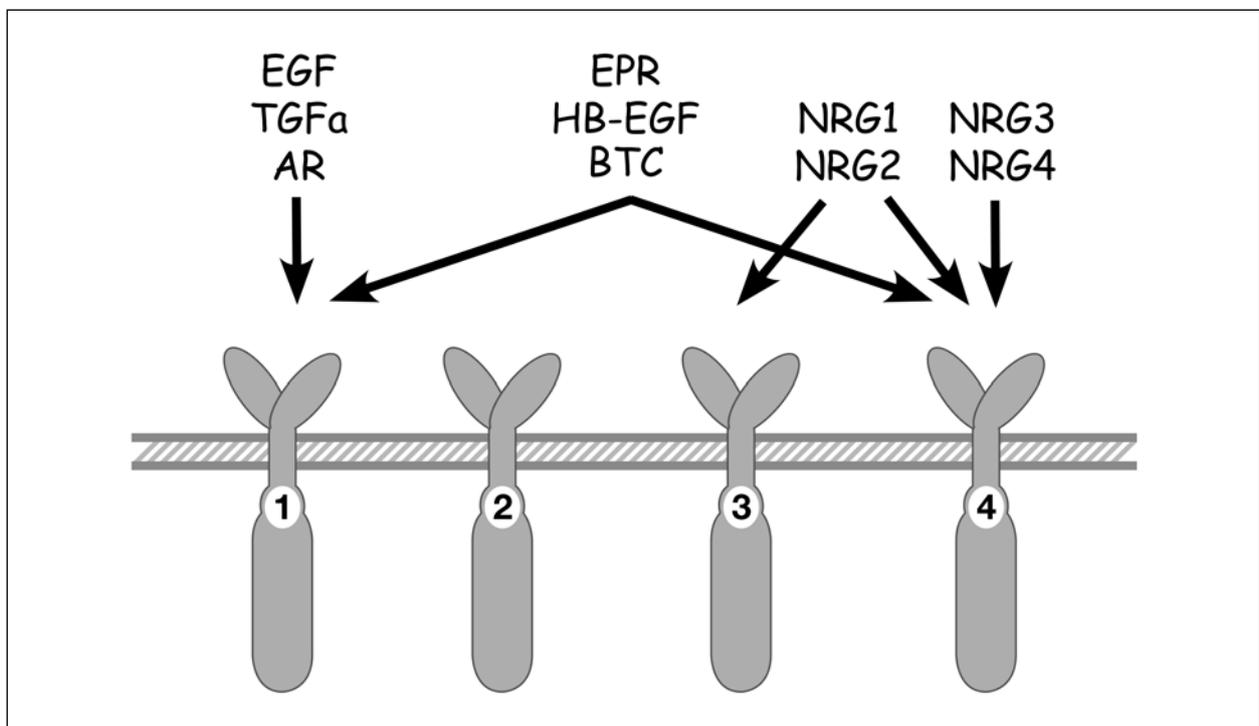


**Abb. 1.4:**  
Schematische Darstellung der EGF-Rezeptorstruktur  
(Bazley and Gullick 2005)

Ohne Ligand existieren die Rezeptormonomere in der Zellmembran in einem inaktiven Zustand. Die Bindung von Liganden löst eine Rezeptordimerisierung aus (Hayes et al. 2004, Yarden et Schlessinger 1987), wobei die Dimere eine wesentlich höhere Affinität zu Liganden aufweisen und auch stabiler sind als die Rezeptormonomere (Zhou et al. 1993). Im weiteren Signaltransduktionsweg binden nach Autophosphorylierung des Rezeptors spezifische SH-Domänen enthaltende Signalproteine (Rajkumar et al. 1994).

### 1.5.4 EGF-verwandte Peptide und Signaltransduktion

Zu den EGF-verwandten Peptiden gehören unter anderem die Wachstumsfaktoren EGF (epidermal growth factor), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), Amphiregulin (AR), Beta-zellulin (BTC), Herparin-bindender-EGF (HB-EGF), Epiregulin (EPR) und Neureguline (NRG) (Olayioye et al. 2000). Allen gemeinsam ist in ihrem Aufbau eine Sequenz von sechs Cysteinen, die mittels dreier Disulfidbrücken untereinander eine charakteristische, dreischleifige Sekundärstruktur bilden, das so genannte EGF-Motiv (Salomon et al. 1995 B). Die EGF-verwandten Peptide EGF, TGF- $\alpha$  und AR binden spezifisch an HER-1, während BTC, HP-EGF und EPR sowohl am HER-1 als auch am HER-4 binden können. Neureguline (NRG) stellen eine weitere Ligandengruppe dar, die ausschließlich HER-3 oder HER-4 aktivieren. EPR, HB-EGF und BTC stellen sowohl für HER-3 als auch für HER-4 Liganden dar (Alimandi et al. 1997). Dargestellt sind EGF-verwandte Peptide mit ihren spezifischen Bindungen an den jeweiligen EGF-Rezeptoren in Abbildung 1.5.



**Abb. 1.5:**  
Spezifische Bindungen EGF-verwandte Peptide an den EGF-Rezeptoren (nach Hynes et al. 2001)  
**Abkürzungen:** Rezeptoren 1: HER-1, 2: HER-2, 3: HER-3, 4: HER-4

In den letzten Jahren wurde die Liste der Liganden immer wieder erweitert. Es sind bis zu 30 verschiedene bekannt (Stein et Staros 2006). Für HER-2 ist bislang kein direkter EGF-verwandter Ligand bekannt, er kann jedoch durch Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit einem anderen Rezeptor der EGF-Rezeptor-Familie aktiviert werden. So fungiert HER-2 als Co-Rezeptor und bevorzugter Partner bei Heterodimerisierungen mit den anderen EGF-Rezeptoren und erhöht die Affinität des gebundenen Liganden zum dimeren Rezeptor-

komplex (Graus-Porta et al. 1997, Karunagaran et al. 1996). HER-3 besitzt keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, kann jedoch durch HER-1 phosphoryliert werden, indem im Unterschied zu anderen Signaltransduktionswegen die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) rekrutiert wird. HER-3 hat die Möglichkeit, mit HER-2 Heterodimere zu formen. Dimere, bei denen HER-2 einen Partner bildet, sind am wirksamsten (Karunagaran et al. 1996) und auch bevorzugt in nodal-positiven Mammatumoren (Hudelist et al. 2003). Das Signaltransduktionsschema wird sowohl durch die Variabilität der Bindungs- und Akzeptierungsmöglichkeiten der Liganden und Rezeptoren als auch durch die Möglichkeit der Rezeptoren, Homodimere und Heterodimere zu bilden, sehr komplex (Olayioye et al. 2000). Darüber hinaus besitzen die Rezeptoren innerhalb eines Dimers die Fähigkeit, sich gegenseitig zu phosphorylieren und unterschiedliche Folge-reaktionen auszulösen (Johnson et al. 2004, Yarden et al. 2001). Kürzlich gelang es mit Hilfe grün fluoreszierender Proteinmarkierung die Dimerbildung zu visualisieren (Hayes et al. 2004).

Die HER-1-Expression in Mammakarzinomen wird zwischen 14 – 90 % angegeben. Sie steht in negativer Beziehung zur Expression des Östrogen-Rezeptors (Tsutsui et al. 2002, Prenzel et al. 2001, Seshadri et al. 1996). Die Rate von „Non-Respondern“ bei einer endokrinen Therapie ist bei positivem HER-1-Status deutlich höher als bei negativem Status (Slamon et al. 1987), wobei jüngste Studien nahe legen, dass der HER-1/HER-2-Signalweg in der „de novo“ entstehenden Resistenzentwicklung unter Tamoxifen entscheidend ist (Gee et al. 2005). Experimente mit EGFR-Inhibitoren in vitro, in denen antiproliferative und antiangiogenetische Effekte beschrieben werden (Lanza-Jacoby et al. 2006, Tortora et al. 2003), sowie die Verlängerung des gegen Tamoxifen resistenzfreien Intervalls (Knowlden et al. 2003) lassen auf weitere Innovationen im Bereich der adjuvanten Brustkrebstherapie hoffen.

HER-2 wird in etwa 20 – 30 % der invasiven Mammakarzinome überexprimiert (Slamon et al. 1998) und ist der bevorzugte Co-Expressionspartner mit HER-3 und HER-4 in nodal-positiven Tumoren (Bianchi et al. 2006, Hudelist et al. 2003).

Eine Expression von HER-3 wird bei etwa 55 – 90 % der Patientinnen mit invasiven Mammakarzinomen gefunden und ist, verglichen mit angrenzendem normalem Gewebe, über-exprimiert (Salomon et al. 1995 A). Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression des Hetero-dimers HER-2/HER-3 unabhängig vom Tumorwachstum und der Gefäßdichte assoziiert ist mit der Induktion von Lungenmetastasen (Xue et al. 2006). Eine Überexpression von HER-4 ist in 50 – 70 % der Tumorgewebe vorhanden (Bacus et al. 1994) und wird mit einer besseren Prognose in Zusammenhang gebracht (Abd El-Rehim et al. 2004).

## **1.6 Ziel der Arbeit**

Es gibt Hinweise, dass die Signaltransduktion der Cyclooxygenase-2 mit denen der EGF-Rezeptoren interagiert. Es sollte untersucht werden, ob es bei invasiv-duktalem Mamma-

karzinomen Zusammenhänge zwischen der Expression der Cyclooxygenase-2 und bestimmten klinopathologischen Merkmalen oder der Expression der einzelnen Vertreter der EGF-Rezeptorfamilie gibt. Dabei wurden sowohl Tumoren von Patientinnen als auch aus Zelllinien generierte Tumoren verwendet. Im Speziellen werden, in Anlehnung an in der Literatur untersuchten Variablen, das Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, die TNM-Stadien, das Tumolvolumen, das Grading, die Proliferationsrate, der Östrogen- und Progesteronrezeptor sowie erstmals alle EGF-Rezeptoren HER-1 bis HER-4 untersucht. Ein positives Ergebnis würde die Hypothese bestätigen, dass zukünftig spezifische Ansätze in der Therapie des Mammakarzinoms kombiniert werden können. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von COX-2 in transgenen Mäusen Tumoren induzieren kann (Howe et al. 2005, Liu et al. 2001). Im Umkehrschluss könnte so eine weitere, selektiv ansetzende Therapie für die Behandlung des Mammakarzinoms zur Verfügung stehen, wenn dieser Pathomechanismus unterbunden werden kann. Vor kurzem konnte auch in einer Case-Control-Studie gezeigt werden, dass selektive COX-2-Inhibitoren eine signifikante Reduktion des Risikos an Brustkrebs zu erkranken, erzielen konnte (Harris et al. 2006).

## **1.7 Fragestellungen der Arbeit**

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- Wird Cyclooxygenase-2 in invasiv-duktalem Mammakarzinom exprimiert?
- Ist die Häufigkeit der Cyclooxygenase-2-Expression vergleichbar mit der in anderen Studien?
- Werden die Rezeptoren der EGF-Familie im gleichen Material exprimiert?
- Gibt es eine Beziehung zwischen der Expression der Cyclooxygenase-2 und der von HER-1, HER-2, HER-3 oder HER-4?
- Bestehen Korrelationen zwischen der Cyclooxygenase-2-Expression und den erhobenen klinopathologischen Parametern: Tumorstadium, Nodalstadium, Fernmetastasierung und Grading, Tumolvolumen und Proliferationsrate, Alter bei Erstdiagnose, Prä- oder Postmenopause bei Erstdiagnose, Parität sowie Östrogen- oder Progesteronrezeptor?
- Wird Cyclooxygenase-2 in Tumoren exprimiert, die aus Mammakarzinom-Zelllinien im Nacktmaus-Modell generiert wurden und bestehen Unterschiede zwischen Expression je nach Eigenschaften der einzelnen Zelllinien?
- Bestehen Parallelen zu den Ergebnissen der Häufigkeiten der Expression von COX-2 und den EGF-Rezeptoren in den untersuchten humanen Tumoren und den verschiedenen Zelllinien?

## 2. MATERIALIEN UND GEWEBE

### 2.1 Patientinnen

Untersucht wurde Tumorgewebe von 79 Frauen, die an einem invasiv-duktalem Mammakarzinom erkrankt waren. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose lag zwischen 37 und 85 Jahren. Eine Auflistung der Merkmale der Patientinnen und deren Tumoren ist in Tabelle 2.1 wiedergegeben. Alle Frauen wurden im Zeitraum von 1998 bis 2002 am Berliner Universitätsklinikum Benjamin Franklin (seit 2003 Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) wegen eines invasiv-duktalem Mammakarzinoms behandelt. Die Primärtherapie bestand seinerzeit bei 60 Frauen in einer Mastektomie. Bei 19 Patientinnen wurde brusterhaltend mit Axilladissektion operiert und anschließend bestrahlt.

**Tab. 2.1:** Merkmale der Patientinnen und deren Tumoren

Merkmalsname	Cut-off-Wert	Häufigkeit (%)	Merkmalsname	Cut-off-Wert	Häufigkeit (%)
<b>Alter bei Erstdiagnose</b>	jünger als 50 Jahre	10 (12,7)	<b>HER-2-Expression</b>	HER-2 positiv	37 (46,8)
	50 Jahre und älter	69 (87,3)		HER-2 negativ	42 (53,2)
<b>Parität</b>	keine Kinder	16 (20,3)	<b>Grading</b>	G I	7 (8,9)
	1–2 Kinder	48 (60,8)		G II	44 (55,7)
	mehr als 2 Kinder	15 (19,0)		G III	28 (35,4)
<b>Menopausenstatus</b>	prämenopausal	14 (17,7)	<b>Östrogenrezeptor</b>	negativ	15 (19,0)
	postmenopausal	65 (82,3)		positiv	64 (81,0)
<b>Tumorstadium</b>	T <sub>1</sub> und T <sub>2</sub>	54 (68,4)	<b>Progesteronrezeptor</b>	negativ	14 (17,7)
	T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub>	25 (31,6)		positiv	65 (82,3)
<b>Nodalstadium</b>	N <sub>0</sub>	35 (44,3)	<b>Tumorzusatz</b>	< 2 ml	16 (20,3)
	N <sub>1</sub>	37 (46,8)		2 ≤ 10 ml	31 (39,2)
	N <sub>2</sub>	2 (2,5)		> 10 ml	32 (40,5)
	N <sub>x</sub>	5 (6,3)	<b>Proliferationsrate</b>	negativ	27 (34,2)
<b>Fernmetastasen</b>	M <sub>0</sub>	68 (86,1)		positiv	52 (65,8)
	M <sub>1</sub>	10 (12,7)			
	M <sub>x</sub>	1 (1,3)			

## 2.2 Verfahren und Mittel zur Untersuchung

### 2.2.1 Geräte und Laborhilfen

Es wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Geräte verwendet.

**Tab. 2.2:** Geräte und Laborhilfen

Brutschrank	<i>Heraeus, Berlin</i>
Fotodokumentationssystem	<i>Sony, Berlin</i>
Glaspipetten	<i>Falcon, USA</i>
Glasküvetten	<i>Ilmabor TGI, Staffordshire</i>
Heizplatte	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Kryomikrotom	<i>Leica, Nussloch</i>
Kunststoffpipetten	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Messzylinder	<i>Hirschmann, Eberstadt</i>
Mikroskop Axiphot	<i>Zeiss, München</i>
Mikrotom	<i>Microm, Heidelberg</i>
Mikrowellenherd	<i>Bosch, Mannheim</i>
pH-Meter 765 Calimatic	<i>Knick, Berlin</i>
Pipettierhilfe, elektrisch	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Vortex MS 1 Minishaker	<i>IKA Labortechnik, Staufen</i>
Waage	<i>Satorius, Göttingen</i>
Wasserbad	<i>Brandelin, Berlin</i>
Zentrifuge	<i>Heraeus, Berlin</i>

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien, Einmalartikel und Chemikalien

Die Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel zeigt die Tabelle 2.3, die Chemikalien zeigt die Tabelle 2.4.

**Tab. 2.3:** Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel

Deckgläser	<i>Menzel-Gläser, Braunschweig</i>
Eppendorf-Tubes 1,5 und 2,0 ml	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Farbfilme	<i>Kodak, Stuttgart</i>
Mikrotomklingen S 35	<i>Feather, Japan</i>
Objekträger	<i>Menzel-Gläser, Braunschweig</i>
Pasteurpipetten	<i>Brand, Wertheim</i>
Pipettenspitzen	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Retuschierpinsel	<i>Hama, Hamburg</i>
Parafilm	<i>American National Can., USA</i>
Zellstoff	<i>Toko, Mannheim</i>

**Tab. 2.4:** Chemikalien

Aceton	<i>J.T. Baker, Deventer, Niederlande</i>
Biotin Blocking System	<i>DAKO, Hamburg</i>
Fetales Kälberserum	<i>Biochrom, Berlin</i>
Hämalaunlösung	<i>Merck, Darmstadt</i>
Kaisers Glyceringelantine	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumchlorid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumzitat	<i>Merck, Darmstadt</i>
pH -Meter Eichlösungen	<i>Merck, Darmstadt</i>
Trisma Base	<i>Sigma, Steinheim</i>
Trisma Hydrochlorid	<i>Sigma, Steinheim</i>
Xylol	<i>J.T. Baker, Deventer, Niederlande</i>
Zitronensäure	<i>Merck, Darmstadt</i>

### 2.2.3 Reagenzien und Puffer

Die bei der immunhistochemischen Färbung verwendeten Reagenzien und Puffer sind in den Tabellen 2.5 und 2.6 dargestellt.

**Tab. 2.5:** Reagenzien

<b>Blockierungspeptide</b>	
COX-2 monoklonales Blockierungs-Peptid	<i>Cayman, Ann Arbor, USA</i>
Fuchsin Chromogen System	<i>DAKO, Hamburg</i>
HER-3 polyklonales Blockierungs-Peptid	<i>Santa Cruz Biotchnology, Inc., Santa Cruz, CA</i>
HER-4 polyklonales Blockierungs-Peptid	<i>Santa Cruz Biotchnology, Inc., Santa Cruz, CA</i>
<b>Sekundärantikörper</b>	
Kaninchen-Anti-Maus IgG, biotinyliert	<i>Jackson Immuno-Research, Hamburg</i>
Maus-Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	<i>Jackson Immuno-Research, Hamburg</i>
<b>Tertiärantikörper</b>	
Streptavidin-Alk. Phosphatase konjugiert	<i>Boehringer, Mannheim</i>
<b>Antikörper-Verdünnung</b>	
mit Hintergrund reduzierender Komponente <i>DAKO, Hamburg</i>	

**Tab. 2.6:** Puffer

<b>Zitratpuffer</b>
18 ml 0,1M Zitronensäure + 82 ml 0,1M Natriumzitat ad 1000 ml Aqua tridest, pH 6,0
<b>1x-Trispuffer</b>
171,25 g (= 0,217 M) Tris-Base + 20,00 g (= 33 mM) Tris-Hydrochlorid + 219,50 g (= 0,75 M) Natriumchlorid ad 5000 ml Aqua tridest, pH 7,4 – 7,6

## 2.2.4 Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper zeigt mit Angabe der Verdünnung die Tabelle 2.7.

**Tab. 2.7:** Primärantikörper

Primärantikörper		Hersteller	Verdünnung
COX-2-Antikörper	monoklonal	Cayman, Ann Arbor, USA	1:500
HER-1-Antikörper	monoklonal	Novocastra, Newcastle, UK	1:200
HER-2-Antikörper	polyklonal	Santa Cruz Biotchnology, Inc., Santa Cruz, CA	1:1000
HER-3-Antikörper (C17)	polyklonal	Santa Cruz Biotchnology, Inc., Santa Cruz, CA	1:26
HER-4-Antikörper (C18)	polyklonal	Santa Cruz Biotchnology, Inc., Santa Cruz, CA	1:40

## 2.3 Herkunft der Tumorgewebe

### 2.3.1 Präparate von Patientinnen

Die in Paraffin eingebetteten Präparate des invasiv-duktales Mammakarzinoms stammen aus dem Institut für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (Direktor Prof. Dr. Harald Stein).

### 2.3.2 Zelllinien

Die Tierversuche mit den Mammakarzinom-Zelllinien wurden im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, in der Arbeitsgruppe experimentelle Pharmakologie von Frau Dr. sc. rer. nat. Induna Fichtner und Herrn Dr. rer. nat. Christian Nowak durchgeführt. Eine Auflistung der Mammakarzinom-Zelllinien mit Angabe der Passage und ihren spezifischen Eigenschaften ist in Tabelle 2.8 dargestellt.

**Tab. 2.8:** Mammakarzinom-Zelllinien

Zelllinie	Passage	Histologie
3366	38 C2	postmenopausal, invasiv-duktales, ER/PR positiv
3366C Tam	13	Tamoxifen-resistente Sublinie von 3366
4000	26A	postmenopausal, invasiv-duktales, ER negativ
4151	29A	postmenopausal, invasiv-duktales
4296	23	prämenopausal, Plattenepithelkarzinom, ER negativ
4586	15A	prämenopausal, Rezidiv invasiv-lobulär
4898	9C1	Rezidiv, invasiv-duktales
MT-3	14	gut differenziertes tubuläres Adenokarzinom, ER/PR negativ
MDA-MB-435	2	Östrogenrezeptor negativ, HER-2 positiv
MDA-MB-231	4	Östrogenrezeptor negativ, HER-2 positiv
MCF-7	17	Östrogenrezeptor positiv
MaTu	10	Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor negativ

Die Xenografts 3366, 4000, 4151, 4296, 4586, 4898 und MT-3 wurden direkt aus Patientennmaterial gewonnen, MDA-MB-435, MDA-MB-231, MCF-7 und MaTu stammen von in-vitro-Zelllinien.

## 2.4 Tierversuche

### 2.4.1 Tiere

Es wurden weibliche NMRI: nu/nu Nacktmäuse (M & B, Ry, Dänemark) beziehungsweise NOD/SCID Mäuse (Jackson Laboratories, Ben Harbour, USA) verwendet. Diese ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken gezüchteten Rassen werden oft zu Transfektionsstudien verschiedener Tumoren verwandt.

### 2.4.2 Tierhaltung

Die Mäuse werden in der Arbeitsgruppe für experimentelle Pharmakologie des Max-Delbrück-Centrums für molekulare Medizin (MDC) unter keimfreien Bedingungen in Filterkäfigen auf autoklaviertem Streu bei standardisierten Bedingungen gehalten (22°C Raumtemperatur, 50 ± 10 % relative Luftfeuchtigkeit, 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus). Sie erhalten autoklaviertes Futter (Sniff, Soest, Deutschland) und angesäuertes Wasser mit einem pH = 4,0 ad libidum.

### 2.4.3 Transplantate von Mammakarzinomen auf Nacktmäuse

Von Mammakarzinomen, die aus Routinepassagen in Nacktmäusen stammen, wurden in Narkose mit Radenarkon 40 mg/kg i.p. (Asta Medica, Frankfurt) Fragmente von 3 – 4 mm Größe subkutan in die linke Flanke der Nacktmäuse transplantiert. Aus früheren Experimenten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. sc. rer. nat. I. Fichtner ist bekannt, dass ER positive Mamma-Xenografts auf Östradiol-Zusätze mit verstärktem Wachstum reagieren (Naundorf et al. 1996). Um die physiologischen Bedingungen in humanem Gewebe zu imitieren, wurden die Mäuse, die ein Mamma-Xenograft erhalten hatten, einmal wöchentlich während der gesamten Dauer des Experimentes mit Östradiol 0,5 mg/kg i.m. behandelt. Eine exemplarische Abbildung einer Nacktmaus mit xenotransplantiertem Tumor der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7, Passage 17, ist in Abbildung 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1:**  
*Nacktmaus mit xenotransplantiertem Tumor der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7, Passage 17*

Quelle:  
*Dr. sc. rer. nat. Induna Fichtner,  
MDC, Berlin*

### **3. METHODEN**

#### **3.1 Anfertigung von Gewebeschnitten**

##### **3.1.1 Kryoschnitte**

Um Gewebeblöcke, die nicht in Paraffin eingebettet sind, ohne Gewebedefekt schneiden zu können, hat sich die Kryomikrotomie bewährt. Dafür wurde das Kryomikrotom ca. 20 Minuten vor Arbeitsbeginn auf eine Objektträgertemperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  und auf eine Boxtemperatur von  $-27^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Parallel dazu war es notwendig, das Messer und die Aufbewahrungsbox für die auf Objektträger aufgetragenen Schnitte vorzukühlen. Von den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten resezierten Gewebeblöcken wurden Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von  $5 - 7 \mu\text{m}$  angefertigt. Mit Schnitten versehene Objektträger wurden für 3 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer Aufbewahrungsbox bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum Färben gelagert.

