

Aus der Klinik für Frauenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die prognostische Relevanz von Proteinen des zellulären
Adhäsionsapparates beim invasiv duktalem Mammakarzinom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Ellen Mahnke
aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015



Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt.....	1
1.1. Abstrakt	1
1.2. Abstract	2
2. Einleitung	5
2.1. Allgemein.....	5
2.2. Gängige Prognosefaktoren beim Mammakarzinom.....	10
2.3. Phosphorylierung von Adhäsionsmolekülen	10
2.4. Adhäsionsstrukturen als neue Prognosefaktoren	11
2.5. Therapeutische Bedeutung.....	12
3. Zielsetzung.....	15
4. Patientinnen, Material und Methoden.....	17
4.1. Das Kollektiv.....	17
4.2. Färbung von Plakoglobin mit Hilfe der APAAP-Methode	18
4.2.1 Anfertigung der Gewebeschnitte	18
4.2.2 Entparaffinierung der Gewebeschnitte	18
4.2.3 Antigendemaskierung.....	18
4.2.4 Die Primärantikörper.....	19
4.2.5 Das Detektionssystem.....	19
4.2.6 Die Entwicklung.....	19
4.3. Immunhistochemische Färbung von Desmoglein 2 (Avidin-Biotin-Methode).20	
4.3.1 Die Streptavidin-Biotin-Methode (LAB-Methode).....	20
4.3.2 Das Biotin-Blocking-System	20
4.3.3 Der Primärantikörper	20
4.3.4 Der Sekundärantikörper	21
4.3.5 Der AP(Alkalische Phosphatase)-Komplex	21
4.4. Positiv- und Negativkontrollen	21
4.5. Untersuchungen an kultivierten Zellen	22
4.5.1 Zellkultur.....	22
4.5.2 Western Blots	23
4.5.3 Invasivität	24
4.6. Reagenzien und Puffer	25
4.7. Auswertung und statistische Analyse	26
5. Ergebnisse	33

5.1. Einzelanalysen	33
5.1.1 Der Lymphknotenstatus als Prognosekriterium	33
5.1.2 Die TumorgroÙe als Prognosekriterium	35
5.1.3 Das Grading als Prognosekriterium	36
5.1.4 Der Hormonrezeptorstatus als Prognosekriterium	38
5.1.5 Keratin 18 als Prognosekriterium	40
5.1.6 Her2/neu als Prognosekriterium	41
5.1.7 Plakoglobin als Prognosekriterium	42
5.1.7.1 Die Expression von Plakoglobin unter Beruicksichtigung aller Kompartimente	43
5.1.7.2 Die Expression von Plakoglobin an der Membran	44
5.1.7.3 Die Expression von Plakoglobin im Kern	46
5.1.7.4 Die Expression von Plakoglobin an Membran und im Zytoplasma	48
5.1.7.5 Die Expression von Plakoglobin an der Membran und im Kern	49
5.1.8 Desmoglein 2 als Prognosekriterium	51
5.1.8.1 Die Expression von Desmoglein 2 unter Beruicksichtigung aller Kompartimente	52
5.1.8.2 Die Expression von Desmoglein 2 unter Beruicksichtigung aller Kompartimente bis auf den Kern	53
5.1.8.3 Die Expression von Desmoglein 2 an der Membran	55
5.1.8.4 Die Expression von Desmoglein 2 im Zytoplasma	56
5.1.8.5 Die Expression von Desmoglein 2 im Kern	58
5.2. Kombinierte Analysen	59
5.2.1 Multivariate Analyse der Plakoglobinvariablen	59
5.2.2 Multivariate Analyse der Desmogleinvariablen	60
5.3. Univariate Analyse der Parameter	60
5.3.1 Analyse von Plakoglobin auf die untersuchten Parameter	60
5.3.2 Analyse von Desmoglein 2 auf die untersuchten Parameter	61
5.4. Expression von Plakoglobin in kultivierten Mammakarzinomzellen	61
6. Diskussion	63
7. Zusammenfassung	73
8. Literaturverzeichnis	77
9. Eidesstattliche Erklärung	86
10. Publikationen	87

11. Lebenslauf	88
12. Danksagung.....	89

1. Abstrakt

1.1. Abstrakt

Einleitung: Die Prognose beim Mammakarzinom wird weitgehend durch die Metastasierung bestimmt. Ein entscheidender Schritt hierbei ist die Ablösung der Tumorzelle aus ihrem epithelialen Verbund. Voraussetzung dafür ist eine Dedifferenzierung, ein Verlust von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen im Zuge einer EMT (epitheliale-mesenchymale Transition). Adhäsionsproteine sollten also gute Differenzierungsmarker und damit gute Prognosefaktoren sein.