##### **3.1.2 Paraffinschnitte**

Die Kühlplatte wurde 15 Minuten vor Arbeitsbeginn auf eine Objekttemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt und parallel dazu das Wasserbecken auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt.

Die gekühlten Paraffinblöcke wurden in das Mikrotom eingespannt, waagrecht ausgerichtet und mit einer Dicke von  $3 \mu\text{m}$  geschnitten. Die Schnitte wurden mittels Retuschierpinseln solange in ein warmes Wasserbad gelegt, bis sich die durch das Schneiden aufgerollten Schnitte wieder geglättet hatten und anschließend auf „superfrost-beschichtete“ Objektträger aufgebracht. Sodann wurden sie über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet und bis zum Färben bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.2 Entparaffinieren**

Vor der eigentlichen Färbeprozedur wurden die Schnitte bei  $+60^{\circ}\text{C}$  über Nacht getrocknet. Um die Präparate möglichst schonend aus ihrem Paraffinbett freizulegen, wurden sie erst zweimal für 5 Minuten in Xylol getaucht und gut abgetropft. Anschließend kamen die Schnitte für jeweils zehn Minuten zur Rehydrierung in ein reines Acetonbad, gefolgt von einem Lösungsbad aus Aceton/1x-Trispuffer im Verhältnis 1:1 und wurden abschließend in 1x-Trispuffer gelagert.

#### **3.3 Denaturierungsverfahren unter Hitzeeinwirkung**

Im Denaturierungsverfahren werden die Vernetzungen der Proteine gelöst und die Bindungsstellen der Epitope freigelegt. Um dabei möglichst wenig Gewebe abzulösen, wurden die Objektträger in mit  $0,1\text{M}$  Zitratpuffer gefüllte Küvetten für 10 Minuten (Kryoschnitte 5 Minuten) in ein Bad mit kochendem Wasser gestellt, anschließend für 20 Minuten im Puffer abgekühlt und ruhten für weitere 10 Minuten bedeckt mit 1x-Trispuffer. Somit war eine ausreichende Denaturierung bei verbessertem Gewebeerhalt zu erzielen.

### **3.4 Absättigung unspezifischer Bindungen**

Eine unspezifische Anfärbung anderer Epitope kann durch die Absättigung mit Substanzen wie Biotin- und Avidin-Blockingspeptid (DAKO, Hamburg) oder fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) blockiert werden. Die Blockierung mit Biotin und Avidin, je 3 Tropfen pro Schnitt, wurde für jeweils 10 Minuten, der folgende Block mit fetalem Kälberserum weitere 30 Minuten inkubiert und anschließend bei einer Temperatur von 56°C über 30 Minuten inaktiviert. Zwischen jedem der Schritte wurden die Schnitte intensiv mit 1x-Trispuffer gespült und die Objektträger um die Präparate herum mit Zellstoff getrocknet, um die nächste aufzutragende Lösung nicht verlaufen zu lassen.

### **3.5 Immunhistochemische Färbung**

#### **3.5.1 COX-2-Färbung**

Im Anschluss konnte ein monoklonaler COX-2-Antikörper (Cayman, Ann Arbor, USA) als Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 aufgetragen werden. Er verblieb für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Präparaten. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper mit Angabe der Verdünnungen und der Inkubationsdauer ist in Tabelle 3.1 zu finden. Auch nach diesem und vor jedem weiteren Arbeitsschritt wurden die Schnitte intensiv mit 1x-Trispuffer gespült und die Objektträger um die Präparate herum mit Zellstoff getrocknet.

Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper (Jackson Immuno Research, Hamburg), ein so genannter Brückenantikörper, auf das Gewebe aufgebracht. Hierbei handelt es sich um einen biotinylierten gegen Maus-Immunglobulin gerichteten Antikörper aus dem Kaninchen in einer Verdünnung 1:400. Er ist gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet und betrachtet den Primärantikörper seinerseits als Antigen. Diesem wurde das Gewebe für 40 Minuten ausgesetzt.

Der Brückenantikörper verbindet den primären Antikörper mit den tertiären Antikörper-Enzym-Komplexen, hier einer Streptavidin konjugierten alkalischen Phosphatase (Boehringer, Mannheim). Der Tertiärantikörper muss derselben Spezies entstammen wie der primäre Antikörper, gegen den sich der Brückenantikörper richtet. Außerdem ist es erforderlich, dass der Brückenantikörper im Überschuss vorhanden ist, damit sich möglichst oft nur eine seiner zwei Bindungsstellen am primären Antikörper bindet und die andere Bindung für den tertiären Antikörper-Enzym-Komplex frei bleibt. Im letzten Schritt wurde der Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex in einer Verdünnung von 1:1000 mit einer Inkubationszeit von weiteren 30 Minuten aufgebracht. Er bindet sich an die frei gebliebene Bindungsstelle des Brückenantikörpers.

Die Anfärbung der alkalischen Phosphatase erfolgte mit Fuchsin (DAKO, Hamburg), wobei die Färbeintensität der Positivkontrolle die Dauer von maximal 15 Minuten bestimmt. Nach

Stoppen der Färbereaktion mit destilliertem Wasser wurde für 25 Sekunden mit Hämlaun (Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Im Anschluss wurden die Präparate erneut unter kontinuierlichem Wasserfluss für 10 Minuten gespült. Abschließend wurden die Präparate mit vorgewärmter Glyceringelantine eingedeckelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### 3.5.2 EGF-Färbungen

Bei den Färbungen der Rezeptoren der EGF-Familie (HER-1 bis HER-4) verfuhr man in gleicher Weise wie bei der COX-2-Färbung. Unterschiede gab es nur bei der Verdünnung und Inkubationsdauer des Primär- sowie der Anwendung des Sekundärantikörpers. In Tabelle 3.1 sind die nach Rezeptor sortierten verwendeten Primär- und Sekundärantikörper in ihrer jeweiligen Verdünnung und Inkubationsdauer dargestellt.

**Tab. 3.1:** *Verwendete Primär- und Sekundärantikörper*

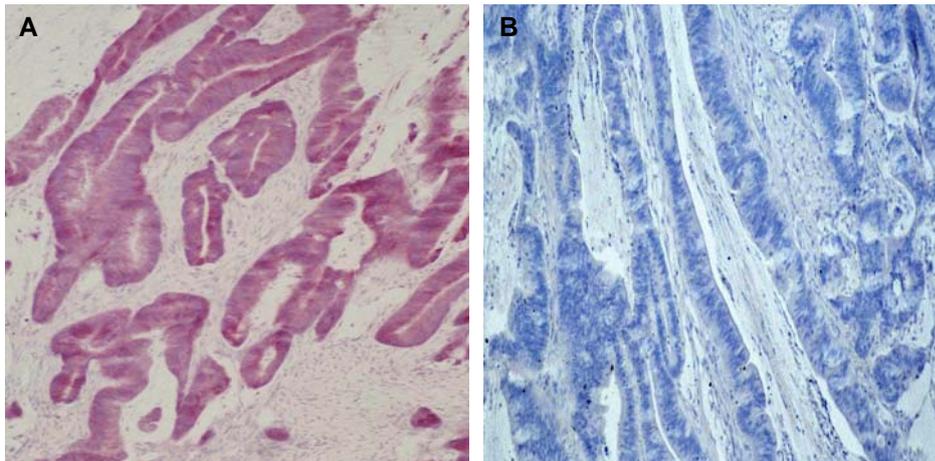
Färbung		Verdünnung	Inkubationsdauer
<b>COX-2</b>	Primärantikörper	1:500	2h, RT
	Sekundärantikörper RaM <sup>1</sup>	1:400	40 min, RT
<b>HER-1</b>	Primärantikörper	1:200	1h, RT
	Sekundärantikörper MaR <sup>2</sup>	1:200	30 min, RT
<b>HER-2</b>	Primärantikörper	1:1000	30 min, RT
	Sekundärantikörper MaR	1:1000	30 min, RT
<b>HER-3</b>	Primärantikörper	1:26	1h, RT
	Sekundärantikörper MaR	1:400	30 min, RT
<b>HER-4</b>	Primärantikörper	1:40	1h, RT
	Sekundärantikörper MaR	1:400	30 min, RT
1 RaM = Kaninchen-Anti-Maus Immunglobulin 2 MaR = Maus-Anti-Kaninchen Immunglobulin			

### 3.6 Positiv- und Negativkontrollen

Zur Überprüfung von Sensitivität und Spezifität der immunhistochemischen Färbung wurden sicher antigen-positive Kontrollpräparate sowie eine Negativkontrolle, bei der der Primärantikörper durch 1x-Trispuffer ersetzt wurde, bei jeder Färbung mitgeführt. Eine exemplarische Abbildung einer Färbung der Cyclooxygenase-2 an humanem Kolon ist unter Abbildung 3.1 wiedergegeben. Als antigen-positive Präparate dienten Schnitte von humanem Kolon bei der COX-2-Färbung und humaner Plazenta bei der EGF-Rezeptorfamilie.

**Abb. 3.1:**

Positiv- und Negativkontrolle der Färbung von COX-2 an humanem Kolon



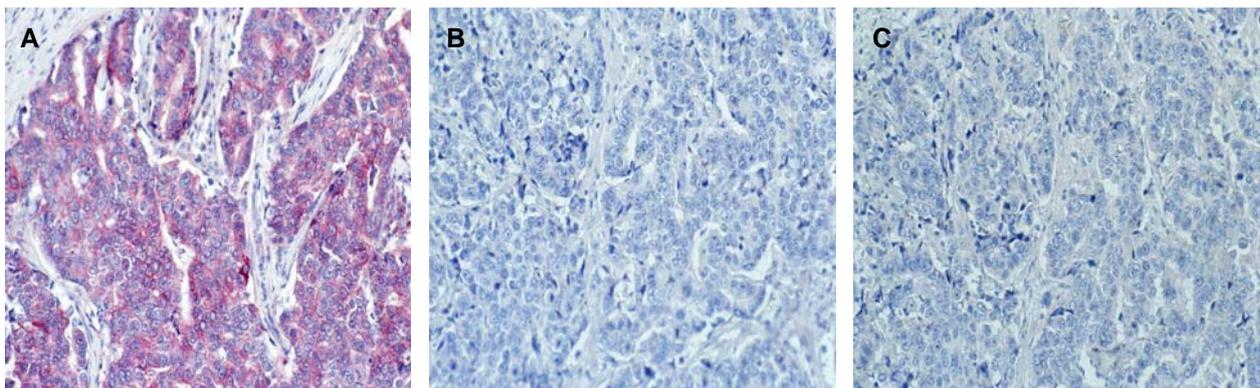
**A** Positivkontrolle Vergrößerung 100x    **B** Negativkontrolle Vergrößerung 100x

### 3.7 Spezifität der Färbungen

Um eine Aussage über die Spezifität der Färbung machen zu können, wurde bei der Versuchsanordnung dem Primärantikörper das spezifische Blockierungssystem des untersuchten Targets zugegeben. Somit konnten der Primärantikörper und die ihm folgenden Antikörper nicht an dem Rezeptor binden und eine Färbung blieb aus, wie es beispielhaft in Abbildung 3.2, einer Darstellung von HER-3 an invasiv-duktalem Mammakarzinom, zu sehen ist.

**Abb. 3.2:**

Blockierungsversuch am Beispiel HER-3 (invasiv-duktales Mammakarzinom). Vergrößerung jeweils 100x  
**A** starke HER-3-Expression, **B** ohne Primärantikörper, **C** geblockter Primärantikörper



### 3.8 Interne Validierung

Lagen von einer Patientin sowohl Stenzen als auch Abladat vor (n = 10), so wurden beide Proben untersucht. Die Expressionsmuster der einzelnen Rezeptoren erwiesen sich in allen Fällen als identisch (Daten nicht gezeigt).

### 3.9 Auswertungen

Die klinischen Daten der Präparate konnten aus dem Archiv der Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin und dem Archiv des Instituts für Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, reevaluiert werden.

Die Gewebeschnitte wurden von mindestens drei unabhängigen Untersuchern beurteilt, die zum Zeitpunkt der Auswertung weder Kenntnis über die jeweiligen Patientendaten, Krankheitsverläufe noch über die Ergebnisse der durch die Kollegen erhobenen Immunoscores hatten. Präparate, die unterschiedlich bewertet wurden, beurteilte noch einmal ein Pathologe. Der Nachweis von COX-2 und den EGF-Rezeptoren durch WesternBlot-Analyse, wie er von anderen Arbeitsgruppen exemplarisch durchgeführt wurde (Ristimäki et al. 2002, Costa et al. 2002, Half et al. 2002), ist in dieser Arbeit nicht verwendet worden.

#### 3.9.1 Untersuchte klinopathologische Merkmale

Neben den tumorspezifischen Angaben wie TNM-System, Grading, Steroidhormonrezeptor- und HER-2-Status, Proliferationsrate und Tumolvolumen, wurden auch die Merkmale Alter bei Erstdiagnose, Menopausenstatus und Parität berücksichtigt. Die Auswahl der Cut-off-Werte, wie sie in Tabelle 3.2 aufgelistet ist, orientierte sich an dem Verfahren der Arbeitsgruppe um Ristimäki (Ristimäki et al. 2002). Sie unterscheidet sich nicht wesentlich vom Verfahren bei Ferrero-Poüs (Ferrero-Poüs et al. 2000). Aufgrund der geringen Fallzahl wurden die Tumorstadien T<sub>1</sub> (n = 24) und T<sub>2</sub> (n = 30), sowie die T<sub>3</sub> (n = 8) und T<sub>4</sub> (n = 17), wie bei Tsutsui beschrieben, zusammengefasst (Tsutsui et al. 2002).

**Tab. 3.2:** Cut-off-Werte der klinopathologischen Merkmale

Variable	Cut-off-Wert
Alter bei Erstdiagnose	< 50, ≥ 50
Parität	0, 1-2, > 2 Kinder
Menopause	prämenopausal, postmenopausal
Tumorstadium	T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> , T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>
Fernmetastasen	M <sub>0</sub> , M <sub>1</sub> , M <sub>x</sub>
Lymphknotenmetastasen	N <sub>0</sub> , N <sub>1</sub> , N <sub>x</sub>
Histologisches Grading	G I, G II, G III
Tumolvolumen	< 2 ml, 2–10 ml, > 10 ml
Östrogenrezeptor (ER)	negativ, positiv
Progesteronrezeptor (PR)	negativ, positiv
Proliferationsrate (Ki-67)	< 20 %, ≥ 20 %
HER-2	positiv (+3), negativ (0)

### 3.9.2 Scoring

In Anlehnung an den Bewertungsmaßstab für die COX-2-Färbungen von Ristimäki (Ristimäki et al. 2002), aufgeführt in Tabelle 3.3, und für die Färbungen der EGF-Rezeptorfamilie von Xia (Xia et al. 1999), beschrieben in Tabelle 3.4, wurde das Tumorgewebe in seiner Intensität der positiven Anfärbung durch einen immunreaktiven Score (IRS) kodiert.

**Tab. 3.3:** COX-2-Färbung, Immunreaktiver Score (nach Ristimäki et al. 2002)

Färbeintensität des Zytoplasmas		
<b>0</b>	keine Färbung	
<b>1</b>	schwach	kann stärkere Intensität in < 10 % der Tumorzellen enthalten
<b>2</b>	moderat	10–90 % der Tumorzellen angefärbt
<b>3</b>	stark	> 90 % der Tumorzellen stark angefärbt

**Tab. 3.4:** Färbungen der EGF-Rezeptorfamilie, Immunreaktiver Score (nach Xia et al. 1999)

Färbeintensität des Zytoplasmas	Prozentualer Anteil der angefärbten Zellen
<b>0</b> keine Färbung	
<b>1</b> schwach	<b>1</b> < 20 %
<b>2</b> moderat	<b>2</b> 20–49 %
<b>3</b> stark	<b>3</b> ≥ 50 %

Aufgrund der geringen Fallzahl wurden anschließend die Bewertungen in negative Expression (Score 0 und 1) versus positive Expression (Score 2 und 3), wie in den Veröffentlichungen von Ristimäki (Ristimäki et al. 2002), Xia (Xia et al. 1999), Srinivasan (Srinivasan et al. 2000) oder auch Suo (Suo et al. 2002) beschrieben, zusammengefasst.

### 3.9.3 Statistik

Die univarianten Analysen der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern untereinander wurden durch Pearsons  $\chi^2$ -Test bzw. mit dem Exakt-Test nach Fisher untersucht. Das Signifikanzniveau (Fehler 1. Art) wurde mit  $p \leq 0,05$  festgesetzt. Die statistische Auswertung wurde durch die Doktorandin, angeleitet durch Herrn Dr. med. Günther Himmelmann, Hamburg, selbständiger Statistiker und Mediziner im Ruhestand, vorgenommen und durch Herrn D. Augustin, Mitarbeiter im Institut für Biometrie und Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, gegengelesen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Allgemeine Tumorcharakterisierung

Bei den Patientinnen wurden 54 (68 %) <sup>1</sup> der Tumoren als Tumorstadien T<sub>1</sub> oder T<sub>2</sub> klassifiziert, 25 (32 %) als T<sub>3</sub> oder T<sub>4</sub>. Der Differenzierungsgrad war bei 44 (56 %) der Tumoren als mäßig (GII) und bei 28 (35 %) Tumoren als gering differenziert (GIII) einzuordnen. Nur 7 (9 %) Tumoren waren gut differenziert. Das Tumolvolumen betrug bei 16 (20 %) Tumoren weniger als 2 ml, bei 31 (39 %) zwischen 2 und 10 ml, bei 32 (41 %) sogar über 10 ml. Bei der Bestimmung des Nodalstadiums wiesen 35 (44 %) keine Lymphknotenmetastasen auf, 39 (49 %) befanden sich im Nodalstadium N<sub>1</sub> oder N<sub>2</sub>. Bei 5 Patientinnen konnte keine Angabe zum Lymphknotenstatus gemacht werden, da keine Axilladisektion durchgeführt wurde. Bei 68 (86 %) der Patientinnen waren keine Fernmetastasen nachweisbar, 10 (12 %) wurden mit M<sub>1</sub> und 1 (1,3 %) mit M<sub>x</sub> klassifiziert. Bei 64 Patientinnen (81 %) war von den Steroidhormonrezeptoren der Östrogen- und bei 65 Patientinnen (82 %) der Progesteronrezeptor positiv. Ki 67 als Marker für die Proliferationsrate konnte bei 52 (66 %) Patientinnen nachgewiesen werden. Eine detaillierte Auflistung zur allgemeinen Tumorcharakterisierung im untersuchten Kollektiv ist in Tabelle 4.1 zu finden.

**Tab. 4.1:** Allgemeine Tumorcharakterisierung

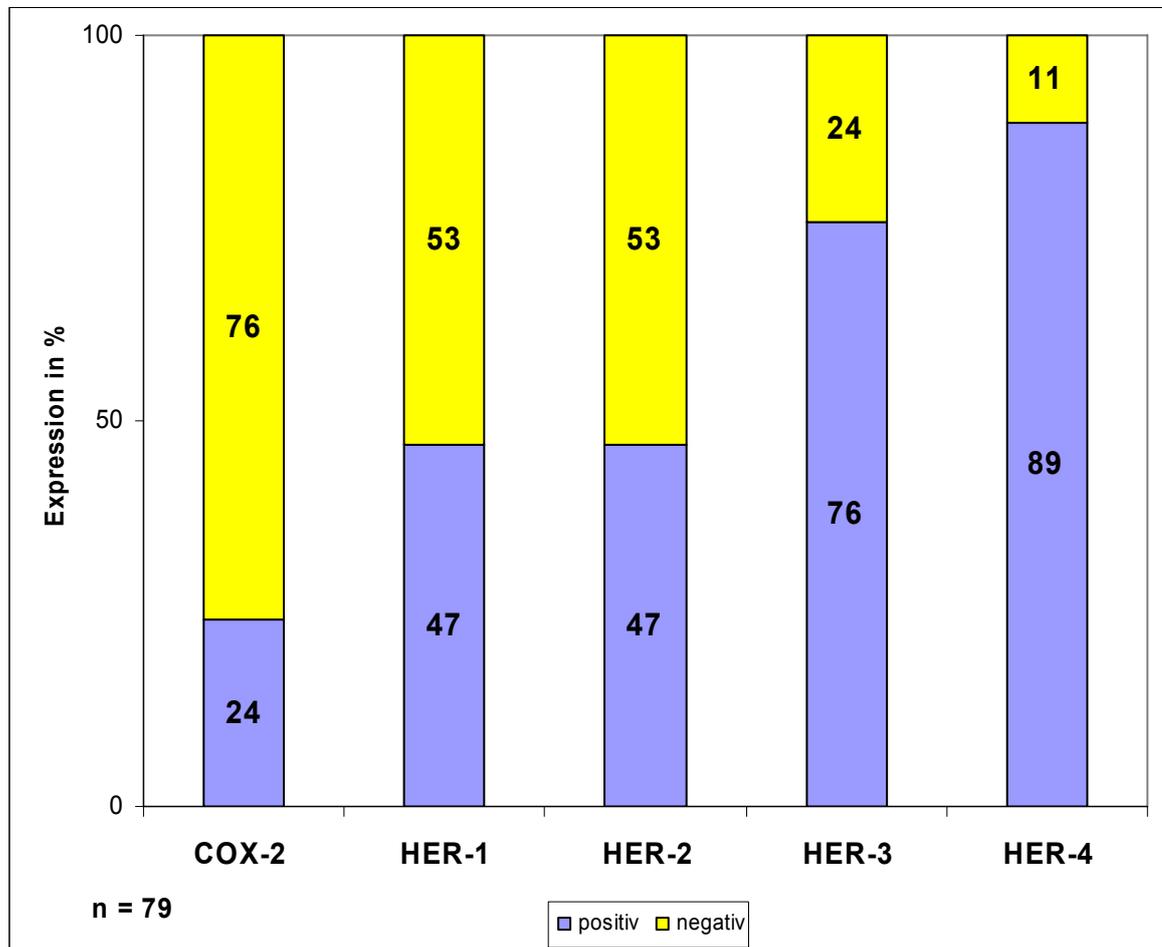
Merkmal		Häufigkeit (%)	Merkmal		Häufigkeit (%)
<b>Tumorstadium</b>	T <sub>1</sub> und T <sub>2</sub>	54 (68,4)	<b>Fernmetastasen</b>	M <sub>0</sub>	68 (86,1)
	T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub>	25 (31,6)		M <sub>1</sub>	10 (12,7)
<b>Grading</b>	G I	7 (8,9)		M <sub>x</sub>	1 (1,3)
	G II	44 (55,7)	<b>Östrogenrezeptor</b>	negativ	15 (19,0)
	G III	28 (35,4)		positiv	64 (81,0)
<b>Tumolvolumen</b>	< 2 pmm	16 (20,3)	<b>Progesteronrezeptor</b>	negativ	14 (17,7)
	2 ≤ 10 pmm	31 (39,2)		positiv	65 (82,3)
	> 10 pmm	32 (40,5)	<b>Proliferationsrate</b>	negativ	27 (34,2)
<b>Nodalstadium</b>	N <sub>0</sub>	35 (44,3)		positiv	52 (65,8)
	N <sub>1</sub>	37 (46,8)			
	N <sub>2</sub>	2 (2,5)			
	N <sub>x</sub>	5 (6,3)			

<sup>1</sup> %-Angaben in Klammern geben den relativen Anteil gerundet an.