Gut untersucht ist bereits E-Cadherin, das die Zell-Zell-Kontakte der Adherens Junctions aufbaut und einen validen Prognosefaktor darstellt. Weniger weiß man dagegen über die Eignung desmosomaler Komponenten. In diesem Projekt haben wir daher die prognostische Bedeutung der desmosomalen Adhäsionsproteine Desmoglein 2 sowie Plakoglobin untersucht. Letzteres ist von besonderem Interesse, da es als einziges Protein in beiden Adhäsionsstrukturen vorkommt.

Methodik: Retrospektiv wurde bei 96 Patientinnen mit primärem invasiv duktalem Mammakarzinom immunhistochemisch die Expression von Plakoglobin und Desmoglein 2 untersucht, diese mit dem Krankheitsverlauf korreliert und mit etablierten Prognosefaktoren verglichen. Ergänzend wurde bei 7 Mammakarzinom-Zelllinien die Expression von Plakoglobin per Western Blot bestimmt und mit ihrer Invasivität als Malignitätsmerkmal korreliert.

Ergebnis: Plakoglobin, dessen Expression in verschiedenen Zellkompartimenten bewertet wurde, erwies sich als valider und unabhängiger Prognosefaktor in Hinsicht auf das Gesamtüberleben ($p < 0,0002$ bis $p < 0,032$ je nach Kompartiment). Vor allem die Expression von Plakoglobin an der Membran und im Kern gemeinsam bzw. die Expression im Kern alleine zeigten sich als signifikante Prognosefaktoren. Die Signifikanz der klassischen Faktoren war deutlich schlechter. Bei den In-vitro-Experimenten korrelierte eine konservierte Plakoglobinexpression sehr eng mit einer geringen Invasivität der Zellen.

Auch Desmoglein 2, dessen Expression ebenfalls in verschiedenen Zellkompartimenten bewertet wurde, zeigte sich als valider und unabhängiger Prognosefaktor in Hinsicht auf das Gesamtüberleben ($p < 0,0001$ bis $p < 0,028$ je nach Kompartiment).

Schlussfolgerung: Plakoglobin und Desmoglein 2 zeigen sich in dieser Studie als valide und hoch signifikante Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben beim Mammakarzinom, die den etablierten Kriterien Nodalstatus, Tumorgröße und Grading überlegen sind.

Die prognostische Evidenz einer Lokalisation von Plakoglobin im Kern erklärt sich möglicherweise dadurch, dass das hoch homologe β -Catenin, ein Transkriptionsfaktor im malignen Wnt-Signaltransduktionsweg, von seinen genomischen Bindungsstellen kompetitiv verdrängt wird.

Insgesamt sollten die Ergebnisse in weiteren Untersuchungen überprüft und verifiziert werden. Eine prospektiv randomisierte Studie wäre erforderlich, damit den Anforderungen einer modernen evidenzbasierten Medizin Rechnung getragen wird.

1.2. Abstract

Background: Breast cancer prognosis is largely affected by spreading of malignant cells. A crucial step in metastasis is the dissociation of cancer cells from the epithelial network. The loss of cellular adhesion proteins in the course of an EMT (epithelial-mesenchymal-transition) is a prerequisite in this context. Thereof, adhesion proteins can be considered as reliable markers in differentiation and prognosis.

Well studied is the value of E-cadherin, the functional protein of the adherens junctions, as a prognostic factor. In contrast very little is known about desmoglein 2 and plakoglobin, two adhesion proteins of the desmosomes. Plakoglobin is of particular interest as it is the sole protein present in both adhesion structures.

Methods: In a retrospective study on 96 patients with invasive ductal breast carcinoma the expressions of plakoglobin and desmoglein 2 was determined immunohistochemically. The results were correlated with the outcome of the patients and compared with established prognostic markers. Furthermore, the plakoglobin expression was detected in 7 human breast cancer cell lines and correlated with the invasiveness of the malignant cells.

Results: The expression of plakoglobin was evaluated in three different cell compartments and turned out to be a valid and independent prognostic marker for the overall survival ($p < 0.0002$ to $p < 0.032$). The combined expression of plakoglobin in the membrane and the nucleus as well as the expression in the nucleus alone disclosed the

highest prognostic impacts. The statistical significance of the classical prognostic markers was considerably lower. The in-vitro-experiments revealed a close correlation of high plakoglobin expression with low invasiveness of the malignant cells.

The expression of desmoglein 2 was equally evaluated and also found to be a valid and independent prognostic marker for the overall survival ($p < 0.0001$ to $p < 0.028$ for the different compartments tested).

Conclusions: In this retrospective study on invasive ductal carcinoma of the breast, plakoglobin and desmoglein 2 turned out to be reliable prognostic markers for the overall survival of the patients. The significance was superior to established factors like grading, tumor size or nodal status.

The prognostic relevance of plakoglobin might be explained by a competitive displacement of beta-catenin, a malignant transcription factor in the wnt-signaling pathway.

Although these results are impressive, they should be verified by a prospective, randomized study.

2. Einleitung

2.1. Allgemein

Entscheidend für die Prognose des Mammakarzinoms ist das Metastasierungs- bzw. Rezidivrisiko des Primärtumors. Wesentlich für die maligne Transformation ist der Verlust von zellulärer Differenzierung. Zahlreiche strukturelle Veränderungen ermöglichen es, dass die Tumorzelle sich aus dem Primärtumor lösen kann und es zur Metastasierung kommt. Dabei spielen Veränderungen des Zytoskeletts und der Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle^{1,2,3,4,5}. Solange der Adhäsionsapparat intakt ist, kann die maligne Zelle den epithelialen Gewebeverband nicht verlassen⁶.

Zelluläre Adhäsion wird im Brustdrüsenepithel v.a. durch zwei Strukturen erbracht: die Adherens Junctions und die Desmosomen. Sie sind die beiden wichtigsten epithelialen Strukturen für einen intakten Zellverband^{1,7}.

Beide sind ähnlich aufgebaut: Cadherine als Transmembranproteine vermitteln den direkten Zell-Zell-Kontakt; im Zellinneren sind sie mit mehreren Proteinen assoziiert, die ihrerseits mit dem Zytoskelett eng verbunden sind, wobei die Aktinfilamente des Zytoskeletts über Catenine an den Adherens Junctions verankert sind, die Intermediärfilamente des Zytoskeletts über Catenine an den Desmosomen.

Die Adherens Junctions der Epithelien, auch Cadherin-Catenin-Komplex genannt, bestehen aus dem klassischen membranständigen E(epithelial)-Cadherin einer Zelle, welches als Transmembran-Glykoprotein kalziumabhängig über seine extrazelluläre Domäne an die extrazelluläre Domäne des E-Cadherins einer benachbarten Zelle bindet und somit den Kontakt zwischen Nachbarzellen bewirkt⁸.

Die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin stellt die Verbindung zu den zytoplasmatischen Proteinen, den Cateninen, her. Dabei bindet E-Cadherin direkt an β - oder γ -catenin (=Plakoglobin), welche wiederum an α -Catenin binden. α -Catenin stellt seinerseits die Verbindung zu den Aktinfilamenten des Zytoskeletts her.

Somit verbindet E-Cadherin benachbarte Zellen mit- und untereinander^{9,10,11,12,13, 14,15} (**Abb. 1**).

Nur über die intakte Verbindung der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin zu den Cateninen ist die adäquate E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion über die externe Domäne von E-Cadherin gesichert^{16,17,18}.

Die Rolle von E-Cadherin als Adhäsionsprotein der Adherens Junctions im Epithelgewebe ist schon gut untersucht.

Es ist ein bedeutendes Strukturprotein zur Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten. Ein direkter Zusammenhang zwischen invasivem Tumorwachstum und gestörter E-Cadherin vermittelter Zell-Zell-Adhäsion ist auch im Mammakarzinom nachgewiesen^{12,19,20,21,22,23}.

Es konnte tatsächlich gezeigt werden, dass eine normale Expression im Tumor mit einer guten Prognose korreliert. Ein Verlust von membranständiger E-Cadherin-Expression ist mit einem erhöhten Metastasierungspotential und verschlechtertem Gesamtüberleben vergesellschaftet^{37,24}.

Daher wird E-Cadherin eine Tumorsuppressorfunktion zugeschrieben^{7,25,26}.