## 4.2 Expression der untersuchten Targets

**Abb. 4.1:**

Häufigkeiten der Expression der Cyclooxygenase-2 sowie den Rezeptoren der EGF-Familie



Die Cyclooxygenase-2 zeigte, wie in Abbildung 4.1 aufgeführt, in 19 der untersuchten Tumoren eine moderate bis starke Expression, was einem Anteil von 24 % im untersuchten Kollektiv entspricht. Sowohl HER-1 als auch HER-2 waren in 37 Fällen positiv (47 %), HER-3 in 60 (76 %) und HER-4 sogar in 70 (89 %).

Eine vollständige Auflistung der Ergebnisse in tabellarischer Form, nach Cyclooxygenase-2 beziehungsweise untersuchten Rezeptoren unterteilt, ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Im Folgenden wird auf diese Ergebnisse Bezug genommen.

Eine exemplarische immunhistochemische Darstellung der Cyclooxygenase-2-Expression in ihren unterschiedlichen Ausprägungen ist an Beispielen der untersuchten invasiv-duktaalen Mammakarzinome in Abbildung 4.2 wiedergegeben.

Tab. 4.2: Expression der Targets [Anzahl ( %)]

Merkmale	gesamt	COX-2		HER-1		HER-2		HER-3		HER-4	
		stark/moderat	schwach/neg								
<b>Alle Fälle</b>	79 (100)	19 (24,1)	60 (75,9)	37 (46,8)	42 (53,2)	37 (46,8)	42 (53,2)	60 (75,9)	19 (24,1)	70 (88,6)	9 (11,4)
<b>Alter bei ED</b>											
jünger 50 Jahre	10 (12,7)	4 (5,1)	6 (7,6)	6 (7,6)	4 (5,1)	4 (5,1)	6 (7,6)	10 (12,7)	0 (0)	10 (12,7)	0 (0)
50 Jahre und älter	69 (87,3)	15 (19,0)	54 (68,3)	31 (39,2)	38 (48,1)	33 (41,8)	36 (45,6)	50 (63,3)	19 (24,1)	60 (75,9)	9 (11,4)
<b>Parität</b>											
keine Kinder	16 (20,3)	6 (7,6)	10 (12,7)	6 (7,6)	10 (12,7)	9 (11,4)	7 (8,9)	13 (16,4)	3 (3,8)	13 (16,4)	3 (3,8)
1-2 Kinder	48 (60,8)	10 (12,7)	38 (48,1)	21 (26,6)	27 (34,2)	20 (25,3)	28 (35,4)	38 (48,1)	10 (12,7)	44 (55,7)	4 (5,1)
> 2 Kinder	15 (19,0)	3 (3,8)	12 (15,2)	10 (12,7)	5 (6,3)	8 (10,1)	7 (8,9)	9 (11,4)	6 (7,6)	13 (16,4)	2 (2,5)
<b>Menopausenstatus</b>											
prämenopausal	14 (17,7)	3 (3,8)	11 (13,9)	8 (10,1)	6 (7,6)	7 (8,9)	7 (8,9)	13 (16,4)	1 (1,3)	13 (16,4)	1 (1,3)
postmenopausal	65 (82,3)	16 (20,3)	49 (62,0)	29 (36,7)	36 (45,6)	30 (38,0)	35 (44,3)	47 (59,5)	18 (22,8)	57 (72,2)	8 (10,1)
<b>Tumorstadium</b>											
T1 und T2	54 (68,4)	12 (15,2)	42 (53,2)	24 (30,4)	30 (38,0)	22 (27,8)	32 (40,5)	47 (59,5)	7 (8,9)	49 (62,0)	5 (6,3)
T3 und T4	25 (31,6)	7 (8,9)	18 (22,8)	13 (16,4)	12 (15,2)	15 (19,0)	10 (12,7)	13 (16,4)	12 (15,2)	21 (26,6)	4 (5,1)
<b>Nodalstadium</b>											
N0	35 (44,3)	7 (8,9)	28 (35,4)	18 (22,8)	17 (21,5)	13 (16,4)	22 (27,8)	30 (38,0)	5 (6,3)	32 (40,5)	3 (3,8)
N1	37 (46,8)	10 (12,7)	27 (34,2)	15 (19,0)	22 (27,8)	19 (24,1)	18 (22,8)	25 (31,6)	12 (15,2)	32 (40,5)	5 (6,3)
N2	2 (2,5)	1 (1,3)	1 (1,3)	1 (1,3)	1 (1,3)	1 (1,3)	1 (1,3)	2 (2,5)	0 (0)	2 (2,5)	0 (0)
Nx	5 (6,3)	1 (1,3)	4 (5,1)	3 (3,8)	2 (2,5)	4 (5,1)	1 (1,3)	3 (3,8)	2 (2,5)	4 (5,1)	1 (1,3)
<b>Fernmetastasen</b>											
M0	68 (86,1)	15 (19,0)	53 (67,1)	31 (39,2)	37 (46,8)	30 (38,0)	38 (48,1)	56 (70,9)	12 (15,2)	61 (77,2)	7 (8,9)
M1	10 (12,7)	4 (5,1)	6 (7,6)	6 (7,6)	4 (5,1)	6 (7,6)	4 (5,1)	4 (5,1)	6 (7,6)	8 (10,1)	2 (2,5)
Mx	1 (1,3)	0 (0)	1 (1,3)	0 (0)	1 (1,3)	1 (1,3)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)	1 (1,3)	0 (0)
<b>Grading</b>											
G I	7 (8,9)	1 (1,3)	6 (7,6)	5 (6,3)	2 (2,5)	0 (0)	7 (8,9)	6 (7,6)	1 (1,3)	7 (8,9)	0 (0)
G II	44 (55,7)	11 (13,9)	33 (41,8)	21 (26,6)	23 (29,1)	21 (26,6)	23 (29,1)	30 (38,0)	14 (17,7)	39 (49,4)	5 (6,3)
G III	28 (35,4)	7 (8,9)	21 (26,6)	11 (13,9)	17 (21,5)	16 (20,3)	12 (15,2)	24 (30,4)	4 (5,1)	24 (30,4)	4 (5,1)
<b>Tumorstadium</b>											
< 2 ml	16 (20,3)	2 (2,5)	14 (17,7)	4 (5,1)	12 (15,2)	5 (6,3)	11 (13,9)	14 (17,7)	2 (2,5)	15 (19,0)	1 (1,3)
2 ≤ 10 ml	31 (39,2)	6 (7,6)	25 (31,6)	14 (17,7)	17 (21,5)	14 (17,7)	17 (21,5)	26 (32,9)	5 (6,3)	27 (34,2)	4 (5,1)
> 10 ml	32 (40,5)	11 (13,9)	21 (26,6)	19 (24,1)	13 (16,4)	18 (22,8)	14 (17,7)	20 (25,3)	12 (15,2)	28 (35,4)	4 (5,1)
<b>Östrogenrezeptor</b>											
negativ	15 (19,0)	3 (3,8)	12 (15,2)	10 (12,7)	5 (6,3)	7 (8,9)	8 (10,1)	10 (12,7)	5 (6,3)	14 (17,7)	1 (1,3)
positiv	64 (81,0)	16 (20,3)	48 (60,8)	27 (34,2)	37 (46,8)	30 (38,0)	34 (43,0)	51 (64,6)	14 (17,7)	56 (70,9)	8 (10,1)
<b>Progesteronrezeptor</b>											
negativ	14 (17,7)	1 (1,3)	13 (16,4)	8 (10,1)	6 (7,6)	8 (10,1)	6 (7,6)	10 (12,7)	4 (5,1)	12 (15,2)	2 (2,5)
positiv	65 (82,3)	18 (22,8)	47 (59,5)	29 (36,7)	36 (45,6)	29 (36,7)	36 (45,6)	50 (63,3)	15 (19,0)	58 (73,4)	7 (8,9)
<b>Proliferationsrate</b>											
negativ	27 (34,2)	8 (10,1)	19 (24,1)	13 (16,4)	14 (17,7)	6 (7,6)	21 (26,6)	21 (26,6)	6 (7,6)	25 (31,6)	2 (2,5)
positiv	52 (65,8)	11 (13,9)	41 (51,9)	24 (30,4)	28 (35,4)	31 (39,2)	21 (26,6)	39 (49,4)	13 (16,4)	45 (57,0)	7 (8,9)

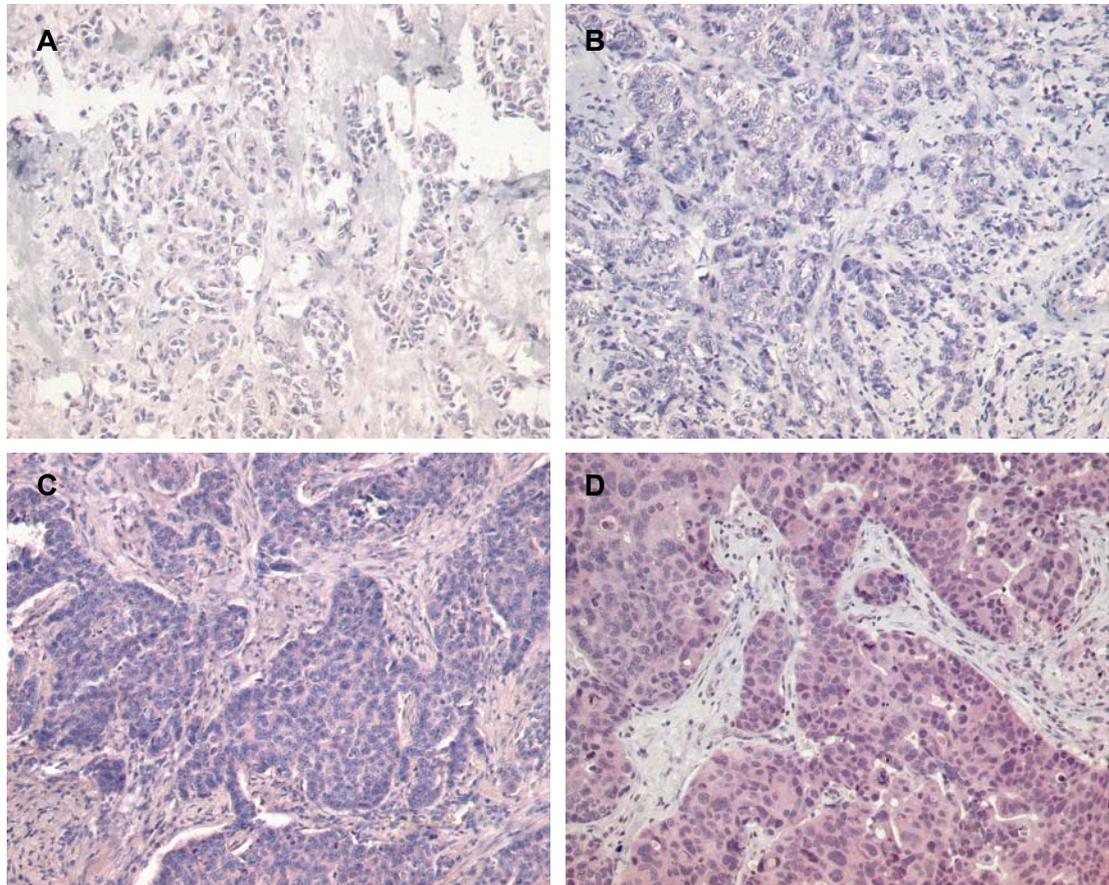
**Abb. 4.2:** Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Cyclooxygenase-2-Expression in invasiv-duktalem Mammakarzinom. Vergrößerung 100x.  
Anfärbung: **A** negativ, **B** schwach, **C** moderat, **D** stark

**A** Patientin 95, bei Erstdiagnose (ED) 82 Jahre, T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, ER positiv

**B** Patientin 65, bei ED 60 Jahre, T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1</sub>, ER negativ

**C** Patientin 96, bei ED 48 Jahre, T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>x</sub>, ER positiv

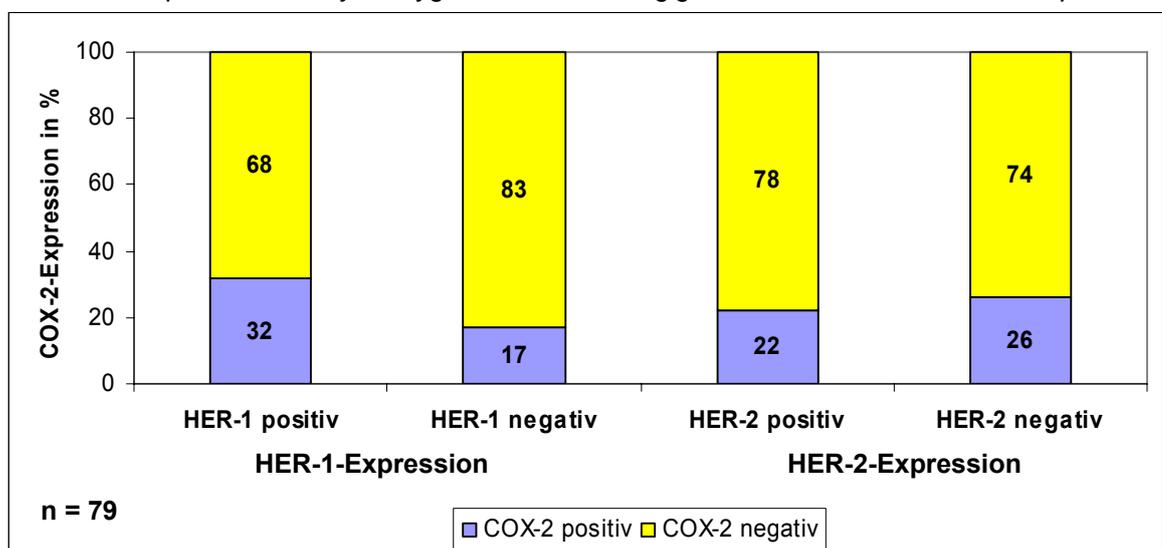
**D** Patientin 70, bei ED 42 Jahre, T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, ER negativ



### 4.3 Expression der COX-2 in Abhängigkeit zur Expression der EGF-Rezeptoren

#### 4.3.1 HER-1 und HER-2

**Abb. 4.3:** Expression der Cyclooxygenase-2 in Abhängigkeit von HER-1- und HER-2-Expression

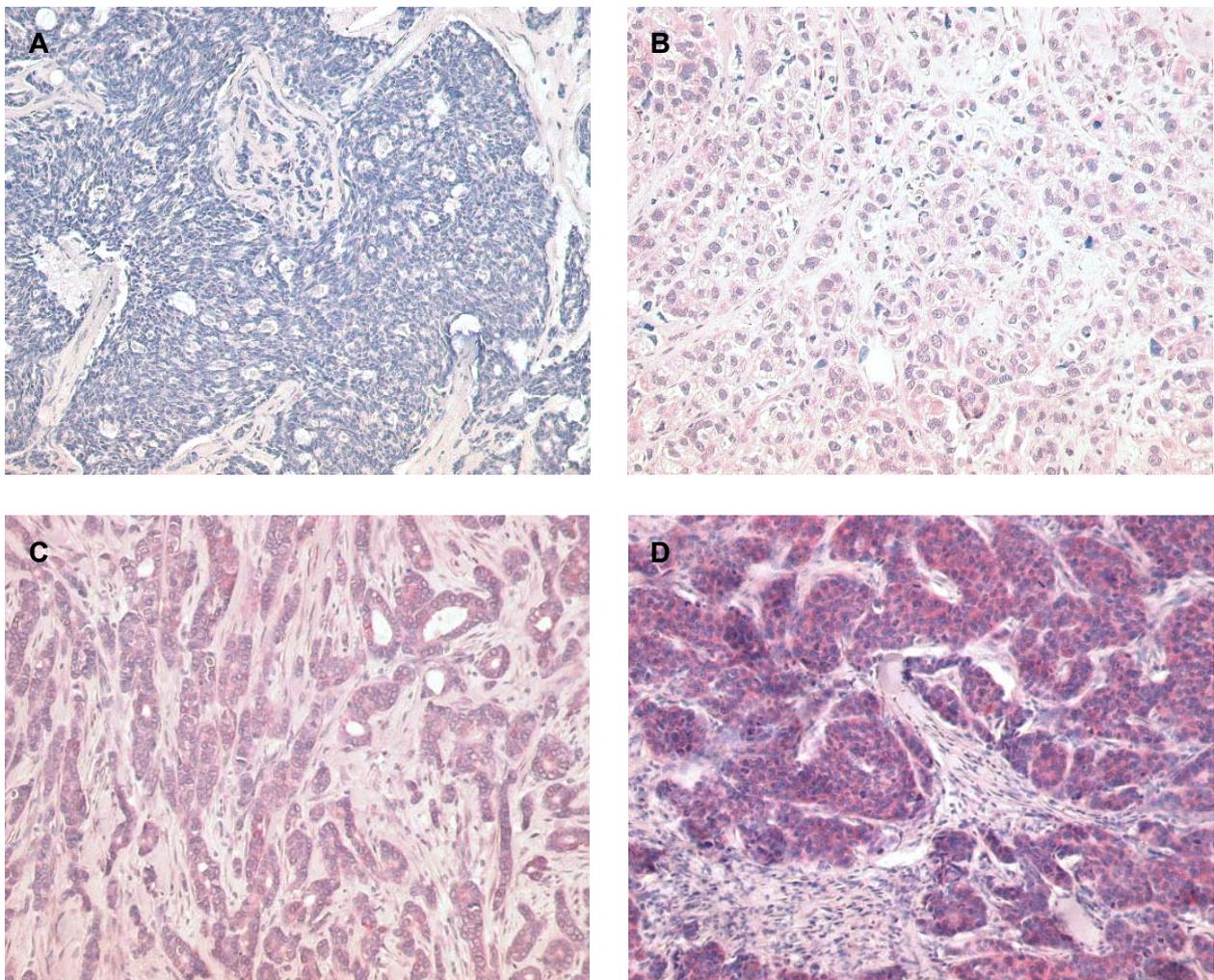


Betrachtet man die Expression der Cyclooxygenase-2 in Abhängigkeit von der Expression der Rezeptoren HER-1 und HER-2, so ergibt sich folgendes Bild (Abbildung 4.3):

Bei 12 von 37 (32 %) Patientinnen wiesen die Tumoren sowohl eine HER-1 als auch eine COX-2-Expression auf. War der HER-1-Nachweis negativ, so fand sich bei 7 (17 %) Patientinnen eine COX-2-Expression ( $p = 0,102$ ).

Von den 37 (42 %) Patientinnen mit HER-2-positiven Tumoren, hatten 8 (22 %) auch eine COX-2-Expression. Bei Patientinnen ohne HER-2-Expression waren 11 (26 %) Tumoren COX-2 positiv ( $p = 0,80$ ).

Abbildung 4.4 zeigt eine exemplarische Darstellung unterschiedlicher HER-1-Expressionen an Beispielen der untersuchten invasiv-duktalem Mammakarzinome.



**Abb. 4.4:**

Exemplarische immunhistochemische Darstellung der HER-1-Expression an Beispielen der untersuchten invasiv-duktalem Mammakarzinome. Vergrößerung 100x. **A** negativ, **B** schwach, **C** moderat, **D** stark

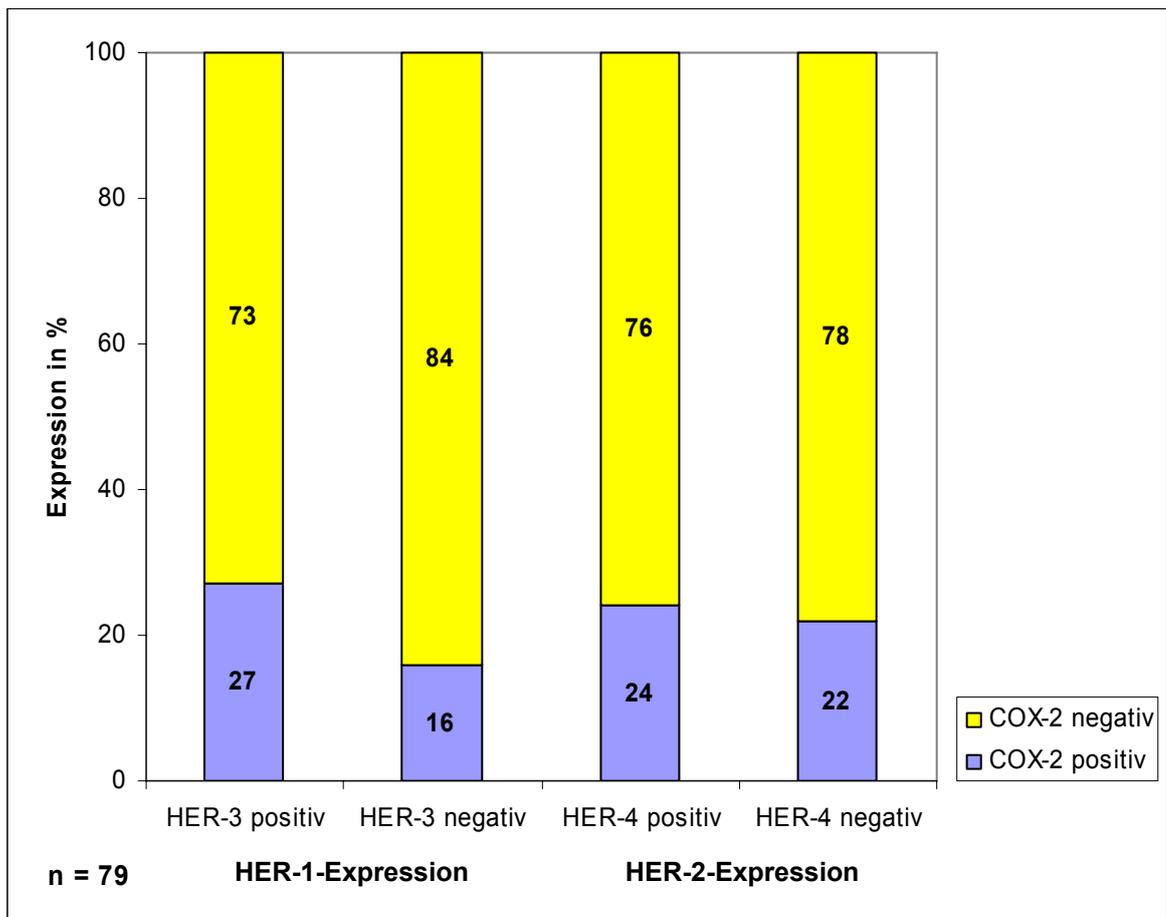
**A** Patientin 19, bei Erstdiagnose (ED) 42 Jahre,  $T_2N_0M_0$ , ER positiv

**B** Patientin 13, bei ED 78 Jahre,  $T_1N_1M_0$ , ER negativ

**C** Patientin 26, bei ED 74 Jahre,  $T_1N_0M_0$ , ER positiv

**D** Patientin 96, bei ED 48 Jahre,  $T_4N_1M_x$ , ER positiv

### 4.3.2 HER-3 und HER-4



**Abb. 4.5:**  
Expression der Cyclooxygenase-2 in Abhängigkeit von der HER-3- und HER-4-Expression

Bei 60 (76 %) Patientinnen waren die Tumoren HER-3 positiv. 19 Tumoren waren (24 %) HER-3 negativ. In 16 (27 %) Fällen wurden sowohl Cyclooxygenase-2 als auch HER-3 exprimiert. Bei Patientinnen, bei denen die Tumoren kein HER-3 exprimierten, waren lediglich 3 (16 %) COX-2 positiv ( $p = 0,539$ ) (Abb. 4.5).

70 (89 %) Patientinnen hatten HER-4 positive Tumoren. 9 (11 %) Patientinnen hatten einen Tumor ohne HER-4-Expression. Bei 17 (24 %) Patientinnen lag eine COX-2/HER-4-Co-Expression vor. In der Gruppe der HER-4-negativen Tumore, zeigten 2 von 9 (22 %) eine Expression der Cyclooxygenase-2 ( $p = 1,0$ ) (Abb. 4.5).

Die folgenden Abbildungen 4.6, beziehungsweise 4.7 zeigen eine exemplarische Darstellung unterschiedlicher HER-3- respektive HER-4-Expressionen an Beispielen der untersuchten invasiv-duktalem Mammakarzinome.

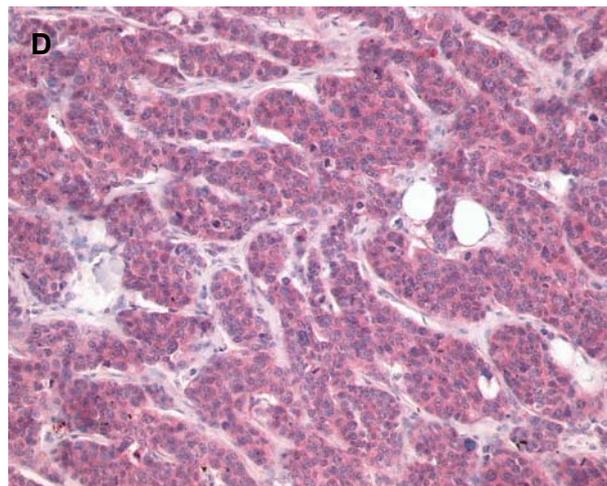
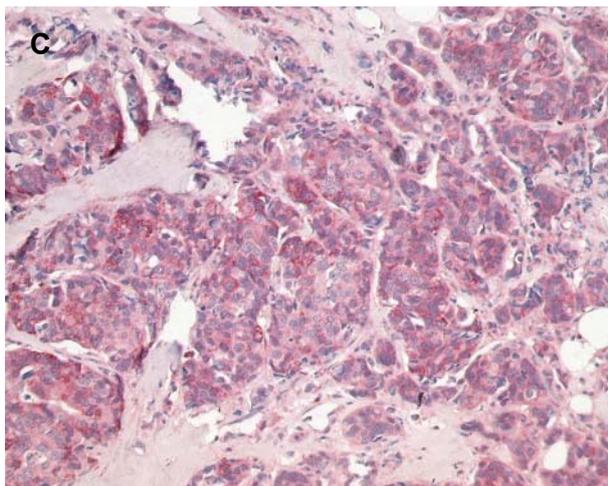
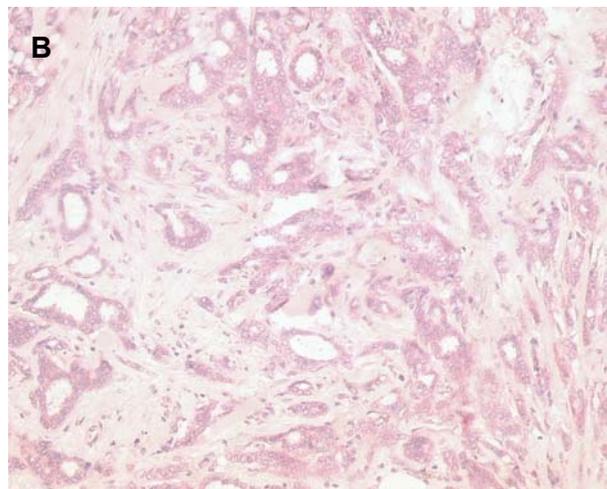
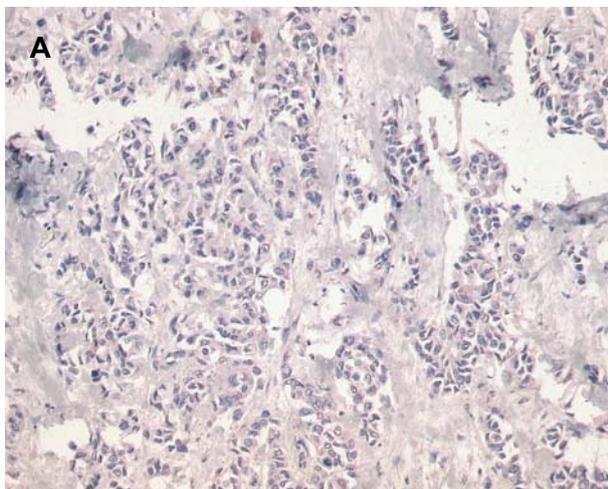
**Abb. 4.6:** Exemplarische immunhistochemische Darstellung der HER-3-Expression an Beispielen der untersuchten invasiv-duktalem Mammakarzinome. Vergrößerung 100x. **A** negativ, **B** schwach, **C** moderat, **D** stark

**A** Patientin 27, bei Erstdiagnose (ED) 74 Jahre, T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1</sub>, ER positiv

**B** Patientin 13, bei ED 78 Jahre, T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>, ER negativ

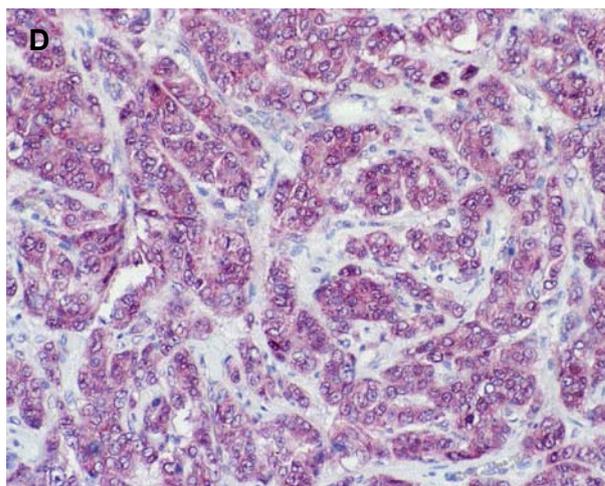
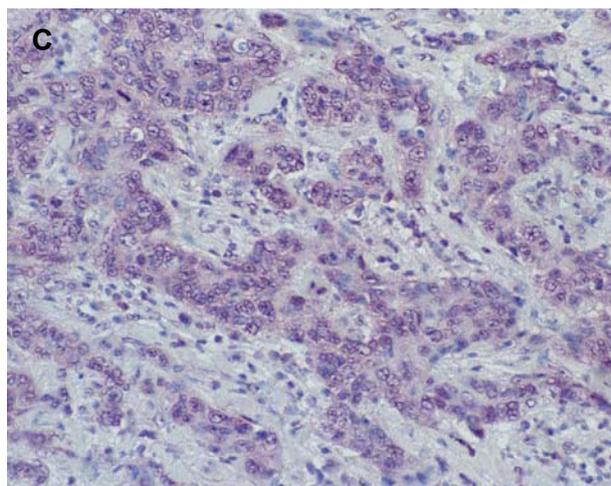
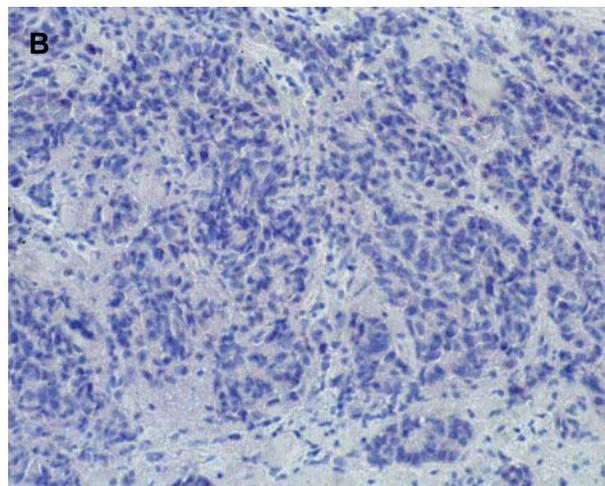
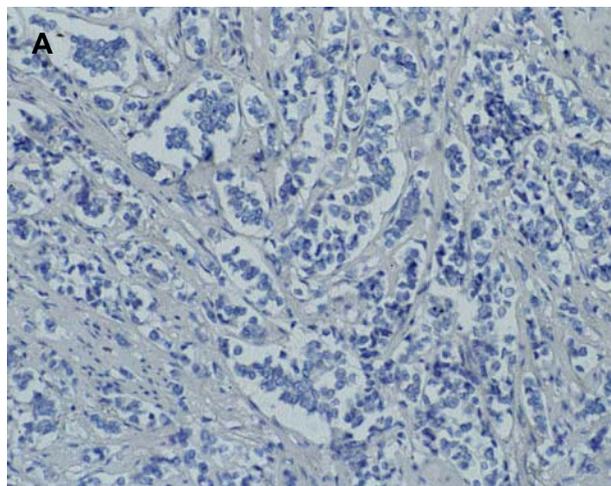
**C** Patientin 69, bei ED 64 Jahre, T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>, ER positiv

**D** Patientin 37, bei ED 47 Jahre, T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>, ER positiv



**Abb.4.7:** Exemplarische immunhistochemische Darstellung der HER-4-Expression an Beispielen der untersuchten invasiv-duktalem Mammakarzinome. Vergrößerung 100x. **A** negativ, **B** schwach, **C** moderat, **D** stark

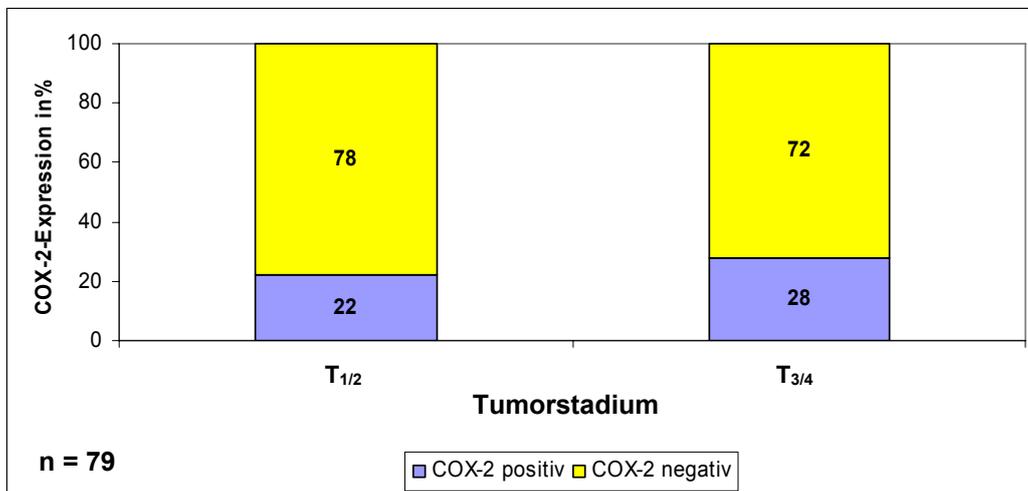
**A** Patientin 60, bei Erstdiagnose (ED) 70 Jahre,  $T_1N_0M_0$ , ER positiv  
**B** Patientin 1, bei ED 50 Jahre,  $T_1N_1M_0$ , ER positiv  
**C** Patientin 15, bei ED 69 Jahre,  $T_3N_1M_0$ , ER negativ  
**D** Patientin 47, bei ED 57 Jahre,  $T_2N_1M_0$ , ER positiv



#### 4.4 COX-2-Expression und klinopathologische Merkmale

Im folgenden Abschnitt wird die Cyclooxygenase-2-Expression in Abhängigkeit zu klinopathologischen Variablen dargestellt.

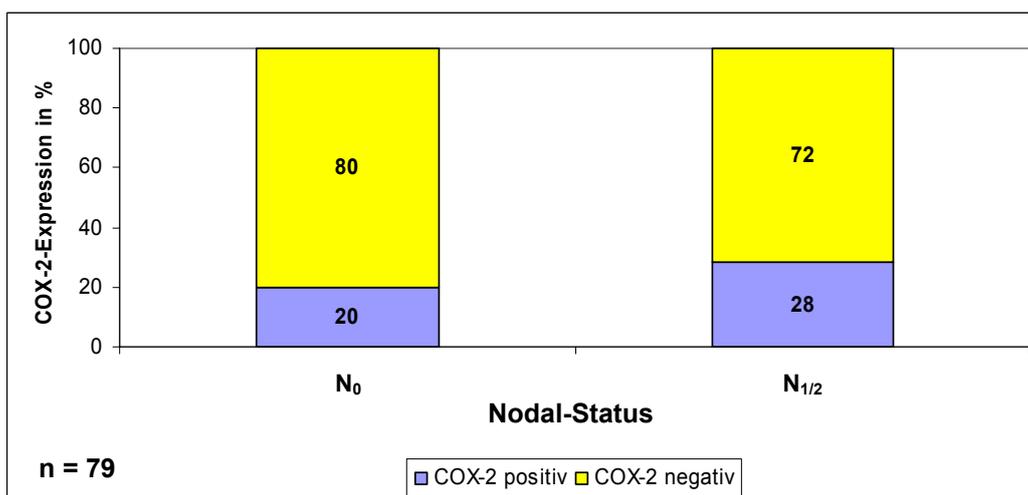
##### 4.4.1 Tumorstadium



**Abb. 4.8:** COX-2-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium

54 Patientinnen hatten Tumoren der Stadien T<sub>1</sub> bzw. T<sub>2</sub>, 25 Patientinnen befanden sich in Stadium T<sub>3</sub> bzw. T<sub>4</sub>. In der T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub>-Gruppe waren 12 (22 %) Tumore COX-2 positiv, in der T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>-Gruppe waren 7 (28 %) Mammakarzinome COX-2 positiv. Tumoren in höheren Stadien weisen häufiger eine COX-2-Expression auf ( $p = 0.576$ ) (Abb. 4.8).

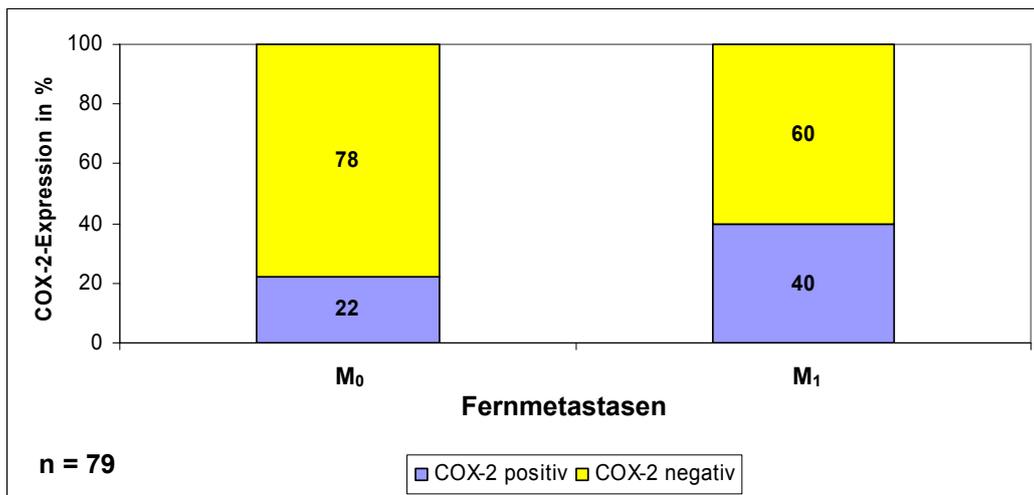
##### 4.4.2 Nodal-Status



**Abb. 4.9:** COX-2-Expression in Abhängigkeit vom Nodal-Status

35 Patientinnen waren nodal negativ, die Primärtumoren von 7 Patientinnen (20 %) waren COX-2 positiv. Bei den 39 Tumoren mit Lymphknotenmetastasen waren 11 (28 %) COX-2 positiv. Tendenziell exprimierten nodal positive Tumoren häufiger die Cyclooxygenase-2 als Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen ( $p = 0,411$ ) (Abb. 4.9).

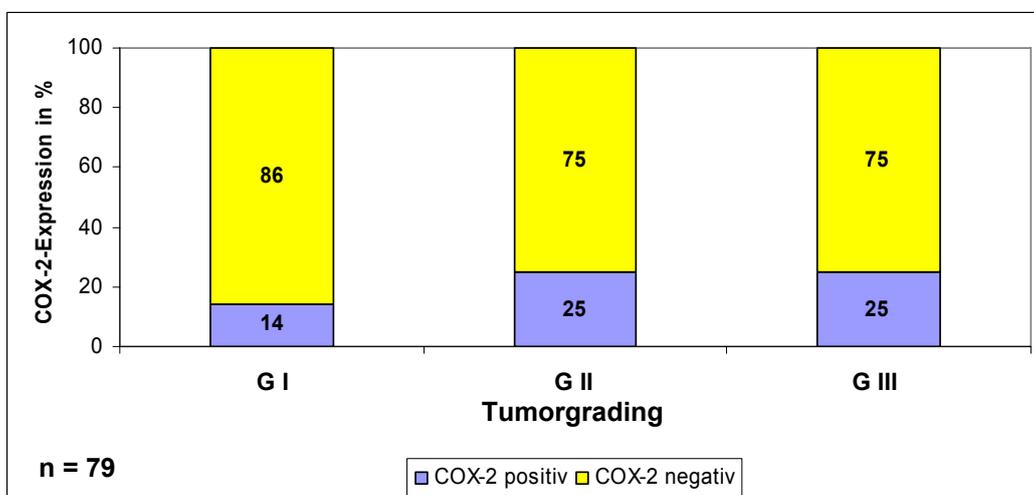
#### 4.4.3 Fernmetastasierung



**Abb. 4.10:** COX-2-Expression in Abhängigkeit von der Fernmetastasierung

Im Untersuchungskollektiv wiesen 10 Patientinnen Fernmetastasen auf; 4 (40 %) dieser Mammakarzinome waren COX-2 positiv. Von den 68 Patientinnen ohne Fernmetastasen exprimierten 15 (22 %) Tumoren die Cyclooxygenase-2 ( $p = 0,217$ ) (Abb. 4.10).

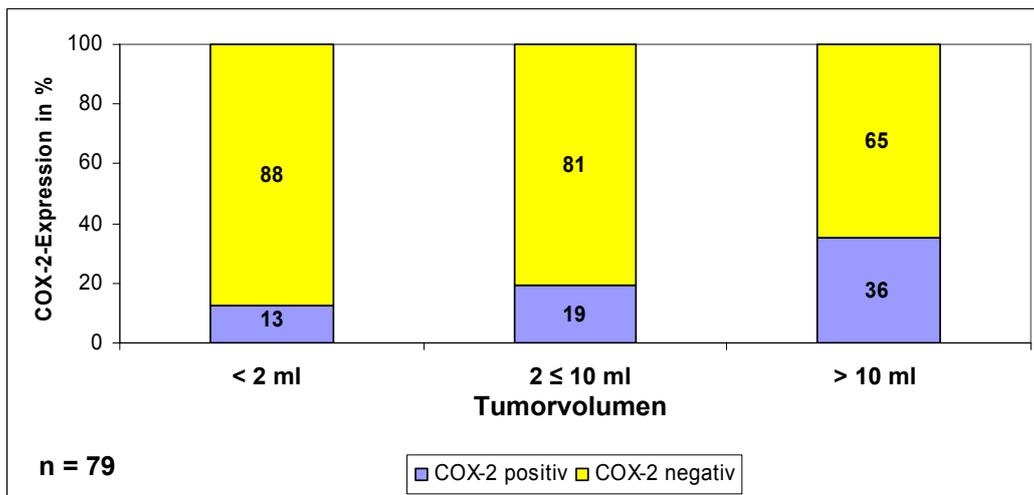
#### 4.4.4 Grading



**Abb. 4.11:** COX-2-Expression in Abhängigkeit vom Tumorgrading

In GI-Tumoren exprimierte 1 Tumor (14 %) die COX-2, in GII-Tumoren 11 (25 %) und GIII-Tumoren 7 (25 %). Die COX-2-Expression war bei Tumoren mit niedriger Differenzierung häufiger, jedoch ist die Fallzahl der COX-2-exprimierenden GI-Tumoren sehr gering, weshalb ein Vergleich nicht möglich ist ( $p = 0,818$ ) (Abb. 4.11).

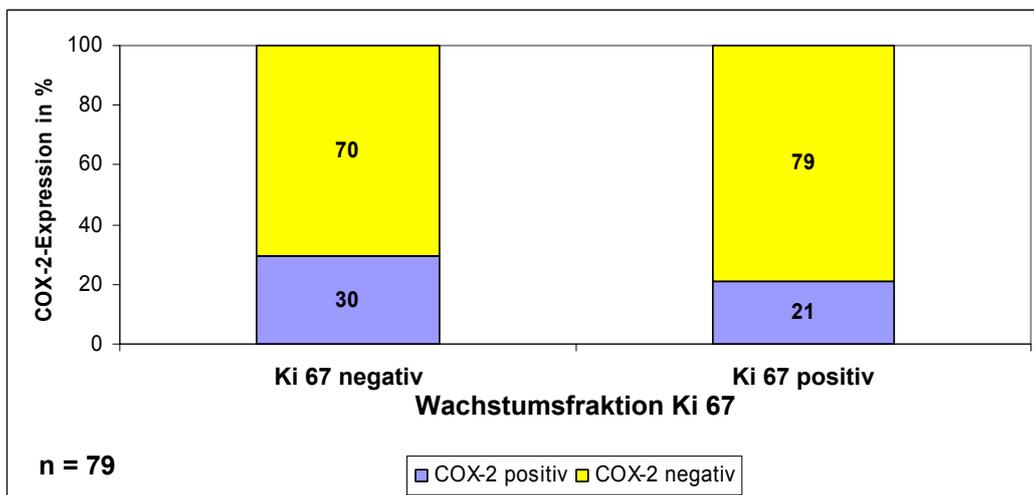
#### 4.4.5 Tumorzvolumen



**Abb. 4.12:** COX-2-Expression in Abhängigkeit vom Tumorzvolumen

Bei Tumoren mit einem Volumen < 2 ml waren 2 von 16 (13 %) COX-2 positiv, bei Volumina zwischen 2 ml und 10 ml exprimierten 6 von 31 (19 %) COX-2 und bei Tumoren >10 ml waren es 11 von 32 (36 %) mit einer positiven COX-2-Expression. Mit zunehmendem Tumorzvolumen steigt die Häufigkeit der COX-2-Expression ( $p = 0,182$ ), ohne die Signifikanzgrenze zu erreichen (Abb. 4.12).

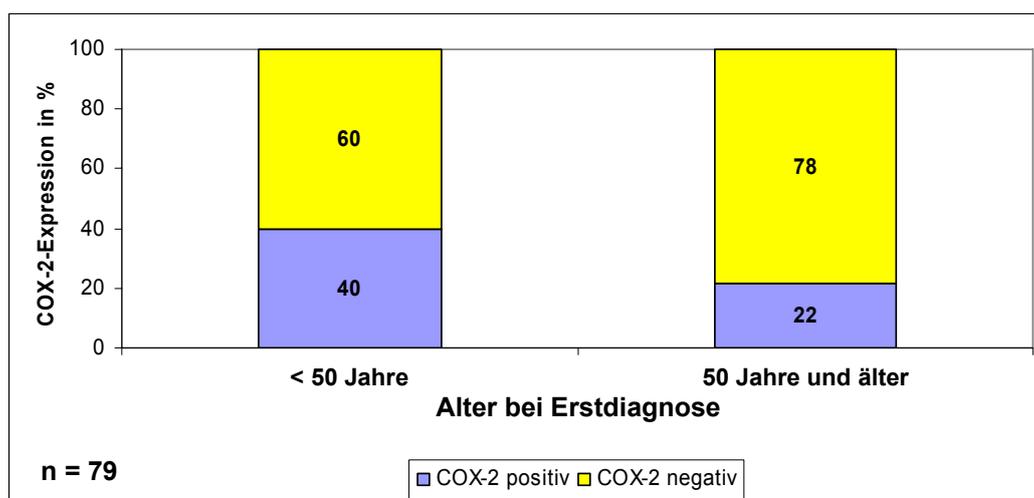
#### 4.4.6 Proliferationsrate Ki 67



**Abb. 4.13:** COX-2-Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsfraktion Ki 67

Von den untersuchten Tumoren war die Proliferationsrate, gemessen an der Wachstumsfraktion Ki 67, bei 27 (34 %) Patientinnen negativ und bei 52 (66 %) positiv. Der Cutt-off-Wert für die Bewertung als positive Wachstumsfraktion lag bei  $Ki\ 67 \geq 20\ %$ . Bei negativer Proliferationsrate waren 8 (30 %) der Tumoren COX-2 positiv, bei positiver Proliferationsrate dagegen 11 (21 %) ( $p = 0,403$ ). Dies ist in Abbildung 4.13 graphisch dargestellt.