Als Strukturprotein ist es für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich. Gleichzeitig ist das E-Cadherin-System Bestandteil zellulärer Signaltransduktionswege, die sowohl Proliferation als auch Dedifferenzierung von Epithelien beeinflussen: Ungebundenes β -Catenin wird, wenn der Wnt-Signalweg (Wnt= wingless + Int-1) in der Zelle aktiviert ist, in den Zellkern transloziert, wo es für die Transkription von Genen des Zellwachstums und der Dedifferenzierung verantwortlich ist. In den Adherens Junctions übernimmt an E-Cadherin gebundenes β -Catenin eine Funktion in der Zelladhäsion. Es kann nicht in den Zellkern gelangen und wird so der Signaltransduktion entzogen. Während der Tumorentstehung ist die Regulation des Signalweges durch E-Cadherin gestört, da durch den Verlust von E-Cadherin vermehrt freies β -Catenin vorliegt, welches in den Zellkern transloziert werden kann^{27,28,29}.

Desmosomen kommen in allen Epithelien sowie im Herzmuskel, den Meningen und der Epidermis vor, also in Geweben mit hohen mechanischen Anforderungen, und sind aus einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen aufgebaut, die in ihrer Gesamtheit den funktionellen Komplex des Desmosoms bilden. Dabei sind zwei Hauptgruppen von Proteinen beteiligt:

1. Die sogenannten desmosomalen Cadherine, Transmembran-Glykoproteine, die kalziumabhängig wesentlich zur Haftung zwischen den Zellen beitragen, sind

Mitglieder einer gemeinsamen Genfamilie, die als Unterfamilien die Desmogleine (Dsg 1-3) sowie die Desmocolline (Dsc 1-3) der Desmosomen umfassen³⁰. Von den klassischen Cadherinen, wie E-Cadherin, unterscheiden sich die desmosomalen Cadherine v.a. durch den unterschiedlichen Aufbau der zytoplasmatischen Domäne³¹. Das meist verbreitete desmosomale Cadherin ist Desmoglein 2. Es kommt in allen Geweben und Zellen, in denen Desmosomen vorhanden sind, vor. Als Transmembran-Glykoproteine verbinden die desmosomalen Cadherine kalziumabhängig über ihre extrazellulären Domänen benachbarte Zellen miteinander. Über ihre intrazellulären Domänen binden sie über desmosomale Proteine, wie Plakoglobin (γ -Catenin) und Plakophiline, über Desmoplakin an die Intermediärfilamente des Zytoskeletts. Wie E-Cadherin verbinden sie somit benachbarte Zellen mit- und untereinander^{1,31,32,33}.

2. Die Plaque-Proteine, die eine dichte Matte an der Binnenseite der Desmosomen-Membran bilden, vermitteln u.a. die Verbindungen zwischen der Zellmembran und den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts wie beispielsweise Keratin 18³⁴. Sie stabilisieren so den Gewebeverband vom Zytoskelett über die Verankerung an der desmosomalen Plaque und über die Cadherin-Zellverbindungen zu den Nachbarzellen. Zu den desmosomalen Plaque-Proteinen gehören neben Plakoglobin (γ -Catenin) auch die Desmoplakine I und II sowie die Plakophiline 1 und 2³⁵. Dabei bindet die zytoplasmatische Domäne des desmosomalen Cadherins Desmoglein 2 mit hoher Affinität an das Plaqueprotein Plakoglobin^{1,36,37} (**Abb. 1**).

Garrod et al. zeigten, dass wenigstens Desmocollin, Desmoglein und Plakoglobin als Komponenten vorhanden sein müssen, um überhaupt desmosomale Adhäsion zu bewirken³⁸.

Über die Rolle der desmosomalen Cadherine weiß man bisher wenig beim invasiv duktalem Mammakarzinom. Speziell über die Rolle von Desmoglein 2 wurden bisher keine Daten publiziert.

Desmoglein 2 ist das größte und wichtigste desmosomale Cadherin³². Es wird in allen Epithelien exprimiert und ist wie E-Cadherin ein Strukturprotein^{32,34}. Zusammen mit E-Cadherin sichern die desmosomalen Cadherine die epitheliale Integrität. Bleiben sie bei

der malignen Transformation erhalten, so wird eine Metastasierung der Tumorzelle verhindert und die Prognose für die Patientin entscheidend verbessert.

Über die Bedeutung des Verlustes des desmosomalen Cadherins Desmoglein 2 beim invasiven Mammakarzinom ist bisher nichts bekannt. In Transfektionsexperimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von Desmoglein 2 die Invasivität maligner Zellen drastisch reduziert³⁹.

In einer Studie über das squamöse Ösophaguskarzinom zeigte das Karzinomgewebe einen deutlichen Verlust der Normalverteilung von Desmoglein 2 und es wurde ein Zusammenhang zwischen diesem Expressionsverlust und dem damit einhergehenden Verlust der interzellulären Adhäsion und auftretender Metastasierung vermutet⁴⁰.

Eine andere Studie zeigt eine anormale Desmoglein 2-Expression beim Magenkarzinom und vermutet einen Zusammenhang zwischen dem Verlust dieses desmosomalen Cadherins und der Zunahme der Tumoraggressivität⁴¹.

Weiterhin wird eine Genmutation des Desmoglein 2 als ursächlich für die Entstehung einer Colitis ulcerosa vermutet⁴².

Als strukturierendes Protein ist vor allem Plakoglobin (γ -Catenin) von zentralem Interesse, da es als einziges Protein in beiden Adhäsionsstrukturen vorkommt^{1,33,37,43,44,45,46,47,48}. Hieraus lassen sich auch die beiden unterschiedlichen Bezeichnungen für dasselbe Protein herleiten: In der Desmosomen-Forschung wird der Begriff Plakoglobin, in der Adherens Junctions-Forschung der Begriff γ -Catenin verwendet.

Einem erhaltenen Expressionsmuster von Plakoglobin wird eine Unterdrückung des Metastasierungsverhaltens von Tumorzellen zugeschrieben. Navarro et al. beschreiben, dass ein Defekt von Plakoglobin mit einer gestörten Aktivität des E-Cadherin-Catenin-Komplexes einhergeht⁴⁹.

Eine verminderte Expression für Plakoglobin ist sowohl in humanem Brustkrebsgewebe, beim Ovarialkarzinom, beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, bei malignen Magen-Darm-Tumoren, Ösophaguskarzinom, Blasenkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Pankreaskarzinom und Prostatakarzinom beschrieben^{5,31,48,50,51,52,53,54,55,56,57}.

Ein Zusammenhang mit einem erhöhten Metastasenrisiko bzw. verkürztem Gesamtüberleben konnte dort beschrieben werden⁵⁸.

In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von Plakoglobin die Invasivität maligner Zellen drastisch reduziert⁵⁹.

Von im Zellkern lokalisiertem Plakoglobin wird berichtet, dass es die Tumoraggressivität unterdrückt⁵⁹. Cho et al.⁵¹ beschreiben beim Ovarialkarzinom jedoch, dass nukleäres Plakoglobin mit Tumorprogression und höheren FIGO-Stadien korreliert ist. Pirinen⁶⁰ hingegen findet beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom keinen Einfluss von nukleärem Plakoglobin auf das Gesamtüberleben.

Nicht nur intakte Desmosomen, auch ihre intrazellulären Bindungspartner, die Intermediärfilamente, haben Einfluss auf die Malignität eines Karzinoms. Je nach Art dieser Filamente ist die Zelle unterschiedlich verformbar, was Einfluss auf ihre Fähigkeit nimmt, bei der Metastasierung Gewebeschränken zu durchdringen. Insbesondere das Intermediärfilament K18 ist schon vielfältig untersucht und es hat sich gezeigt, dass eine starke Expression von K18 u.a. in invasiv duktalem Mammakarzinomen unabhängig vom Tumorstadium sowie histologischem Grad sowohl mit einer besseren Prognose als auch Metastasenfreiheit einhergeht⁶¹.