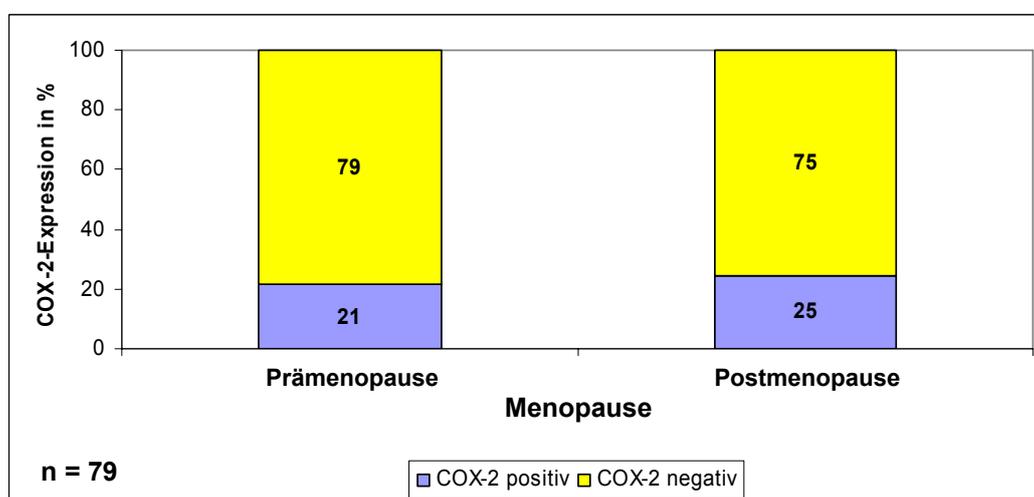
#### 4.4.7 Alter



**Abb. 4.14:** COX-2-Expression in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose

10 Patientinnen waren bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms jünger als 50 Jahre; 4 (40 %) Patientinnen in dieser Gruppe zeigten eine COX-2-Expression. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren 69 Patientinnen 50 Jahre oder älter. In dieser Gruppe war die Cyclooxygenase-2 bei 15 (22 %) Patientinnen exprimiert ( $p = 0,207$ ) (Abb. 4.14).

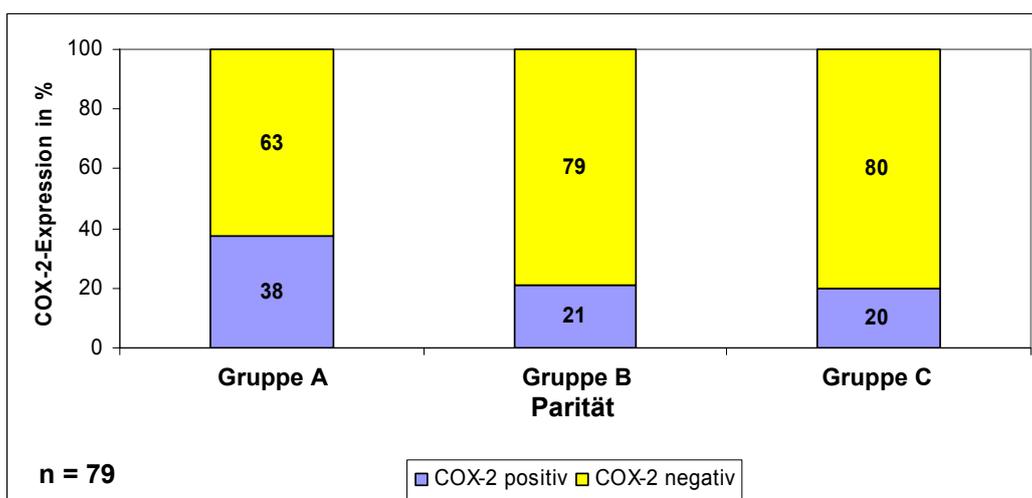
#### 4.4.8 Menopause



**Abb. 4.15:** COX-2-Expression in Abhängigkeit von der Menopause

3 von 14 (21 %) prämenopausalen Patientinnen hatten Tumoren mit einer moderaten bis starken COX-2-Expression. In der Gruppe der postmenopausalen Frauen wiesen 16 (25 %) Patientinnen eine COX-2-Expression auf, 49 (75 %) hingegen waren COX-2 negativ ( $p = 0,370$ ) (Abb. 4.15).

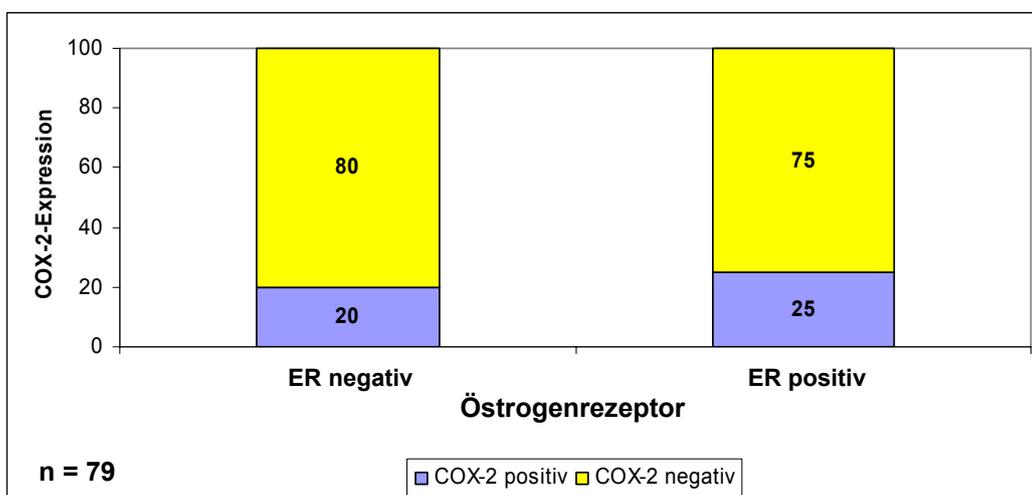
#### 4.4.9 Parität



**Abb. 4.16:** COX-2-Expression in Abhängigkeit von der Parität

16 (20 %) der Tumoren stammten von Patientinnen, die keine Kinder geboren hatten (Gruppe A), 48 (61 %) hatten ein oder zwei Kinder (Gruppe B) und 15 (19 %) Patientinnen mehr als zwei Kinder zur Welt gebracht (Gruppe C). In der Gruppe A wurde die Cyclooxygenase-2 bei 6 (38 %) Patientinnen exprimiert. In der Gruppe B fand sich eine COX-2-Expression bei 10 (21 %) und in Gruppe C bei 3 (20 %) der Fälle ( $p = 0,370$ ) (Abb. 4.16).

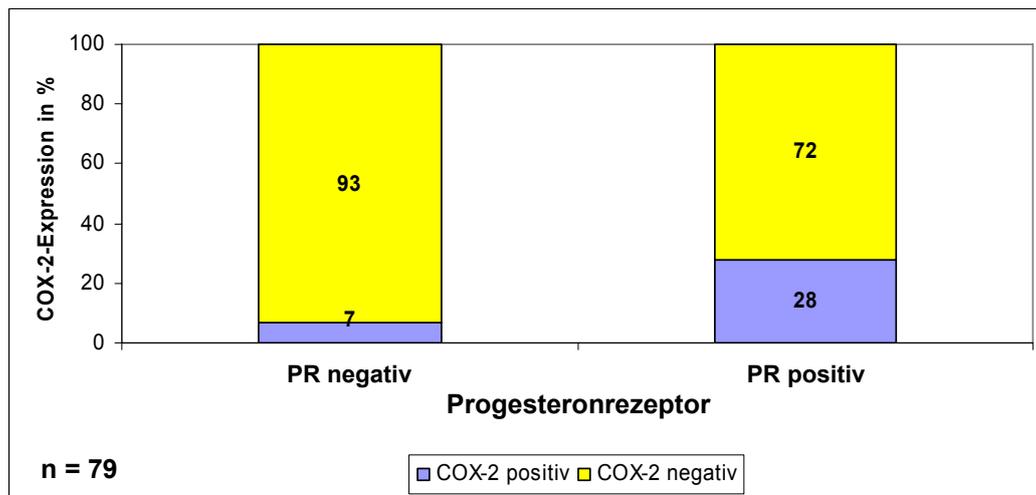
#### 4.4.10 Expression des Östrogenrezeptors



**Abb. 4.17:** COX-2-Expression in Abhängigkeit von der Expression des Östrogenrezeptors

Ob ein Tumor als negativ oder positiv für Östrogen- oder Progesteronrezeptor gewertet wird, ist abhängig vom Anteil der positiven Zellkerne für den jeweiligen Rezeptor in der semiquantitativen Bestimmung mittels Immunhistochemie (Antikörper ER 1D5, Spende aus Oxford, UK). 15 (19 %) Patientinnen hatten ER negative Tumoren. In 64 (81 %) Fällen war der Östrogenrezeptor der Mammakarzinome positiv. Tumoren mit negativem Östrogenrezeptor wiesen bei 3 (20 %) Patientinnen eine COX-2-Expression auf; waren die Tumoren ER positiv, ließ sich bei 16 (25 %) Patientinnen Cyclooxygenase-2 darstellen ( $p = 1,0$ ) (Abb. 4.17).

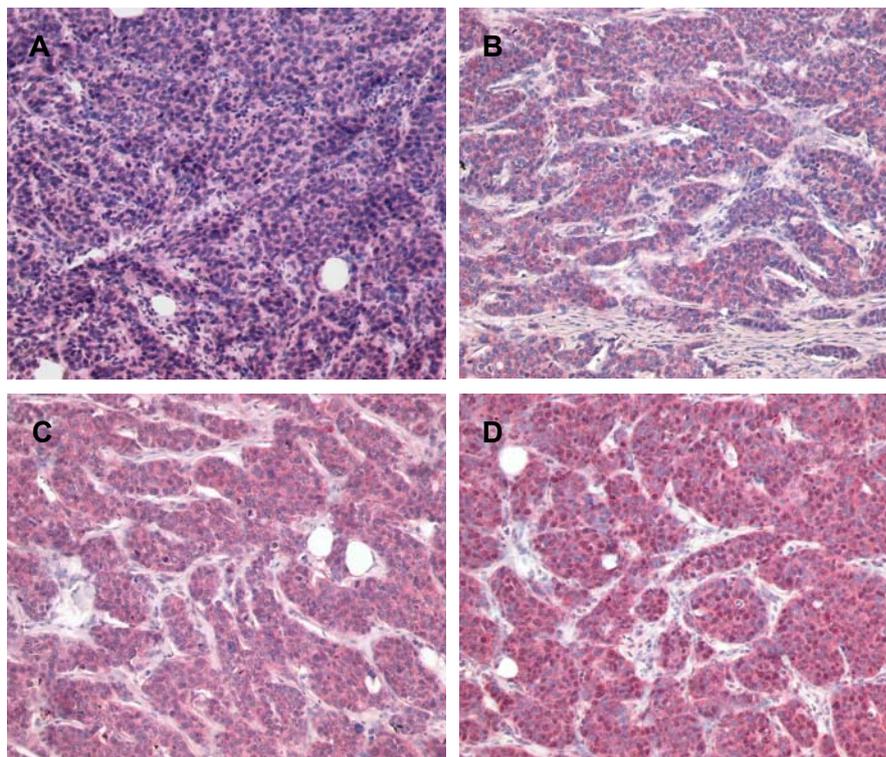
#### 4.4.11 Expression des Progesteronrezeptors



**Abb. 4.18:** COX-2-Expression in Abhängigkeit von der Expression des Progesteronrezeptors

Der Progesteronrezeptor (nachgewiesen an Progesteronrezeptor A, DAKO, Hamburg) wurde bei 14 (18 %) Patientinnen nicht exprimiert, bei 65 (82 %) war der Nachweis immunhistochemisch möglich. Bei Tumoren mit negativem Progesteronrezeptor wurde die Cyclooxygenase-2 nur bei 1 (7 %) Patientin exprimiert. Waren die Tumoren PR positiv, konnte bei 18 (38 %) Patientinnen eine COX-2-Expression nachgewiesen werden ( $p = 0,168$ ) (Abbildung 4.18).

Eine exemplarische Darstellung aller untersuchten Targets an dem invasiv-duktalem Mammakarzinom der Patientin Nummer 30 ist in Abbildung 4.19 dargestellt. Die Patientin war bei Erstdiagnose 66 Jahre alt, der Tumor ist im Staging mit  $T_3N_1M_0$ , GIII eingestuft worden und war ER positiv, PR negativ.



**Abb. 4.19:**  
Exemplarische Darstellung der Expression der untersuchten Targets am invasiv-duktalem Mammakarzinom der Patientin Nr. 30,  $T_3N_1M_0$ , G III. Vergrößerung 100x  
**A** COX-2 moderat  
**B** HER-1 moderat  
**C** HER-3 stark  
**D** HER-4 stark

#### 4.5. Experimente mit Mammakarzinom-Zelllinien

Um die Eigenschaften von Tumoren und die Wirkweise von Substanzen genauer untersuchen zu können, generiert man aus humanen Tumoren Zelllinien. Auf Wirtstiere, wie in diesem Fall Nacktmäuse, xenotransplantiert, ist es möglich, bei schon von der Zelllinie bekannten und reproduzierbaren Eigenschaften, das Tumorstadium, dessen Beeinflussbarkeit und die Expression und Regulierung von spezifischen Merkmalen wie beispielsweise exprimierter Oberflächenmoleküle oder Enzymen zu untersuchen.

Die hier untersuchten Tumorproben stammten alle aus auf Nacktmäuse transplantierten Tumorzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften, wie sie in Tabelle 2.5 beschrieben sind. Die Proben wurden in Analogie zu den Tumoren der Patientinnen gefärbt und beurteilt. Interessanter Weise ließen sich die Targets der aus Zelllinien generierten Tumoren in allen 10 untersuchten Xenografts moderat bis stark anfärben (Tab. 4.3).

Zelllinie	Passage	COX-2	HER-1	HER-2	HER-3	HER-4
<b>3366</b>	38C2	stark	stark	stark	stark	stark
<b>3366C Tam</b>	13	stark	stark	stark	stark	stark
<b>4000</b>	26A	stark	stark	stark	stark	stark
<b>4134</b>	22C	stark	moderat	moderat	stark	stark
<b>4151</b>	29A	stark	stark	stark	stark	stark
<b>4296</b>	23	stark	stark	stark	moderat	moderat
<b>4586</b>	15A	moderat	stark	stark	moderat	stark
<b>4898</b>	9C1	stark	stark	stark	stark	stark
<b>MT-3</b>	14	stark	stark	stark	stark	stark
<b>MDA-MB-435</b>	2	stark	stark	moderat	stark	stark
<b>MDA-MB-231</b>	4	stark	stark	moderat	stark	stark
<b>MCF-7</b>	17	moderat	moderat	stark	stark	stark
<b>Matu</b>	10	stark	stark	stark	stark	stark

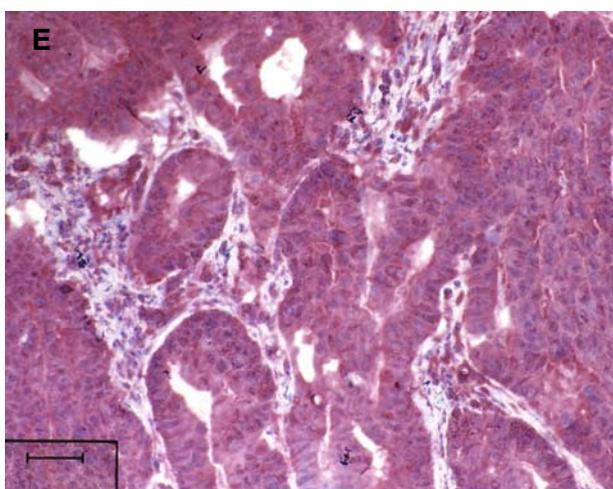
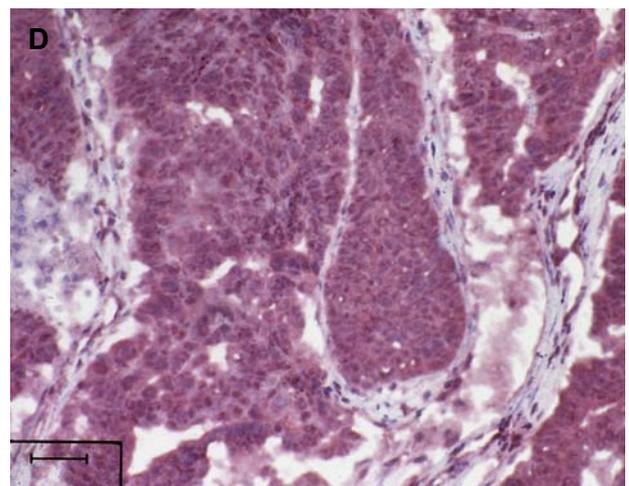
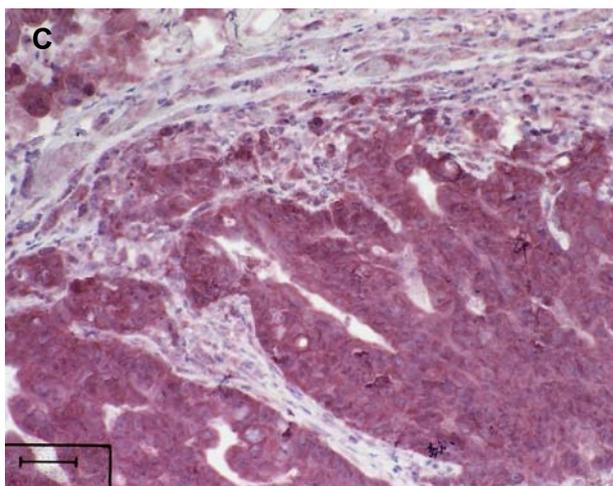
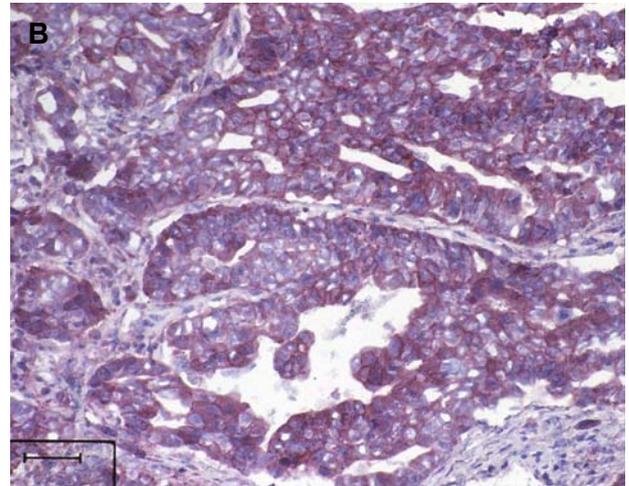
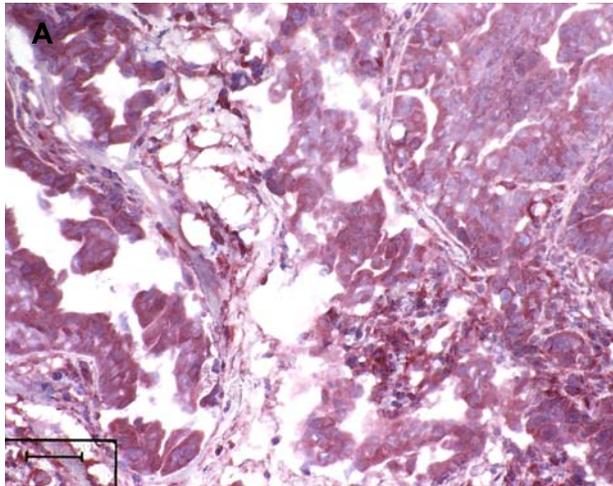
**Tab. 4.3:** Intensität der Expression von Cyclooxygenase-2 und der EGF-Rezeptorfamilie an Xenografts

Eine exemplarische Darstellung der Expression der untersuchten Targets am Beispiel der humanen auf Mäuse xenotransplantierten Mammakarzinom-Zelllinie T3366 ist in Abbildung 4.20 zu finden. Die Zelllinie T3366 wurde ursprünglich aus einem Tumor einer postmenopausalen Patientin generiert, die an einem ER positiven, invasiv-duktalem Mammakarzinom erkrankt war.

**Abb. 4.20:**

Exemplarische Darstellung der untersuchten Targets am Beispiel der humanen invasiv-duktalem und auf Mäuse xenotransplantierten Mammakarzinom-Zelllinie T3366. Vergrößerung 200x

- A HER-1
- B HER-2
- C HER-3
- D HER-4
- E Cyclooxygenase-2



## 5. DISKUSSION

### 5.1 COX-2 Expression

Um in der Optimierung eines Therapiekonzeptes möglichst vor der Gabe eines Medikamentes abschätzen zu können, ob ein Patient von ihm profitiert, bedarf es einer einfachen Methode, dies vor Therapiebeginn zu klären. Im Falle der Cyclooxygenase-2 bietet sich der Nachweis mittels Immunhistochemie an, da auch Oberflächenmoleküle, wie beispielsweise HER-2, routinemäßig mit dieser Methode nachgewiesen werden.

In der Literatur werden zur Expression von COX-2 beim Mammakarzinom zum Teil recht kontroverse Angaben gemacht:

Parrett (Parrett et. al. 1997) fand die Cyclooxygenase-2 in allen 13 analysierten Proben überexprimiert, während Hwang (Hwang et al. 1998) mittels Immunoblot in nur 2 von 44 Proben (4,5 %) eine erhöhte COX-2-Expression in den Tumorzellen nachweisen konnte. Half (Half et al. 2002) fand in 18 von 44 (43 %) invasiv-duktalem Mammakarzinomen und in 10 von 16 (63 %) duktalem Carcinomata in situ eine moderate oder hohe COX-2-Expression. Durch dieses Ergebnis geleitet, kam er zu der Hypothese, dass die COX-2-„Hochregulation“ ein relativ frühes Geschehen im Tumorwachstum sei. Auch Nakopoulou (Nakopoulou et al. 2005) unterstützt diese These: er wies immunhistochemisch in 175 Fällen invasiver Mammakarzinome zu 66,9 % eine Cyclooxygenase-2-Überexpression nach. Park (Park et al. 2006) dagegen beschreibt bei 178 nodal positiven Mammakarzinomen in 78 Proben (39,3 %) eine vermehrte COX-2-Expression und schreibt die Cyclooxygenase-2-Expression eher einem aggressiven Phenotyp zu. Die Arbeitsgruppe um Soslow (Soslow et. al. 2000) berichtet von einer immunhistochemisch nachgewiesenen Überexpression in 7 von 17 (41 %) duktalem Mammakarzinomen, beschränkte sich jedoch in der Auswahl der Tumorgewebe auf das duktalem Carcinomata in situ. Das größte Kollektiv mit 1.576 invasiv-duktalem Mammakarzinomen untersuchte Ristimäki mit seiner Arbeitsgruppe (Ristimäki et al. 2002). Er wies immunhistochemisch in 37,4 % der Fälle eine mittlere bis starke COX-2-Expression nach, indem er die über 1.700 Tumoren mit repräsentativen Proben von 0,6 mm Durchmesser in Reihe legte und auf insgesamt 19 Blöcken simultan bearbeitete. Diese immunhistochemische Untersuchung von so genannten „tissue microarrays (TMA)“ ist mit der herkömmlichen Methode, ganze Gewebelöcke zu untersuchen, als gleichwertig anzusehen (Henriksen et al. 2006). Ein Ergebnis, dass im Vergleich mit unserem Kollektiv, in dem von 79 Patientinnen in 19 Fällen (24 %) Tumoren mit einer moderaten bis starken COX-2-Expression nachgewiesen wurden, eine höhere Expressionsrate aufweist. Ursächlich kann bei reproduzierbarer Methode und gleichem pathologischen Tumorsubtyp sowohl unsere kleine Fallanzahl zugrunde gelegt werden als auch die proportional größere Gruppe an Tumoren in niedrigeren Tumorstadien.