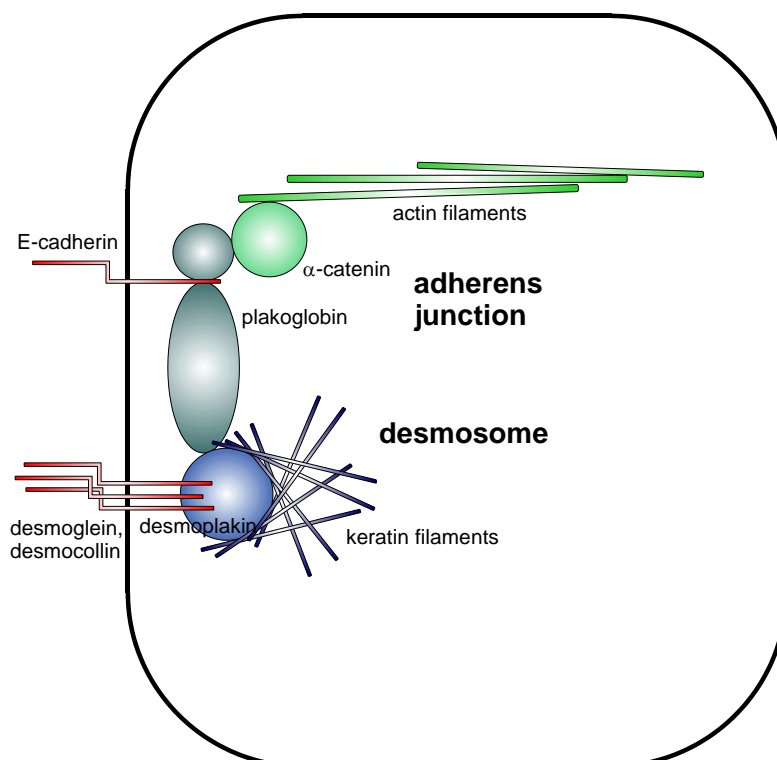


Abb. 1: Schematische Darstellung der beiden Adhärenzstrukturen Adhärenz Junctions und Desmosomen und ihrer Verankerung in die Filamente des Zytoskeletts.

2.2. Gängige Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Das Mammakarzinom metastasiert lymphogen in die regionären Lymphknoten wie die der Axilla. Werden regionär befallene Lymphknoten nachgewiesen, ist davon auszugehen, dass bereits eine hämatogene Metastasierung stattgefunden hat, welche das Skelettsystem, die Pleura, Lungen, Leber und Gehirn betreffen kann. Diese Metastasen können über Jahrzehnte klinisch stumm bleiben, beim Mammakarzinom insbesondere Mikrometastasen, die ins Knochenmark abgesiedelt wurden.

Die Prognose des Mammakarzinoms und seine Metastasierungswahrscheinlichkeit hängen von zahlreichen Faktoren ab.

Als gängige Prognosefaktoren gelten der Lymphknotenbefall, die Tumorgöße, das Grading, der Steroidhormonrezeptorstatus, der Her2/neu-Status (s.u.), die Blut- sowie Lymphgefäßinvasion. Dabei verschlechtert sich die Überlebenschance bzw. erhöht sich das Metastasierungsrisiko bei fortgeschrittenem Lymphknotenbefall, zunehmender Größe des Primärtumors, histologisch gering differenzierten Tumoren, stattgehabter Blut- bzw. Lymphgefäßinvasion sowie einem positiven Her2/neu-Status, wobei den wichtigsten Faktor das Ausmaß des Lymphknotenbefalls darstellt⁶².

Patientinnen mit einem positiven Steroidhormonrezeptorstatus profitieren von einer Hormontherapie und haben dadurch eine bessere Prognose. Seine prognostische Bedeutung für die Überlebenszeit ist allerdings geringer als die des TNM-Status (Tumour Nodes Metastasis-Status (Klassifizierungssystem bösartiger Tumoren))^{63,64}.

2.3. Phosphorylierung von Adhäsionsmolekülen

Wie eine Regulierung der Zell-Zell-Adhäsion sowohl in den Adherens Junctions als auch in den Desmosomen bei der Metastasierung von Tumorgewebe erfolgt, ist immer noch nicht ausreichend geklärt.

Bedeutung wird dem Wechselspiel zwischen EGF(epithelial growth factor)-induzierter Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase bzw. Dephosphorylierung durch die Tyrosinphosphatase zugeschrieben¹.

Beschrieben ist ein Verlust von Zell-Zell-Kontakten durch EGFR(epithelial growth factor receptor)-induzierte Tyrosinphosphorylierung sowohl von Desmoglein 2 als auch von E-Cadherin⁶⁵.

EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Cateninen wurde in Studien verschiedenster epithelialer Tumoren, wie auch dem Mammakarzinom, beschrieben^{66,67,68,69}.

Beschrieben ist ein Verlust von Zell-Zell-Kontakten nach Tyrosinphosphorylierung an Plakoglobin durch EGFR, wobei sich die Bindung an Desmoglein 2 erhalten zeigte, die zu Desmoplakin, und damit zum Zytoskelett, allerdings unterbunden wurde. Green et al. vermuteten hier einen ersten Schritt hin zum Metastasierungsverhalten einer Tumorzelle^{12,38,70,71,72,73}.

Garrod et al.⁷⁴ beobachten dementsprechend jedoch eine Zunahme der Zelladhäsionsstärke von Desmosomen nach EGF-induzierter Tyrosinphosphorylierung von Desmoglein 2 und Plakoglobin.

Moon et al. beschreiben ein Ausstreuen von E-Cadherin-positiven Zervixkarzinom-Zellen als Resultat einer EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung von β - und γ -Catenin. Hier scheint also die Phosphorylierung von β - und/oder γ -Catenin die Adhäsionsfunktion von E-Cadherin zu behindern⁷⁵.

Für ein weiteres Mitglied der EGF-Rezeptorfamilie, c-erb-B2 (Her2/neu), ein Onkogen, welches starke Homologie zum EGFR besitzt sowie konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität ohne Ligandenbindung, ist eine Schädigung der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte beschrieben durch Phosphorylierung von β -Catenin^{76,77,78}.

Auch wenn die Phosphorylierung von Adhäsionsstrukturen die Zell-Zell-Adhäsion beeinflusst, ist immer noch nicht sicher geklärt, welche Rolle sie im Metastasierungsverhalten von Zellen spielt.

Es muss noch genauer verstanden werden wie Adhäsionsstrukturen durch EGFR-induzierte Phosphorylierung verändert werden. Gegebenenfalls könnten sich hieraus therapeutische Optionen in der Behandlung von Karzinomen ergeben.

2.4. Adhäsionsstrukturen als neue Prognosefaktoren

Adhäsionsproteine spielen offensichtlich eine wichtige Rolle im metastatischen Geschehen und scheinen daher gut geeignet als neue prognostische und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom.

Das Intermediärfilament K18 zeigte sich bereits in unserer Arbeitsgruppe^{61,85} beim Mammakarzinom als ein unabhängiger und signifikanter Prognosefaktor sowohl für das metastasenfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben⁶¹.

Das Verständnis für die invasiven sowie metastatischen Neigungen eines Tumors ist von großer Bedeutung, da es hilfreich ist bei der Wahl der Therapie, die bei unklarer Prognose durchgeführt werden sollte.

Das vermehrte Wissen um biologische Vorgänge führt nicht nur dazu, dass jeder Tumor individuell klassifiziert werden kann und gezielte Wirkstoffe entwickelt werden. Es können auch Faktoren identifiziert werden, die eine Prädiktion ermöglichen, welche Therapie bei welchen Patienten nötig oder wirksam ist.

Zu diesen Markern zählt auch der Prognosefaktor uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) und dessen Gegenspieler PAI-1 (Plasminogen Aktivator-Inhibitor). In Studien konnte belegt werden, dass bei Brustkrebs-Patientinnen im Frühstadium, bei denen keine Lymphknoten befallen sind, ein niedriger uPA/PAI-1-Anteil im Tumorgewebe ein zuverlässiger Prognosefaktor für ein niedriges Rückfallrisiko ist. `Diesen Patientinnen – in Studien immerhin mehr als ein Drittel aller Betroffenen – kann eine begleitende Chemotherapie erspart bleiben, ohne ihr Risiko, erneut zu erkranken, zu erhöhen`⁷⁹.

Die ideale Therapie sollte auf den individuellen Tumor zugeschnitten sein.

Eine adjuvante Therapie kann für Brustkrebspatientinnen eine therapeutische Chance bedeuten. Der Mehrzahl der Frauen mutet man durch eine adjuvante Chemotherapie allerdings eine Übertherapie mit beträchtlichen Nebenwirkungen bei hohen Kosten zu. Daher werden neue Parameter dringend benötigt, die einerseits genaue Informationen über das individuelle Tumorverhalten geben und andererseits die molekularbiologischen Gesetzmäßigkeiten der Krankheit besser verständlich machen.

Molekulare Biomarker könnten das Potential eines Tumors zur Invasion und Metastasierung aufzeigen und somit Patienten, die eine Therapie benötigen, identifizieren und solche, bei denen kein Metastasierungsrisiko besteht, aussparen⁸⁰.