## 5.2. Expression der EGF-Rezeptoren

Aus der Gruppe der EGF-Rezeptoren haben im klinischen Alltag der HER1- und der HER-2-Status eine prädiktive und therapeutische Relevanz. Hier soll jedoch die gesamte Familie der Wachstumsfaktoren betrachtet werden, da beispielsweise bei Mundbodenkarzinomen (Xia et al. 1999), und kürzlich auch bei Mammakarzinom beschrieben, die Kombination von HER-1, HER-2 und HER-3 nicht nur eine stärkere prädiktive Aussagekraft als ein Rezeptor allein hat, sondern auch mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit assoziiert ist (Abd El-Rehim et al. 2004, Bianchi et al. 2006).

Die HER-1-Expression in Mammakarzinomen wird zwischen 14–90 % angegeben (Bianchi et al. 2006, Abd El-Rehim et al. 2004, Hudelist et al. 2003). Die Rate von „Non-Respondern“ in einer endokrinen Therapie ist bei HER-1 positiven Tumoren deutlich höher als bei negativem Status (Slamon et al. 1987), wobei jüngste Studien nahe legen, dass der HER-1/HER-2-Signalweg in der „de novo“ entstehenden Resistenzentwicklung unter Tamoxifen entscheidend ist (Gee et al. 2005) und die Inhibition von HER-2 zu einer Hochregulierung von HER-1 führt (Miller et al. 2004). Ob die Expression von HER-1 eine prognostische Aussagekraft hat, ist umstritten: Tsutsui (Tsutsui et al. 2002) fand Hinweise dafür, Rampaul (Rampaul et al. 2004) und Ferrero (Ferrero et al. 2001) konnten diese These nicht bestätigen.

Im untersuchten Kollektiv wurde HER-1 zu 47 % exprimiert, ein Ergebnis, das in der Bandbreite der in der Literatur genannten Häufigkeiten liegt. Es wird angenommen, dass HER-1 wichtige Schritte der Tumordinvasion wie beispielsweise Veränderungen des Zytoskeletts, Änderungen der Zellmotilität oder zellmatrixdegradierende Enzyme induziert (Khazaie et al. 1993). Die Hypothese, dass auch die Cyclooxygenase-2 maßgeblich an der Tumordinvasion beteiligt ist, wird durch die Tendenz ( $p = 0,102$ ) gestützt, dass in 32 % eine Co-Expression zur Cyclooxygenase-2 vorlag, während HER-1 negative Tumoren nur in 17 % der Fälle COX-2 exprimierten. In Experimenten mit spezifischen HER-1 und COX-2-Inhibitoren an Zelllinien konnten für beide Substanzen allein und in Kombination supra-additive antiproliferative und antiangiogenetische Effekte beobachtet werden (Lanza-Jacoby et al. 2006, Tortora et al. 2003) sowie die Verlängerung des gegen Tamoxifen resistenzfreien Intervalls (Knowlden et al. 2003). Daher wäre die simultane Inhibition von Cyclooxygenase-2 und HER-1 ein viel versprechendes adjuvantes Therapiekonzept, was auch schon in ersten Studien in der Therapie von Lungentumoren und auch Mammakarzinomen eingesetzt wird (Paetz et al. 2004, Nicholson et al. 2004).

Betrachtet man die HER-2-Expression, ist zu beachten, dass hier eine Vorauswahl der Tumoren gegeben ist, um in dieser Untersuchung eine möglichst vergleichbare Anzahl HER-2 positiver wie negativer Tumoren zu erhalten, denn die Kenntnis des HER-2-Status von den EGF-Rezeptoren ist klinisch bei der Auswahl des Therapieregimes am bedeutendsten. Daher weisen im untersuchten Kollektiv 47 % der Tumoren eine HER-2-Expression auf, während in

genügend großen Kollektiven ohne Auswahl nur eine Häufigkeit von 20–30 % zu erwarten gewesen wäre. Da HER-2 als Co-Rezeptor und bevorzugter Partner bei Heterodimerisierungen mit anderen EGF-Rezeptoren fungiert (Hudelist et al. 2003, Tzahar et al. 1996), ist eine Interpretation der Ergebnisse auf der alleinigen Basis der EGF-Rezeptoren problematisch. Auffällig ist jedoch, dass die Expression der Rezeptoren HER-1 und HER-2 mit jeweils 47% übereinstimmen. Betrachtet man die gefundenen Häufigkeiten im Zusammenhang mit der Expression des Cyclooxygenase-2 (Ergebnisse 4.3.1), besteht zwischen der Expression der COX-2 und des Rezeptors HER-2 keine Assoziation ( $p = 0,8$ ). Dieses Ergebnis steht, wie auch die Arbeiten von Half oder Costa (Half et al. 2002, Costa et al. 2002), im Gegensatz zu der von verschiedenen Autoren gefundenen Assoziation der HER-2- und COX-2-Expression in Zelllinien (Vadlamudi et al. 1999, Subbaramaiah et al. 1999), im Tierversuch (Howe et al. 2002) und an humanen Tumoren (Ristimäki et al. 2002). Es unterstützt auch nicht direkt den von Subbaramaiah und Davies (Subbaramaiah et al. 2002, Davies et al. 2002) vermuteten Regulationsweg der Cyclooxygenase-2 über HER-2 als Tyrosinkinase. Doch die Regulation der COX-2 hängt nicht nur von Tyrosinkinasen ab, sondern wird von verschiedenen Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Onkogenen beeinflusst (Schmitz et al. 2006). HER-2 kann zusätzlich posttranslational beispielsweise durch Autophosphorylierung modifiziert und somit aktiviert werden (Whorthylake et al. 1999). Auch die vielfältigen Möglichkeiten von HER-2, Heterodimere mit anderen EGF-Familienmitgliedern zu bilden, ist ein möglicher Erklärungsansatz dafür, dass der Level der HER-2-Expression nicht mit der Aktivität und seiner Fähigkeit, die Expression der Cyclooxygenase-2 zu induzieren, korreliert.

Aus therapeutischer Sicht wäre der Ansatzpunkt eines selektiven COX-2-Inhibitors also unabhängig von der Kenntnis des HER-2-Status denkbar, und etwa ein Viertel der Patientinnen könnte von einer solchen Therapie profitieren. Besonders für Patientinnen, denen sich wegen eines Tumors ohne HER-2-Überexpression die Möglichkeit des Einsatzes von Trastuzumab nicht bietet, könnten mit COX-2-Inhibitoren auch selektive Therapieansätze eröffnet werden.

Die EGF-Rezeptoren HER-3 wie auch HER-4 sind eher in differenzierteren Tumoren (Memon et al. 2006, Srinivasan et al. 2000) und in der Literatur mit einer Häufigkeit von 55–90 % zu finden (Bianchi et al. 2006, Abd El-Rehim et al. 2004), so dass die hier nachgewiesenen Expressionen von HER-3 mit 76 % und HER-4 mit 89 % in den Kanon der beschriebenen Häufigkeiten passen. Vergleicht man die COX-2-Expression in Abhängigkeit zur Expression von HER-3, so ist bei HER-3 positiven Tumoren häufiger die Cyclooxygenase-2 nachzuweisen als bei HER-3 negativen Tumoren, ohne statistisch signifikant zu sein. Vor dem Hintergrund, dass Travis eine Abhängigkeit der HER-3-Expression von der Tumorgroße nachwies (Travis et al. 1996), kann diese beobachtete Abhängigkeit zu dem Schluss führen, dass die Expression der Cyclooxygenase-2 die Invasivität der Tumoren beeinflusst. Vadlamudi beobachtete beispiels-

weise in diesem Zusammenhang, dass die Aktivierung des HER-2/HER-3-Signaltransduktionsweges über Heregulin die Aktivität des COX-2-Promotors, die Expression der COX-2-mRNA sowie die Akkumulation von PGE<sub>2</sub> in Kolonkarzinomzellen induziert. Wurden die Heterodimere von HER-2/HER-3 mit Hilfe eines Antikörpers gegen HER-3 geblockt, verringerten sich sowohl die Anzahl der Heterodimere von HER-2/HER-3 als auch die COX-2-Expression (Vadlamudi et al. 1999). Mehrere Autoren beschreiben eine Co-Expression der Rezeptoren HER-3 und HER-4 (Bianchi et al. 2006, Hudelist et al. 2003), wobei beschrieben ist, dass sowohl bei HER-4 positiven Tumoren allein als auch dem HER-3/HER-4-Heterodimer ein besseres Gesamtüberleben (Abd El-Rehim et al. 2004) oder ein längeres krankheitsfreies Überleben (Knowlden et al. 1998) prognostiziert werden kann. Interessanter Weise ist bei HER-4 positiven wie auch negativen Tumoren die Expression der Cyclooxygenase-2 in diesem Kollektiv vergleichbar ( $p = 1,0$ ). Die Interpretation gestaltet sich schwierig. Zusammen mit der Beobachtung von Denkert, dass die Cyclooxygenase-2 eher in aggressiven Tumoren vorherrscht und ein negativer prognostischer Faktor für das krankheitsfreie Überleben sei (Denkert et al. 2003), scheint die Expression der Cyclooxygenase-2 in Abhängigkeit von der HER-4-Expression nicht geeignet zu sein, kombinierte Targets in der Therapie des invasiv-duktales Mammakarzinoms zu sein oder als möglicher prognostischer Marker zu dienen.

Viel versprechend scheint der Einsatz von Antikörpern nicht nur gegen HER-2, sondern auch gegen HER-1 als eine Therapieoption, gerade da die Signaltransduktion durch die Bildung der Heterodimere der einzelnen Rezeptoren der Wachstumsfaktoren so komplex ist.

Für die Mitglieder der EGF-Familie und ihrer genauen Funktion in der Tumorgenese besteht noch intensiver Forschungsbedarf.

Im folgenden Abschnitt soll auf Expression der Cyclooxygenase-2 in Abhängigkeit zu den betrachteten Merkmalen der einzelnen Patientinnen näher eingegangen werden. Der Übersicht halber werden dabei die klinopathologischen Merkmale in Gruppen zusammengefasst erläutert.

### **5.3 COX-2-Expression und klinopathologische Merkmale**

#### **5.3.1 TNM-Stadium, Tumolvolumen**

Gestützt auf einige Autoren, die eine Assoziation der COX-2-Expression zu höheren TNM-Klassifikationen gefunden haben (Ristimäki et al. 2002, Shim et al. 2003), wurde dies auch an diesem Kollektiv untersucht. Auch hier sind die Literaturangaben sehr divergent: Befürwortern der Hypothese, dass es eine Assoziation zwischen COX-2-Expression und T-Stadium, großem Tumolvolumen (Gunnarson et al. 2006, Nakopulou et al. 2005) und hohem Grading (Surowiak et al. 2005) existiert (Park et al. 2006 [nur Grading], Shim et al. 2003, Ristimäki et al. 2002), stehen ebenso vielfältige Autoren gegenüber, die diese Hypothese nicht unterstützen, (Park et al. 2006, Kelly et al. 2003, Davies et al. 2002).

Der Unterschied der gefundenen COX-2-Expression zwischen Tumoren von T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub>-Stadien (Ergebnisse 4.4.1) mit 22 % zu 28 % bei T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>-Stadien war in dem von uns untersuchten Kollektiv ebenso gering ( $p = 0,567$ ) wie beim Vergleich nodal positiver versus nodal negativer Tumoren (siehe Ergebnisse 4.4.2), bei denen 20 % der N<sub>0</sub> COX-2 positiv waren versus 28 % der N<sub>1/2</sub> mit einer COX-2-Expression ( $p = 0,411$ ). Der Trend wurde bei der Betrachtung der Cyclooxygenase-2-Expression in Abhängigkeit zur Metastasierung (Ergebnisse 4.4.3) schon deutlicher: Bei Patientinnen ohne Fernmetastasen exprimierten nur 22 % die Cyclooxygenase-2 verglichen mit 40 % der Tumoren bei Patientinnen mit Filiae ( $p = 0,217$ ). Da die Cyclooxygenase-2 auch an der Induktion von Interleukin 8 (IL-8) beteiligt ist, welches die Produktion von Osteoklasten und den Abbau von Knochenmatrix stimuliert, wäre die spezifische Inhibition ein möglicher Angriffspunkt in der Prävention von ossären Metastasen (Singh et al. 2006) bei metastasierten, COX-2 exprimierenden Mammakarzinomen.

### **5.3.2 Grading und Proliferationsrate**

Die zunehmende COX-2-Expression mit sinkendem Differenzierungsgrad (14 % der GI-Tumoren versus jeweils 25 % der GII- und GIII-Tumoren) lässt einen Zusammenhang nur vermuten, der statistisch leider nicht nachweisbar ist, da es nur einen Fall eines COX-2 exprimierenden GI-Tumors im untersuchten Kollektiv gab ( $p = 0,81$ ). Eine Tendenz zwischen der Häufigkeit der COX-2-Expression und steigendem Tumolvolumen (Ergebnisse 4.4.5) war im untersuchten Kollektiv zu verzeichnen. Während von Tumoren mit einem Volumen < 2 ml 13 % COX-2 positiv waren, stieg die Häufigkeit der COX-2 positiven Tumoren auf 19 % bei den Tumoren zwischen 2 und 10 ml und auf 36 % bei den > 10 ml großen Tumoren ( $p = 0,182$ ).

Am untersuchten Kollektiv konnte eine Abhängigkeit der COX-2-Expression zur hohen Proliferationsrate (Ergebnisse 4.4.6) des Tumors nicht reproduziert werden ( $p = 0,403$ ). Damit reiht sich das Ergebnis in die Aussagen von Costa (Costa et al. 2002), Davies (Davies et al. 2003) und Half (Half et al. 2002) ein.

Zu bedenken ist, dass die Proliferationsrate gemessen an dem Wachstumsfaktor Ki67 nur eine Momentaufnahme in der Entwicklung des Tumors darstellt und nicht im monokausalen Zusammenhang mit der Expression eines Rezeptorproteins stehen muss. Dabei lässt dieses Ergebnis keine Rückschlüsse zu, ob die vermehrte Expression ein frühes oder spätes Tumorgeschehen sei, wie Half (Half et al. 2002) es als Hypothese formulierte, da unberücksichtigt bleibt, ob die Expression in bestimmten Teilen des Tumors, wie beispielsweise eher in rand- oder gefäßnahen Gebieten, vorherrscht oder als ein Marker für Invasivität und Aggressivität gelten könnte. Interessanter Weise fand Park (Park et al. 2006) zwar weder eine Assoziation der COX-2-Expression zur Tumorgroße, zum histologischen Grad oder der Existenz der Östrogenrezeptors und dennoch war die Überlebenszeit der Patienten mit einem COX-2-exprimierenden Tumor signifikant kürzer, was auf eine höhere Aggressivität dieser Tumor-

gruppe deutete. Auch Schmitz (Schmitz et al. 2006) und Gunnarson (Gunnarson et al. 2006) kamen bei nodal negativen Tumoren zu dem Ergebnis, dass die COX-2-Expression auf aggressivere Tumoren beziehungsweise eine schlechtere Prognose hindeuten.

Cejas und Kollegen vermuten auf Grund der Beobachtung, dass in gesundem Gewebe die Cyclooxygenase-2 vornehmlich membranständig exprimiert wird, während sie in invasivem Tumorgewebe eher im Zytoplasma zu finden ist, eine posttranslationale Regulation der COX-2-Expression (Cejas et al. 2005), wobei die exakten Mechanismen, mit denen die Expression der Cyclooxygenase-2 in die Karzinogenese involviert ist, noch nicht vollständig erklärbar sind. Relevant scheint die Beeinflussung der COX-2-Expression in der Tumorgenese durch Wachstumsfaktoren, Onkogene und den Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53 zu sein. Ristimäki (Ristimäki et al. 2002) fand ebenso wie Cho (Cho et al. 2006) und Nakopoulou (Nakopoulou et al. 2005) eine signifikante Korrelation zwischen der COX-2- und einer hohen p53-Expression.

Eine zentrale Funktion ist vermutlich die COX-2-vermittelte Förderung der Neoangiogenese im Tumorgewebe. Dafür gibt es mehrere Hinweise: Den ersten genetisch begründeten Hinweis, dass COX-2 einen Beitrag zu Entstehung des durch HER-2-induzierten Brustkrebs leistet, liefert Howe mit COX-2-Knockout-Mäusen: Im Brustgewebe der COX-2-Knockout-Mäuse fehlten praktisch Blutgefäße, und im Vergleich zu Mäusen mit dem COX-2-Allel war das Tumorstadium verlangsamt (Howe et al. 2005). Davies beschreibt eine Assoziation der Expression von COX-2 und CD 31, einem Immunglobulin, das unter anderem eine Rolle bei der Migration und Angiogenese spielt (Davies et al. 2003), sowie das Vorkommen von VEGF, einem wichtigen Mediator bei der Entstehung neuer Gefäße (Chung et al. 2000, Anan et al. 1996), der mitverantwortlich ist für die Induktion der Produktion von Proteasen und deren Migration in die Zelle und allen Anforderungen, die für die Bildung neuer Blutgefäße notwendig sind. Eine signifikante Assoziation besteht zwischen vascular endothelial growth factor-189 (VEGF-189) und COX-2 auf mRNA Ebene (Kirkpatrick et al. 2002), und kürzlich wurde von einem initialen Abfall des VEGF-Levels im Serum von Patientinnen berichtet, die Celecoxib einnahmen (Ueno et al. 2006). Eine erhöhte Expression der COX-2 kann direkt mit der Dichte der Vaskularisation des Tumorgewebes in Zusammenhang gebracht werden (Costa et al. 2002). PGE<sub>2</sub>, das Hauptprodukt der Cyclooxygenase-2, vermag VEGF direkt zu induzieren (Cheng et al. 1998) und die Gefäßdichte zu erhöhen, schon bevor eine Vergrößerung des Tumorstadiums sichtbar wird (Chang et al. 2004). Inhibiert man die Cyclooxygenase-2, so nehmen PGE<sub>2</sub>- und VEGF-Level ebenso wie die Vaskularisation ab (Howe et al. 2005, Basu et al. 2005). Die Interaktion zwischen Cyclooxygenase-2 und Neoangiogenese kann man sich, wie in Abbildung 5.1 dargestellt, vorstellen:

**Abb. 5.1:** Der Effekt von Hypoxie in der Angiogenese (nach Rahman et al. 2003)

**Abkürzungen:**

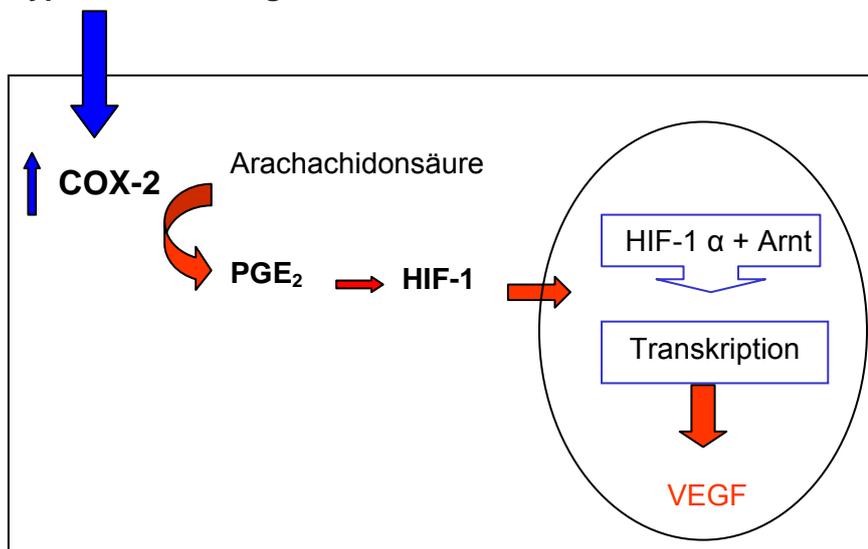
$PGE_2$ : Prostaglandin  $E_2$

Arnt: aromatic hydrocarbon nuclear translocator

VEGF: vascular epithelial growth factor

HIF-1: Hypoxie induzierbarer Faktor-1

**Hypoxie im Tumorgewebe**



Im Zuge des Tumorwachstums entsteht eine relative Gewebhypoxie. Über ein Hypoxie abhängiges Element wird die Expression von COX-2-mRNA gesteigert (Rozic et al. 2001). Dadurch wird vermehrt  $PGE_2$  aus Arachidonsäure konvertiert. Prostaglandin  $E_2$  induziert die Translokation des Hypoxie induzierbaren Faktors 1 (HIF-1) vom Zytosol in den Nukleus, wo nach Bindung der Alpha-Untereinheit von HIF-1 an einen Translokator (Arnt) die Transkription von VEGF induziert wird. Auch wenn die Mechanismen der Regulierung noch nicht bis ins letzte Detail verstanden sind, liefern sie doch Argumente für die erhöhte Expression der Cyclooxygenase-2 in Tumoren mit großem Volumen, höherem TNM-Stadium und hohem Differenzierungsgrad. In seinem Review unterstreicht Gasparini, dass eine antiangiogenetische Therapie im Focus aller spezifischen Behandlungsstrategien bei der Therapie von Brustkrebs stehen wird (Gasparini et al. 2005), eine Therapieoption, bei der mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Cyclooxygenase-2-Inhibitoren involviert sein werden.

### 5.3.3 Alter, Menopause und Parität

Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 50 Jahre waren, hatten im untersuchten Kollektiv häufiger einen COX-2-exprimierenden Tumor als ältere Patientinnen, ein Signifikanzniveau wurde aber nicht erreicht  $p = 0,207$  (Ergebnisse 4.4.7). Die Beobachtung stützt die Hypothese, dass Tumoren bei jungen Patientinnen häufig aggressiver sind und COX-2 in diesen Tumoren vermehrt exprimiert wird. Da der Schnittpunkt der gebildeten Alters-

gruppen annähernd mit dem Zeitpunkt der Menopause zusammenfällt, liegt die Vermutung nahe, dass die vermehrte COX-2-Expression bei jüngeren Frauen in der Prämenopause wieder zu finden ist. Bezieht man jedoch die COX-2-Expression in Abhängigkeit zur Menopause mit ein (Ergebnisse 4.4.8), ist kein Unterschied bei der Expression bei prä- und postmenopausalen Frauen zu finden ( $p = 0,37$ ). Die Hypothese der Beeinflussung der COX-2-Expression durch den allgemeinen Hormonlevel im Organismus ist demnach eher unwahrscheinlich, auf lokale Prozesse wird im folgenden Abschnitt noch eingegangen.

Betrachtet man die Expression der Cyclooxygenase-2 in Abhängigkeit von der Parität (Ergebnisse 4.4.9), so weisen Tumoren von Frauen, die keine Kinder geboren hatten, mit 38 % eine etwas höhere COX-2-Expression auf als die von Frauen mit Kindern ( $p = 0,37$ ). Die Anzahl der Geburten war dabei unerheblich (21 % und 20 %). Dass das Gebären ein Einflussnehmender Faktor bei der Entwicklung eines Mammakarzinoms und dessen Prognose ist, wird nicht untermauert, denn das betrachtete Merkmal Parität erlaubt keinen Rückschluss auf die Hormonspiegel im Brustdrüsengewebe. Vielmehr wäre interessant, ob und wie lange gestillt wurde und ob dahingehend ein Unterschied in der Inzidenz von Mammakarzinomen festzustellen ist. Auch in der Literatur fand sich keine Korrelation der Cyclooxygenase-2-Expression zu Alter (Ristimäki et al. 2002) und Prä-/bzw. Postmenopause oder Parität der Patientinnen.

### **5.3.4 Hormonabhängiges Tumorwachstum**

Wenn eine Wechselbeziehung zwischen der Östrogen- und der PGE<sub>2</sub>-Konzentration im Tumorgewebe besteht, so kann es zu der Annahme leiten, dass die Expression der Cyclooxygenase-2 bei Tumoren mit positiven Hormonrezeptoren häufiger zu beobachten ist. Brodies Beschreibung einer Korrelation zwischen der intratumoralen Aromatase und der COX-2 (Brodie et al. 2001) unterstützt die Theorie ebenso wie die von Smith, eine hohe lokale Östrogenkonzentration, wie sie in Tumoren von postmenopausalen Frauen zu finden ist (Yamaguchi et al. 2005), induziere eine vermehrte Expression des Progesteronrezeptors (Smith et al. 2003). An Zellkulturen konnte dosisabhängig die Aktivität der Aromatase und der Anteil an Aromatase mRNA durch selektive Inhibition der Cyclooxygenase-2 vermindert werden, was für eine Regulation auf Transkriptionsebene spricht (Brueggemeier et al. 2005). Dem gegenüber stehen die Beobachtungen einer erhöhten COX-2-Expression in östrogenunabhängigen Zelllinien oder Östrogen- und Progesteronrezeptor negativen Mammakarzinomen (Wulfing et al. 2003, Ristimäki et al. 2002). Oliviera wies sowohl an normalem Epithel, als auch an in situ und invasiv-duktalem Tumoren eine signifikante Korrelation zwischen COX-2 und Aromatase nach (Oliveira et al. 2006), andere Autoren konnten an humanen Tumoren die Assoziation zwischen COX-2 und Hormonrezeptoren nicht feststellen (Park et al. 2006, Singh-Ranger et al. 2005, Davies et al. 2003). In gesundem Brustgewebe wird die Expression der Aromatase durch den gewebespezifischen Promotor I.4, welcher verantwortlich für die Transkription ist, herbeigeführt. Im Tumor-

---

gewebe hingegen wechselt diese Aufgabe zu den Promotoren I.3 und PII, wodurch die Östrogensynthese im Gewebe ursprünglich über einen Glukokortikoid und Zytokin gesteuerten Haushalt nun via cAMP reguliert wird (Irahara et al. 2006). Da Prostaglandin PGE<sub>2</sub> via Cyclooxygenase intrazellulär den Anteil an cAMP erhöht, wird somit auch die Östrogensynthese stimuliert (Zhao et al. 1996). Irahara und Kollegen unterstützen diese Hypothese durch die Beobachtung einer vermehrten Transkription der Promotoren I.3, PII und I.7. im Gewebe von Mammakarzinomen und einem erhöhten Level von Aromatase mRNA (Irahara et al. 2005).

Der Unterschied zwischen der Häufigkeit der COX-2-Expression bei Östrogenrezeptor negativen und positiven Tumoren (Ergebnisse 4.4.10) ist im untersuchten Kollektiv nur marginal (20% bei negativem und 25% bei positivem Östrogenrezeptor,  $p = 1,0$ ), ein Ergebnis, dass sich mit denen von Park, Singh-Ranger und Davies deckt. Davies führte das Fehlen einer Korrelation, die er erwartete, auf die relativ kleine Fallzahl ( $n = 86$ ) zurück, die der unseren nahe kommt (Park et al. 2006, Singh-Ranger et al. 2005, Davies et al. 2003).

An Zelllinien von Myometrium und Mammakarzinom wurde gezeigt, dass Progesteron die Induktion der Cyclooxygenase-2 unterdrücken kann (Hardy et al. 2006). Bei der Betrachtung des Progesteronrezeptors A (Ergebnisse 4.4.11) kann man mit 7 % COX-2-Expression bei negativem versus 28 % bei positivem Hormonrezeptor eine Tendenz vermuten ( $p = 0,168$ ), ohne dass ein Signifikanzniveau erreicht wird. Nur Nakopulou beschreibt bei insgesamt hoher COX-2-Expression von 66,9 % eine signifikante Assoziation zwischen der Cyclooxygenase-2 und dem Progesteronrezeptor (Nakopoulou et al. 2005) während in den meisten Untersuchungen an humanen Tumoren keine Korrelation gefunden wurde.

Sind Antiöstrogene und Aromatase-Inhibitoren nur bei Tumoren wirksam, die einen Östrogenrezeptor besitzen und auf eine antihormonale Therapie ansprechen, wäre eine Hemmung der Cyclooxygenase-2 nicht nur hier auf Grund der Beeinflussung der Aromatase durch die Prostaglandinsynthese aussichtsreich, sondern auch gerade bei den Tumoren, die keine Hormonrezeptoren aufweisen, eine alternative Therapiemöglichkeit. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Cyclooxygenase-2 via PGE<sub>2</sub> nicht unerheblich an der Resistenzentwicklung von ER positiven Mammakarzinomen gegenüber Tamoxifen und in der Chemotherapie verwandten Retinoiden beteiligt ist (Tari et al. 2006), so dass eine Kombination mit einem Coxib eine mögliche positive Beeinflussung dieses Problems darstellen könnte. Die Kombination von Exemestan und Celecoxib an 50 Patientinnen mit Östrogenrezeptor positiven Tumoren lässt bei guter Verträglichkeit und über der Hälfte an vollständigen beziehungsweise partiellen Respondern auf eine viel versprechende Kombination schließen, die in weiteren Studien untersucht werden muss (Canney et al. 2006).

## 5.4 Zelllinien

Überraschender Weise ließen sich die untersuchten Targets an den aus Zelllinien generierten Tumoren alle moderat bis stark anfärben. Ein Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Expressionshäufigkeiten ist nur begrenzt möglich, da für die meisten Zelllinien keine Nachweise von COX-2- oder EGF-Rezeptoren und auch nicht in der Kombination beschrieben werden.

Eine Expression der Cyclooxygenase-2 ist für die Zelllinien MCF-7 (McFadden et al. 2006) wie auch MDA-MB-231 und in geringeren Mengen auch für MDA-MB-345 (Gilhooly et Rose 1999) beschrieben.

Die Zelllinie MDA-MB-435 exprimiert sowohl HER-1 als auch HER-2, wobei spezifische Inhibition *in vivo* zu einer verminderten Expression führte (Warburton et al. 2004).

Beschreibungen einer HER-2-Expression existieren auch für die Zelllinien 3366 und MCF-7, während die Rezeptoren HER-3 und HER-4 an den hier verwendeten Zelllinien nicht mit Ergebnissen aus der Literatur zu vergleichen sind. Mamma-Xenografts der ER positiven Zelllinien 3366 und MCF-7 reagieren auf Östradiol-Zusätze mit verstärktem Wachstum, wobei dies nicht nur in diesen, sondern auch in der ER negativen Zelllinie 4000 zu einer „Down-Regulation“ des HER-2-Proteins führte. Die Zugabe von Tamoxifen konnte diese Regulierung rückgängig machen (Naundorf et al. 1996).

Da die mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen und durchgeführten Blockierungsversuche die spezifische Anfärbung des jeweiligen Targets zeigten, ist eine unspezifische Färbung als Ursache für die 100 %ige Expression unwahrscheinlich. Vielmehr könnte die Expressionsrate damit erklärt werden, dass Tumoren, die mittels Zellinientransfektion in „Vehikeltieren“ – in diesem Falle Mäusen – entstanden, ein von humanen Tumoren abweichendes Rezeptorenmuster aufweisen. Darüber hinaus ist es möglich, dass sich bei der Passagierung der Zellkulturen Mutationen einzelner Rezeptorstrukturen ereignen und sich verschiedene Passagen der gleichen Zelllinie in ihrer Rezeptorstruktur unterscheiden (Hambly et al. 1997).

## 5.5. Methodenkritik

Immunhistochemische Verfahren gehören im klinischen Alltag für die Untersuchung von Intensität und Häufigkeit von Oberflächenmolekülen an Tumorgewebe zu den routinemäßig angewandten Methoden. Sie sind je nach gewählten Antikörpern spezifisch für die jeweiligen Epitope und bei standardisierten Protokollen oder gar vorgefertigten Kits eine gute Möglichkeit, Gewebe zu unterschiedlichen Zeiten und von verschiedenen Personen in der gleichen Qualität zu untersuchen. Leider existieren für die hier untersuchten Targets keine standardisierten Protokolle, so dass für jeden Antikörper erst eine optimale Verdünnung und Inkubationszeit, sowie eine geeignete Positivkontrolle gefunden werden musste. Dabei orientierten wir uns an den oben schon erwähnten Arbeiten von Half (Half et al. 2002), Ristimäki (Ristimäki et al. 2002) und Xia (Xia et al. 1999). Derselben Problematik unterliegt auch die Auswertung der immunhisto-

chemischen Präparate. Eine einheitliche Klassifizierung, wie sie bei der TNM-Klassifikation üblich ist, existiert nicht. Daher hielten wir uns an Scores, die in der Literatur, (siehe Methodenteil 3.9.2, Scoring) beschrieben wurden und versuchten den Fehler der individuellen Beurteilung am Mikroskop dadurch zu reduzieren, dass die Auswertung von mehreren Personen voneinander unabhängig vorgenommen wurde. Die Fallzahl ist mit insgesamt 79 Patientinnen in der retrospektiven Analyse recht gering, eine Fallzahlschätzung vorab wurde nicht durchgeführt, da sie für die umgrenzte Fragestellung nicht notwendig war. Als Grundlage für die Erhebung der Daten dienten die histologischen Berichte der Patientinnen, die im Zeitraum 1998 bis März 2002 in der Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, operiert wurden. Untersucht wurden nur Patientinnen, die an einem invasiv-duktalem Mammakarzinom mit dem HER-2-Status +3 oder 0 erkrankt waren. Präparate, auf die diese Einschlusskriterien zutrafen, die sich aber wegen ihres hohen Fettgehaltes bei den immunhistochemischen Färbungen wiederholt von den Objektträgern lösten, wurden ausgeschlossen.

Eine Aussage über den prädiktiven Wert der untersuchten Targets und Variablen zu treffen, wie im Falle des HER-2-Status dies auch von der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie empfohlen wird (AGO, Organkommission Mammakarzinom, 2006), ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Für die hierzu benötigten Überlebenszeitanalysen muss das untersuchte Kollektiv in 5 oder 10 Jahren nachuntersucht werden. So ist diese Arbeit im Sinne einer Momentaufnahme im Rahmen einer zukünftigen prospektiven Studie zu werten.

Bedauerlicher Weise haben wir keinen VEGF-Nachweis in dieser Untersuchung durchgeführt, so dass eine Aussage zur Vaskularisation der Tumoren in Korrelation zur Cyclooxygenase-2-Expression nicht möglich ist, doch ist dies nach unseren Kenntnissen die erste Arbeit, die sämtliche Rezeptoren der EGF-Familie mit der Expression der Cyclooxygenase-2 an invasiv-duktalem Mammakarzinomen vergleicht.

## **5.6 Nutzen und Risiken von Coxiben**

Die Diskussion um Nutzen und Risiken der Coxibe soll in dieser Arbeit nicht ausgeblendet werden: Bereits 2001 hat die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) auf das erhöhte Risiko von Myokardinfarkten unter Coxiben hingewiesen. Wie anfangs erläutert ist die endotheliale Prostaglandinsynthese COX-2-, die Thromboxansynthese COX-1-abhängig. Thromboxan wirkt vasokonstriktorisch und plättchenaggregationsfördernd, Prostaglandin vasodilatativ und auf die Plättchenaggregation hemmend. Prostaglandin und Thromboxan befinden sich in einem Gleichgewicht; herkömmliche NSAR verändern dieses nicht. Coxibe dagegen hemmen die Prostaglandinsynthese, ohne die Thromboxanproduktion zu beeinträchtigen. Das daraus resultierende prothrombotische Potential ist ein Klasseneffekt der Coxibe.

Im direkten Vergleich wurde bei Patienten über 65 Jahren das erhöhte kardiovaskuläre Risiko von Rofecoxib gegenüber Celecoxib, Meoxicam und COX-unselektiven NSAR bestätigt (Levesque et al. 2005). Im September 2004 wurde auf Grundlage der Ergebnisse der APPROVe-Studie Rofecoxib vom Markt genommen; in dieser Studie zur Kolonkarzinomprävention mit Rofecoxib 25 mg/die nahm ab dem 18. Behandlungsmonat die Häufigkeit schwerer thrombembolischer Ereignisse (Thrombosen, Myokardinfarkt, Angina pectoris, Apoplex, plötzlicher Herztod) gegenüber Placebo zu (nach 36 Monaten rel. Risiko 1,96) (Bresalier et al. 2005). Ein ähnliches Risiko wurde für Celecoxib in einer placebokontrollierten Studie zur Kolonkarzinomprävention gefunden, in der nach 3 Jahren 400–800 mg Celecoxib/die zu einer dosisabhängigen 2–3fach erhöhten Rate schwerer kardiovaskulärer Ereignisse führte. Interessanter Weise wurde in einer Parallel-Studie mit 400 mg Celecoxib/die kein solches Risiko festgestellt (Solomon et al. 2005).

Sicherlich ist die Indikationsstellung vor dem Hintergrund möglicher schwerer Nebenwirkungen streng zu stellen. Doch bei der Behandlung von Tumorerkrankungen ist die Risiko-Nutzen-Bewertung bei nachgewiesenem selektiven Wirkungsansatz zu berücksichtigen. Wenn es gelingt, einen Tumor selektiv mit synergistischen Therapieansätzen wirkungsvoll anzugehen, sind COX-2-Inhibitoren in der Reihe der möglichen Therapeutika für die Behandlung des Mammakarzinoms nicht auszuklammern und die routinemäßige Bestimmung der Cyclooxygenase-2 sinnvoll.

## 6. Zusammenfassung

Abschließend können folgende Aussagen getroffen werden:

- Im untersuchten Kollektiv invasiv-duktales Mammakarzinome wurde die Cyclooxygenase-2 in 19 Fällen (24 %) exprimiert.
- Dieser Anteil gliedert sich auf Grund der Heterogenität der Datenlage in den Häufigkeiten, wie sie von anderen Arbeitsgruppen gefunden wurden, ein.
- Alle Rezeptoren der EGF-Familie konnten immunhistochemisch nachgewiesen werden und auch in einer Häufigkeit, wie sie in der Literatur beschrieben ist. Tendenziell scheint eine Co-Expression der Cyclooxygenase-2 mit HER-1 zu existieren, eine Assoziation der Expression zu HER-2 ließ sich, wie auch bei Arbeiten von Half oder Costa (Half et al. 2002, Costa et al. 2002), nicht nachweisen.
- Eine Co-Expression von HER-3 oder HER-4 mit der Cyclooxygenase-2 lag nicht vor.
- Es ließen sich keine Abhängigkeiten hinsichtlich der Expression der COX-2 und verschiedenen klinopathologischen Variablen feststellen. Dennoch deuten sich einige Tendenzen an, die die eingangs formulierten Arbeitshypothesen unterstützen.

- Mit zunehmendem T-Stadium und Tumolvolumen weist eine größere Anzahl von Tumoren eine erhöhte Expression der Cyclooxygenase-2 auf. Bei nodal positiven Tumoren und noch deutlicher bei Tumoren mit Fernmetastasen, steigt die Expression der Cyclooxygenase-2 an.
- Da es im untersuchten Kollektiv nur einen GI-Tumor gab, der die Cyclooxygenase-2 exprimierte, ist eine statistische Aussage zur Expression der Cyclooxygenase-2 in Abhängigkeit vom Grading schwierig, doch scheint die COX-2 in gering differenzierten Tumoren häufiger vorzukommen.
- Alter, Parität und Menopause haben keinen Einfluss auf die Expression der Cyclooxygenase-2.
- Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression der Cyclooxygenase-2 in Östrogenrezeptor positiven oder negativen Tumoren. Tendenziell wird die Cyclooxygenase-2 in Tumoren mit positivem Progesteronrezeptor häufiger exprimiert.
- Resultate aus Experimenten mit Zelllinien lassen sich nicht problemlos mit den auf humanen Daten basierenden Ergebnissen vergleichen, selbst wenn die Zelllinien für die Xenografts aus Patientenmaterial gewonnen wurden. Die untersuchten Targets ließen sich zu 100 % in den untersuchten Zelllinien nachweisen.

Die Expression der Cyclooxygenase-2 spielt in invasiv-duktalem Mammakarzinomen wahrscheinlich eine zentrale Rolle in der Neoangiogenese im wachsenden Tumorgewebe.

Bei der Suche nach Therapiekonzepten gilt es in Erwägung zu ziehen, die Bestimmung der COX-2 in die Routine-Diagnostik mit aufzunehmen. Denn neben der Expression von Oberflächenmolekülen wie HER-2 besteht die Möglichkeit, durch Inhibition der COX-2 die Angiogenese des Tumors zu beeinflussen und somit einen weiteren selektiven Therapieansatz zur Verfügung zu haben. Unabhängig von der Expression sowohl von HER-2 als auch der Östrogen- und Progesteronrezeptoren wiesen knapp ein Viertel der Patientinnen mit einem invasiv-duktalem Mammakarzinom eine Expression der Cyclooxygenase-2 auf, so dass einer großen Untergruppe von Patientinnen ein möglicher Therapieansatz offen stünde.

Es bleibt in zukünftigen klinischen Studien zu klären, ob der Einsatz von selektiven Inhibitoren der Cyclooxygenase-2 zum Beispiel in Kombination mit einem VEGF-Inhibitor oder weiteren spezifischen Antagonisten Vorteile verspricht (Sledge et al. 2006, Wu et al. 2006).

---

## 7. ABKÜRZUNGEN

alk.	alkalische
AkdÄ	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
APPROVe	Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX
AR	Amphiregulin
Arnt	aromatic hydrocarbon nuclear translocator
BRCA	breast cancer gen
BTC	Betazellulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
99 % CI	95 % Konfidenzintervall
CD 31	Plättchen-Endothel Zell-Adhäsionsmolekül-1
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRE	Cyclisches Adenosinmonophosphat Response Element
dest.	destilliert
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ED	Erstdiagnose
EGF	epidermal growth factor
EMA	European Medicines Agency
EPR	Epiregulin
ER	Östrogenrezeptor
FCS	fetal calf serum
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
h	Stunde
HER	Human Epidermal Receptor
HIF-1	hypoxia inducible factor -1
HP-EGF	Herparin-bindender EGF
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
IRS	immunreaktiver Score
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAPK	MAP Kinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MaR	Mouse-anti-Rabbit (Maus-Anti-Kaninchen)
MDC	Max-Delbrück-Centrum
mg	Milligramm

---

ml	Milliliter
min	Minuten
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
neg	negativ
NOS	not otherwise specified
NRG	Neureguline
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OR	odds ratio
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC-ζ	Proteinkinase C-ζ
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PR	Progesteronrezeptor
Raf	bestimmtes G-Protein
RaM	Rabbit anti Mouse (Kaninchen-Anti-Maus)
Ras	bestimmtes G-Protein
RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
SPSS	Statistical Packages for Social Sciences
TGF-α	transforming growth factor-α
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminimethan
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VEGF	vascular epithelial growth factor
vs	versus
WHO	World Health Organisation

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Aarronson SA:** Growth factors and cancer. *Science*, 1991, 254 (5035): 1146–1153
- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al.:** Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 2004, 91 (8): 1532–1542
- Alimandi M, Wang LM, Bottaro D, et al.:** Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. *EMBO J.* 1997, 16: 5608–5617
- Anan K, Morisaki T, Katano M, et al.:** Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potent angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 1996, 119 (3): 333–339
- Antionou A, Pharoah PD, Narod S, et al.:** Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003, 72: 1117–1130
- Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO): State of the Art Version 2005, Langfassung,** Zuckschwerdt Verlag GmbH, München
- Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) Organkommission** Mammakarzinom. *www.ago-online.de* 2006
- Bacus SS, Zelnick CR, Plowman G:** Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers. *Am J Clin Pathol* 1994, 102 (Suppl 1): 13–S24
- Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, et al.:** Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005, 7 (4): 422–435
- Bazley LA, Gullick WJ:** The epidermal growth factor receptor family. *Endocrine-Related Cancer* 2005, 12 (1): 17–27
- Bianchi S, Palli D, Falchetti M, et al.:** ErbB-receptors expression and survival in breast carcinoma: a 15-year follow-up study. *J Cell Physiol* 2006, 206 (3): 702–708
- Brandt R, Ebert AD:** Growth inhibitors for mammary epithelial cells. *Prog Mol Subcell Biol* 1998, 20: 197–248
- Bresalier RS, Sandler RS, Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial Investigators:** Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005, 352 (11): 1092–1102

**Brodie A, Lu Q, Liu Y, et al.:** Preclinical studies using the intramural aromatase model for postmenopausal breast cancer. *Oncology* 1998, 12: 36–40

**Brodie AM, Lu Q, Fulton A, et al.:** Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001, 79: 41–47

**Brombardiier C, Laine L, Reicin A, VIGOR Study Group, et al.:** Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000, 343 (21): 1520–1528

**Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, et al.:** Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett* 1999, 140: 27–35

**Brueggemeier RW, DiazCruz ES, Li PK, et al.:** Translational studies on aromatase, cyclooxygenases, and enzyme inhibitors in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005, 95 (1-5): 129–136

**Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, et al.:** Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation* 2004, 110: 2053–2059

**Bundred NJ:** Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2001, 27: 137–142

**Canney PA, Machin MA, Curto J:** A feasibility study of the efficacy and tolerability of the combination of Exemestan with the COX-2 inhibitor Celecoxib in post-menopausal patients with advanced breast cancer. *Eur J Cancer* 2006, 42 (16): 251–2756

**Carpenter G, King L Jr, Cohen S:** Epidermal growth factor receptor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 1978, 276: 409–410

**Carter CL, Allen C, Henson DE:** Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989, 63 (1): 181–187

**Cejas P, Garcia-Cabezas MA, Casado E, et al.:** Localisation of COX-2 protein is different in breast ductal carcinoma and adjacent non-tumor ductal epithelium. *Clin Transl Oncol* 2005, 7(6): 239–243

**Chandrasekharan NV, Hu Dai, Roos LTK, et al.:** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 2002, 99: 13926–13931

**Chang S-H, Liu CH, Conway R, et al.:** Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in Cyclooxygenase-2 induced breast cancer progression. *PNAS* 2004, 101 (2): 591–596

- Cheng T, Cao W, Wen R, et al.:** Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1998, 39: 581–591
- Cho MH, Yoon JH, Jaegal YJ, et al.:** Expression of Cyclooxygenase-2 in breast carcinogenesis and its relation to HER-2/neu and p53 protein expression in invasive ductal carcinoma. *Breast* 2006, 15 (3): 390–398
- Chow LW, Loo WT, Wai CC, et al.:** Study of COX-2, Ki67, and p53 expression to predict effectiveness of 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide with Celecoxib treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 2005, 59 (2): 298–301
- Chung IB, Yelian FD, Zaher FM, et al.:** Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta* 2000, 21: 320–324
- Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, et al.:** Cyclo-oxygenase 2 is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2002, 55: 429–434
- Cotterchio M, Kreiger N, Sloan M, Steingart A:** Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001, 10: 1213–1217
- Culouscou JM, Plowman GD, Carlton GW, Green JM, Shoyab M:** Characterization of a breast cancer cell differentiation factor that specifically activates the HER4/p180erbB4 receptor. *J Biol Chem* 1993, 268 (25): 18407–18410
- Davies G, Martin L-A, Sacks N, Dowsett M:** Cyclooxygenase-2(COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Annals of Oncology* 2002, 13: 669–678
- Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, et al.:** Elevated Expression of COX-2. *Cancer* 2003, 97: 2978–2987
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V.:** Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau, Interdisziplinäre S3 Leitlinie 2006.
- Devchand PL, Wallace J:** Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defence. *Br J Pharmacol* 2005, 145: 275–282
- Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, et al.:** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase-2. *Nature* 1995, 378: 406–409
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN:** Up-regulation of Cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994, 107 (4): 1183–1188

**Eiermann W:** Internationale Konsensus-Konferenz St. Gallen „Primary Therapy for Early Breast Cancer“. *Onkologie* 2003, 1: 27–30

**Elston CW & Ellis IO:** Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer experience from large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19: 403–410

**EMA press release. European Medicines Agency. 2005**

<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/press/pr/24732305en.pdf>

**Ferrero-Poüs M, Hacène K, Bouchet C, Doussal Le V, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F:** Relationship between c-erbB-2 and Other Tumor Characteristics in Breast Cancer Prognosis. *Clinical Cancer Research* 2000, 6: 4745–4754

**Ferrero JM, Ramaioli A, Largillier R, et al.:** Epidermal growth factor receptor expression in 780 breast cancer patients: a reappraisal of the prognostic value based on an eight-year median follow-up. *Annals of Oncology* 2001, 12: 841–846

**Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, et al.:** Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: Analysis of 10.000 individuals. *J Clin Oncol* 2002, 20: 1480–1490

**Gasparini G, Longo R, Torino F, Morabito A:** Therapy of breast cancer with molecular targeting agents. *Annals of Oncology* 2005, 16 (4): iv 28–iv 36

**Gately S:** The contribution of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000, 19: 19–27

**Gee JM, Robertson JF, Gutteridge E, et al.:** Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signalling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocrine Related Cancer* 2005, 12 (1): 99–111

**Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (GEKID) und RKI, Krebs in Deutschland, 5. Auflage, Saarbrücken 2006**

**Giersiepen K, Heitmann C, Jahnsen K, Lange C:** Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 25 Brustkrebs, Robert-Koch-Institut, Berlin 2005

**Gilhooly EM, Rose DP:** The association between a mutated ras gene and Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 1999, 15 (2): 267–270

**Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, et al.:** Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2005, 16 (10): 1569–1583

**Goss P, Strasser K:** Aromatase Inhibitors in the Treatment and Prevention of Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2001, 19: 881–894

- Goulet JL, Pace AJ, Key ML, et al.:** E-prostanoid-3 receptors mediate the proinflammatory actions of prostaglandin E2 in acute cutaneous inflammation. *J Immunol* 2004, 173 (2): 1321–1326
- Gunnarsson C, Jansson A, Holmlund B, et al.:** Expression of COX-2 and steroid converting enzymes in breast cancer. *Oncol Rep* 2006, 16 (2): 219–224
- Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE:** ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997, 16: 1647–1655
- Gullick WJ, Bianco C, Normando N:** Growth factors and their receptors: a novel approach to the endocrinology of human breast cancer. *Women & Cancer* 1998, 1: 29–57
- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA:** Cyclooxygenase-2 Expression in Human Breast Cancers and Adjacent Ductal Carcinoma in Situ. *Cancer Research* 2002, 62: 1676–1681
- Hambly RJ, Double JA, Thompson MJ, Bibby MC:** Establishment and characterisation of new cell lines from human breast tumours initially established as tumour xenografts in NMRI nude mice. *Breast Cancer Res Treat* 1997, 43 (3): 247–258
- Hanahan D and Folkman J:** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during angiogenesis. *Cell* 1996, 86: 353–364
- Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, et al.:** Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. *MANUAL Mammakarzinome*. Tumorzentrum München 2001
- Hardy DB, Janowski BA, Corey DR, Mendelson CR:** Progesterone Receptor Plays a Major Antiinflammatory Role in Human Myometrial Cells by Antagonism of Nuclear Factor-[kappa] B Activation of Cyclooxygenase-2 Expression. *Mol Endocrinol* 2006, 20 (11): 2724–2733
- Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB:** Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiology* 1996, 7: 203–205
- Harris RE, Kasbari S, Farrar WB:** Prospective study of nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Oncol Rep* 1999, 6: 71–73
- Harris RE, Alshafie GA, Aboulssa H, Seibert K:** Chemoprevention of Breast Cancer in Rats by Celecoxib, a Cyclooxygenase 2 Inhibitor. *Cancer Research* 2000, 60: 2101–2103
- Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA:** Reduction in the risk of human breast cancer by selective Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer* 2006, 6: 27
- Hayes N, Howard-Cofield E, Gullick WJ:** Green fluorescent protein as a tool to study epidermal growth factor receptor function. *Cancer Letters* 2004, 206: 129–135

- Hemler M, Lands WEM, Smith WL:** Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem* 1976, 251: 5575–5579
- Henriksen KL, Rasmussen BB, Lykkesfeldt AE, Moller S, Ejlersen B, Mouridsen HT:** Semi-quantitative scoring of potentially predictive markers for endocrine treatment of breast cancer: A comparison between whole sections and tissue microassays. *J Clin Pathol* 2006, Epub
- Hershman HR:** Prostaglandin synthase-2. *Biochim Biophys acta* 1996, 1299: 125–140
- Homaei-Shandiz F, Ghavam-Nassiri MR, Sharifi N, et al.:** Evaluation of the relationship between human epidermal growth factor receptor-2/neu (c-erbB-2) amplification and pathologic grading in patients with breast cancer. *Saudi Med J* 2006, 27(12): 1810–1814
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg AJ:** Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2001, 8: 97–114
- Howe LR, Subbaramaiah K, Patel J, et al.:** Celecoxib, a selective Cyclooxygenase 2 Inhibitor, Protects against Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2)/neu-induced Breast Cancer. *Cancer* 2002, 62: 5405–5407
- Howe LR, Chang S-H, Tolle KC, et al.:** HER2/neu-Induced Mammary Tumorigenesis and Angiogenesis are Reduced in Cyclooxygenase-2 Knockout Mice. *Cancer Research* 2005, 65: 10113–10119
- Howell A, Cuzick J, Baum M, ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or on Combination) Trialists' Group:** Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or on Combination) trial after completion of 5 years adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005, 365: 60–62
- Hudelist G, Singer CF, Manavi M, Pischinger K, Kubista E, Czerwenka K:** Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerisation candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 80 (3): 353–361
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E:** Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Nat Cancer Inst (Bethesda)* 1998, 90: 455–460
- Hynes NE & Stern DF:** The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochemica and Biophysica Acta* 1994, 1198: 165–184
- Irahara N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S:** Quantitative analysis of aromatase mRNA expression derived from various promoters (I.4, I.3, PII and I.7) and its association of TNF- $\alpha$ , IL-6 and COX-2 in human breast cancer. *Cancer Cell Biology* 2005, Digital object identifier DOI 10.1002/ijc. 21562

**Jackisch C, Gerber B, Jonat W:** Aromatasehemmer in der adjuvanten Hormontherapie des Mammakarzinoms. *Frauenarzt* 2006, 47: 502–504

**Johnson CG, Goldman JP, Gullick WJ:** Stimulating complex intracellular processes using object-oriented computational modelling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2005, 86: 379–406

**Karmali RA, Welt S, Thaler HT, Lefevre F:** Prostaglandins in breast cancer: relationship to disease stage and hormone status. *Br J Cancer* 1983, 48: 689–696

**Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al.:** ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO Journal* 1996, 15: 254–264

**Kelly LM, Hill ADK, Kennedy S, et al.:** Lack of prognostic effect of cox-2 expression in primary cancer on short-term follow-up. *European Journal of Surgical Oncology* 2003, 29 (9): 707–710

**Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, et al.:** Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Circ Res* 1999, 96: 1240–1247

**Khazaie K, Schirmacher V, Lichtner RB:** EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1993, 12: 255–274

**Kiechle M, Böttcher B, Ditsch N, et al.:** Hereditäres Mammakarzinom. *MANUAL Mammakarzinome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, W. Zuckschwerdt Verlag München, 9. Auflage 2003

**King MC, Wieland S, Hale K, et al., National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project:** Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projekt (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA* 2001, 286: 2251–2256

**Kirkpatrick K, Ogunkolade W, Elkak A:** The mRNA expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer. *Curr Med Res Opin* 2002, 18: 237–241

**Knowlden JM, Gee, JM, Seery LT, et al.:** c-erbB-3 and c-erbB-4 expression is a feature of endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene* 1998, 17 (15): 1949–1957

**Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, et al.:** Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 2003, 144: 1032–1044

**Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA:** Isolation and characterisation of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for

overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Acad Sci USA* 1989, 86: 9193–9197

**Kundu N, Fulton AM:** Selective Cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 Inhibitors Control Metastatic Disease in a murine Model of Breast Cancer. *Cancer Research* 2002, 62: 2343–2346

**Langmann MJ, Jensen DM, Watson DJ, et al.:** Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *Journal of the American Medical Association* 1999, 282: 1929–1933

**Lanza-Jacoby S, Burd R, Rosato FE Jr, et al.:** Effect of simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor and Cyclooxygenase-2 in HER-2/neu-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12 (20 Pt1): 6161–6169

**Larkins TL, Nowell M, Singh S, Sanford GL:** Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer* 2006, 6: 181

**Leo C, Faber S, Hentschel B, Hockel M, Horn LC:** The status of cyclooxygenase-2 expression in ductal carcinoma in situ lesions and invasive breast cancer correlates to cyclooxygenase-2 expression in normal breast tissue. *Ann Diagn Pathol* 2006, 10 (6): 327–32

**Levesque LE, Brophy JM, Zhang B:** The risk for myocardial infarction with cyclooxygenase-2 inhibitors: a population study of elderly adults. *Ann Intern Med* 2005, 142: 481–489

**Lim H, Paria BC, Das SK, et al.:** Multiple female reproductive failures in Cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* 1997, 91: 197–208

**Liu CH, Chang SH, Narko K, et al.:** Overexpression of Cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001, 276: 18563–18569

**Lopez-Guerrero JA, Llombart-Cussac A, Noguera R, et al.:** HER2 amplification in recurrent breast cancer following breast-conserving therapy correlates with distant metastasis and poor survival. *Int J Cancer* 2006, 118 (7): 1743–1749

**Loftin CD, Trivedi DR, Tiano HF, et al.:** Failure of ductus arteriosus closure and remodelling in neonatal mice deficient in Cyclooxygenase-1 and -2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1059–1064

**Maekawa M, Sugano K, Sano H, et al.:** Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* 1998, 28 (7): 421–426

**Masferrer JL, Isakson PC, Seibert K:** Cyclooxygenase-2 inhibitors: a new class of anti-inflammatory agents that spare the gastrointestinal tract. *Gastroenterol Clin North Am* 1996, 25: 363–372

**Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al.:** Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Research* 2000, 60: 1306–1311

**Mc Carthy K, Buslin SA, Ogunkolade B, et al.:** Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) mRNA expression and hormone receptor status in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006, 32 (7): 707–709

**McFadden DW, Riggs DR, Jackson BJ, Cunningham C:** Additive effects of Cox-1 and Cox-2 inhibition on breast cancer in vitro. *Int J Oncol* 2006, 29 (4): 1019–1023

**Memon AA, Sorensen BS, Meldgaard P, Fokdal L, Thykjar T, Nexø E:** The relation between survival and expression of HER1 and HER2 depends on the expression of HER3 and HER4: a study in bladder cancer patients. *Br J Cancer* 2006, 94 (11): 1703–1709

**Metcalfe K, Lynch HT, Ghadirian P, et al.:** Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2004, 22: 2328–2335

**Miller KD:** The Role of ErbB inhibitors in Trastuzumab resistance. *The Oncologist* 2004, 9 (3): 16–19

**Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O:** Purification of the prostaglandin endoperoxidase synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 1976, 251: 2629–2636

**Nakopoulou L, Mylona E, Papadaki I, et al.:** Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a favorable prognostic phenotype in breast carcinoma. *Pathobiology* 2005, 72 (5): 241–249

**Naundorf H, Parczyk K, Zschiesche W, et al.:** Relation of oestradiol-mediated growth stimulation with the expression of c-erbB-2 protein in xenotransplanted oestradiol-receptor-positive and -negative breast carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996, 122 (1): 14–20

**Nicholson RI, Jones HE, Gee JMW:** EGFR inhibitors in breast cancer. *Signal* 2004, 5: 9–13

**Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al.:** Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002, 110: 775–787

**Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE:** The ErbB signalling network: receptor heterodimerisation in development and cancer. *EMBO Journal* 2000, 19: 3159–3167

**Oliveira VM, Piato S, Silva MA:** Correlation of cyclooxygenase-2 and aromatase immunohistochemical expression in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and adjacent normal epithelium. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 95 (3): 235–241

**Paetz JG, Jänne PA, Lee JC, et al.:** EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004, 304: 1497–1500

**Park K, Han S, Shin E, Kim HJ, Kim JY:** Cox-2 expression on tissue microarray of breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006, Jun 21, Epub ahead of print

**Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM:** Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer. *International Journal of Oncology* 1997, 10: 503–507

**Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, et al.:** Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 1746–1760

**Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A:** The epidermal growth factor receptor as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* 2001, 8: 11–31

**Rabausch K, Bretschneider E, Sarbia M, et al.:** Regulation of thrombomodulin expression in human vascular smooth muscle cells by COX-2 derived prostaglandins. *Circ Res* 2005, 96: 1–6

**Rahman MT, Masakazu T:** Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2003, 57: 463–470

**Rahme E, Ghosn J, Dasgupta K, Rajan R, Hudson M:** Association between frequent use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer. *BMC Cancer* 2005, 5: 159

**Rajkumar T, Gullick WJ:** A monoclonal antibody to the human c-erbB3 protein stimulates the anchorage-independent growth of breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 1994, 70: 459–465

**Rampaul RS, Pinder SE, Wencyk PM, et al.:** EGFR expression in operable breast cancer: is it of prognostic value? *Clinical Cancer Research* 2004, 10 (7): 2578

**Ranger GS, Jewell A, Thomas V, Mokbel K:** Elevated expression of cyclooxygenase-2 in breast cancer and ductal carcinoma in situ has no correlation with established prognostic markers. *J Surg Oncol* 2004, 88 (2): 100–103

**Richards J, Petrel TA, Brueggemeier RW:** Signalling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2002, 80: 203–212

**Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, et al.:** Prognostic Significance of Elevated Cyclooxygenase-2 Expression in Breast Cancer. *Cancer Research* 2002, 62: 632–635

**Robinson DR, Wu YM, Lin SF:** The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000, 19: 5548–5557

- Rocca B, Spain LM, Pure E, Langenbach R, Patrono C, Fitzgerald GA:** Distinct roles of Prostaglandin H synthases 1 and -2 in T-cell development. *J Clin Invest* 1999, 103: 1469–1477
- Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK:** Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer* 2001, 93: 497–506
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N:** Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol/Hematol* 1995 A, 19: 183–232
- Salomon DS, Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Shoyab M, Todaro GJ:** The role of amphiregulin in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995 B, 33: 103–114
- Sant M, Aareleid T, Berrinof F, et al. and the EUROCORE Working Group. EUROCORE.3:** survival of cancer patients diagnosed 1990–1994 – results and commentary, *Annals of Oncology* 2003, 14 (5): 61–118
- Sattler D, Kahlert S, Bischoff J, et al.:** Adjuvante Hormon- und Chemotherapie. MANUAL Mammakarzinome. Tumorzentrum München 2001
- Schmitz KJ, Callies R, Wohlschlaeger J, et al.:** Overexpression of cyclo-oxygenase-2 in an independent predictor of unfavourable outcome in node-negative breast cancer, but is not associated with protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (ERK1/2), p38 activation or with Her-2/neu signalling pathways. *J Clin Pathol* 2006, 59 (7): 685–691
- Schreinemachers DM, Everson RB:** Aspirin use and lung, colon and breast cancer. Incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994, 5: 138–146
- Seshadri R, McLeay WR, Horsfall DJ, McCaul K:** Prospective study of the prognostic significance of the epidermal growth factor receptor in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1996, 69 (1): 23–27
- Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA:** Nested case control study of the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. *Br J Cancer* 2000, 83: 112–120
- Shim JY, An HJ, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS:** Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. *Mod Pathol* 2003, 16 (12): 1199–1204
- Singh B, Berry JA, Vincent LE, Lucci A:** Involvement of IL-8 in COX-2 mediated bone metastases from breast cancer. *J Surg Res* 2006, 134 (1): 44–51
- Singh-Ranger G, Mokbel K:** Current concepts in cyclooxygenase inhibition in breast cancer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2002, 27: 321–327

- Singh-Ranger G, Jewell A, Thomas V, Mobkel K:** Elevated Expression of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer and Ductal Carcinoma In Situ has no Correlation with Established Prognostic Markers. *Journal of Surgical Oncology* 2005, 88: 100–103
- Slamon D, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL:** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, 235: 177–182
- Slamon D, Godolphin W, Jones LA:** Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989, 244: 707–712
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al.:** Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Eng J Med* 2001, 344: 783–792
- Sledge GW, Rugo HS, Burstein HJ:** The role of angiogenesis inhibition in the treatment of breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006, 21 (19): 1–12
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL:** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996, 271: 33157–33160
- Smith RA, Lea RA, Curran JE, Weinstein SR, Griffiths LR:** Expression of glucocorticoid and progesterone nuclear receptor genes in archival breast cancer tissue. *Breast Cancer Res* 2003, 5: 9–12
- Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA:** Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* 2005, 352: 1071–1080
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al.:** COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000, 89: 2637–2645
- Srinivasan R, Gillett CE, Barnes DM, Gullick WJ:** Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res* 2000, 60 (6): 1483–1487
- Statistisches Bundesamt Deutschland:** Statistik der häufigsten Diagnosen bei Frauen. Stand 18.10.2006: [www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.phpttan](http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.phpttan).
- Stein RA, Staros JV:** Insights into evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. *BMC Evol Biol* 2006, 6: 79
- Steinbach G, Lynch P, Phillips R, et al.:** The Effect of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familiar Adenomatous polyposis. *N Eng J Med* 2000, 342 (6): 1946–1952
- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ:** Increased expression of cyclooxygenase-2 in HER-2-overexpressing human breast cancer cells. NCI 1999, 7<sup>th</sup> SPORE Investigators Workshop

**Subbaramaiah K, Howe LR, Port ER, et al.:** HER-2/neu status is a determinant of mammary aromatase activity in vivo: evidence for a Cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Cancer Res* 2006, 66 (10): 5504–5511

**Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, et al.:** EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 have different effects on survival. *J Pathol* 2002, 196: 17–25

**Surowiak P, Materna V, Matowski R, et al.:** Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res* 2005, 7 (5): 862–870

**Tavassoli FA, Devilee P (eds):** Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. The World Health Organisation Classification of Tumours. IARC Press, Lyon 2003

**Tandon AK, Clark GM, Chamness GH, Ullrich A, Mc Gurie WL:** HER-2/neu oncogen protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1989, 7: 1120–1128

**Tari AM, Simeone AM, Li YJ, Gutierrez-Puente Y, Lai S, Symmans WF:** Cyclooxygenase-2 protein reduces tamoxifen and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide inhibitory effects in breast cancer cells. *Lab Invest* 2006, 85 (11): 1357–1367

**Tetu B, Brisson J:** Prognostic significance of HER-2/neu oncoprotein expression in node positive breast cancer: The influence of the pattern of immunostaining and adjuvant therapy. *Cancer* 1994, 73: 2359–2365

**Thun MJ, Henley SJ, Patrono C:** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002, 20 (94): 252–266

**Tortora G, Caputo R, Damiano V, et al.:** Combination of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with epidermal growth factor receptor tyrosin kinase inhibitor ZD1839 and protein kinase A antisense causes cooperative antitumor and antiangiogenic effect. *Clin Cancer Res* 2003, 9 (4): 1566–1572

**Travis A, Pinder SE, Robertson JF, et al.:** C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br J Cancer* 1996, 74: 229–233

**Tsutsui S, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Kinoshita J, Hachitanda Y:** Prognostic and Predictive Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Recurrent Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2002, 8: 3454–3460

**Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al.:** A hierachical network of inter-receptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/hereregulin isoforms. *J Bio Chem* 1996, 269: 25226–25233

**Ueno T, Chow LW, Toi M:** Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 2006, 60 (6): 277–279

**UICC:** TNM classification of malignant tumors. 6<sup>th</sup> edition. Wiley-Liss., New York 2002

**Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kumar R:** Regulation of Cyclooxygenase-2 pathway by HER2 Receptor. *Oncogene* 1999, 18: 305–314

**Veronesi U, Galimberti V, Zurrada S:** Prognostic significance of number and level of axillary nodal metastases in breast cancer. *Breast* 1993, 2: 224–228

**Verhoog LC, Brekelmans CTM, Seynaeve C, Meijers-Heijboer EJ:** Contralateral breast cancer risk is influenced by the age at onset in BRCA1-associated breast cancer. *Br J Cancer* 2000, 83: 384–386

**Wakeling AE:** Inhibitors of growth factor signalling. *Endocrine-Related Cancer* 2005, 12: 183–187

**Warburton C, Dragowska WH, Gelmon K, et al.:** Treatment of HER-2/neu overexpressing breast cancer xenograft models with Trastuzumab (Herceptin) and gefitinib (ZD1839): drug combination effects on tumor growth, HER-2/neu and epidermal growth factor receptor expression, and viable hypoxic cell fraction. *Clin Cancer Res* 2004, 10 (7): 2512–2524

**Watson DJ, Rhoades T, Guess HA:** All-cause mortality and vascular events among patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, or no arthritis in the UK General Practice Research Database. *J Rheumatol* 2003, 30: 1196–1202

**Whorthylake R, Poresko LK, Wiley HS:** ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 1999, 274: 8865–8874

**Wu KK:** Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiologic roles. *J Lab Clin Med* 1996, 128: 242–245

**Wu Y, Zhong Z, Huber J, et al.:** Anti-vascular endothelial growth factor receptor-1 antagonist antibody as a therapeutic agent for cancer. *Clin Cancer Res* 2006, 12 (21): 6573–6584

**Wulfing P, Diallo R, Muller C, et al.:** Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microassay analysis. *J Cancer Clin Oncol* 2003, 129 (7): 375–382

**Yamaguchi Y, Hiroyuki T, Suemasu K, et al.:** Tumor-Stromal Interaction through the Estrogen-Signaling Pathway in Human Breast Cancer. *Cancer Res* 2005, 65: 4653–4662

**Yarden Y, Schlessinger J:** Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 1987, 26: 1443–1451

**Yarden Y, Sliwkowski MX:** Untangling the ErbB signaling network. *Molecular Cell Biology* 2001, 2: 127–137

**Xia W, Lau Y-K, Zhang H-Z, et al.:** Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 Is a Stronger Predictor for the Outcome of Oral Squamous Cell Carcinoma than Any Individual Family Members. *Clinical Cancer Research* 1999, 5: 4164–4174

**Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL:** Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 2692–2696

**Xue C, Liang F, Mahmood R, et al.:** ErbB3-dependent motility and intravasation in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2006, 66 (3): 1418–1426

**Zhao Y, Agarwal V, Mendelson CR, Simpson ER:** Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE<sub>2</sub> via cyclic AMP leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 1996, 137: 5739–5742

**Zhou M, Felder S, Rubinstein M, et al.:** Real time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerisation model for receptor activation. *Biochemistry* 1993, 32: 8193–8198

## 9. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz im Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. phil. Dr. h.c. Andreas D. Ebert durchgeführt.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Ebert bedanken, dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe Einblicke in die klinisch relevante wissenschaftliche Forschung zu erhalten und diese Doktorarbeit anfertigen zu können.

Sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine persönliche Unterstützung mit Rat und Tat waren bei der Durchführung maßgeblich.

Herrn Prof. Dr. Harald Stein möchte ich für die Bereitstellung der Tumorböcke danken. Mein Dank gilt auch Frau Dr. sc. rer. nat. Induna Fichtner und Herrn Dr. rer. nat. Christian Nowak für die Bereitstellung der Proben des Tumorgewebes der Mäusetumoren sowie der Fotografie der tumortragenden Nacktmaus.

Ein besonderes Dankeschön gilt Dr. Günther Himmelmann. Er hat mich im intensiven Dialog und kritischer Hinterfragung in die Geheimnisse der Statistik eingeführt und mich bei der Datenauswertung begleitet.

Allen Mitgliedern des Teams von Professor Ebert im Campus Benjamin Franklin danke ich für ihr freundliches Entgegenkommen bei der Arbeit im Labor, für ihre Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Problemen und für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein Dankeschön richtet sich auch an Dr. Thomas Krämer, jetzt Universitätsklinikum Leipzig, Universitätsfrauenklinik, der sich geduldig um mich gekümmert hat und mir bei den Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen geholfen hat, sowie an Dr. Bernhard Heine, Oberarzt am Institut für Pathologie am Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die aufopferungsvolle Arbeit am Lichtmikroskop.

Ein besonderer Dank geht an meinen Freundeskreis, der alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit mitgetragen hat und an meine Eltern, die mich immer wieder ermutigt, gefördert und unterstützt haben.

## 10. LEBENS LAUF

**Name**                      **Julia Buchwald**

Aus Datenschutzgründen wird mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

---

## **ERKLÄRUNG**

„Ich, Julia Buchwald, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Co-Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der Rezeptoren der Epidermal Growth Factor (EGF)-Familie (HER-1, HER-2, HER-3, HER-4) in humanen invasiv-duktalem Mammakarzinomen sowie in Nacktmausmodellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 25.05.2007

Julia Buchwald

---