2.5. Therapeutische Bedeutung

Für das Intermediärfilament K18 ist bekannt, dass seine Expression in invasiv duktalem Mammakarzinomen unabhängig vom Tumorstadium sowie histologischem Grad sowohl mit einer verbesserten Überlebenswahrscheinlichkeit als auch Metastasenfreiheit einhergeht⁶¹. Mit diesem Wissen wurde der Versuch unternommen, das K18-Gen in

aggressive Mammakarzinomzellen zu transfizieren. Dabei nahm die Aggressivität des Gewebes mit der Zunahme der K18-Synthese in diesen Zellen ab. Auch zeigte sich mit zunehmender K18-Synthese eine Hochregulierung von Plakoglobin und E-Cadherin⁸¹. Dieses redifferenzierende Potential von K18, das anscheinend die Metastasierung behindert, könnte also zur therapeutischen Behandlung genutzt werden. Dabei gibt es Überlegungen, das K18-Gen an einen für Mammakarzinomzellen spezifischen Antikörper zu binden.

Der therapeutische Antikörper Trastuzumab (Herceptin), der sich gegen den Her2/neu-Rezeptor richtet, könnte ein Transporter sein, um den Transfer des K18-Gens in die Tumorzellen zu vermitteln⁸².

Auch für Plakoglobin sowie Desmoglein 2 zeigt sich eine deutlich verringerte Tumoraggressivität, wenn ihre Expression in der Karzinomzelle erhalten ist. Hier könnte vielleicht eine ähnliche therapeutische Behandlung erfolgversprechend sein^{5,48-57}.



3. Zielsetzung

Entscheidend für die Prognose des Mammakarzinoms ist das Metastasierungs- bzw. Rezidivrisiko des Primärtumors. Wesentlich für die maligne Transformation ist der Verlust von zellulärer Differenzierung. Zahlreiche strukturelle Veränderungen ermöglichen es, dass die Tumorzelle sich aus dem Primärtumor lösen kann und es zur Metastasierung kommt². Dabei spielen Veränderungen des Zytoskeletts und der Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle^{3,4,5,1}.

Solange der Adhäsionsapparat intakt ist, kann die maligne Zelle den epithelialen Gewebeverband nicht verlassen⁶.

Es steht also zu erwarten, dass die Expression von Adhäsionsproteinen im Primärtumor mit der Prognose der Patientin korreliert.

Der überwiegende Teil der zellulären Adhäsion im Mammaepithel wird durch zwei Strukturen erbracht: die Adherens Junctions und die Desmosomen. Beide sind ähnlich aufgebaut: Cadherine als Transmembranproteine vermitteln den direkten Zell-Zell-Kontakt ; im Zellinneren sind sie mit mehreren Proteinen assoziiert, die ihrerseits an das Zytoskelett binden.

E-Cadherin, das Cadherin der Adherens Junctions, ist schon gut untersucht. Hier konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass eine hohe Expression im Tumor mit einer guten Prognose korreliert.

Über die Rolle der desmosomalen Cadherine wie beispielsweise Desmoglein 2 weiß man dagegen wenig.

Vor allem Plakoglobin (γ -Catenin) ist von zentralem Interesse, da es als einziges Protein in beiden Adhäsionsstrukturen vorkommt.

Für Plakoglobin wurde in einigen Studien ein Zusammenhang zwischen seiner Expression und dem Metastasierungsverhalten von Tumorzellen des invasiven Mammakarzinoms sowie anderer epithelialer invasiver Tumoren vermutet: dabei scheint ein Expressionsverlust von Plakoglobin mit einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit und verkürztem Gesamtüberleben einherzugehen sowie vice versa^{48-57,58}.

Aus genannten Gründen scheint der Einfluss von Adhäsionsproteinen auf die Metastasierung und damit den Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom von besonderem Interesse:

- In einer retrospektiven Studie soll an invasiv duktalem Mammakarzinom-Präparaten immunhistochemisch die Expression von Plakoglobin und Desmoglein 2 untersucht werden. Die Expression dieser Proteine soll mit dem Krankheitsverlauf korreliert und so ihre Wertigkeit als Prognosefaktoren ermittelt werden.
- Weiterhin sollen die potentiellen Prognosefaktoren Plakoglobin und Desmoglein 2 mit etablierten Prognosefaktoren verglichen werden.
- Zur Ergänzung der retrospektiven Studie an asserviertem Tumormaterial soll überprüft werden, ob sich das Prinzip des Expressionserhalts und die damit verknüpfte bessere Prognose in Zellkulturexperimente übertragen lässt. Hier wird stellvertretend für beide Adhäsionsproteine Plakoglobin untersucht. Dafür werden sieben humane Mammakarzinom-Zelllinien mit sehr weitgespannter Ausprägung von Differenzierungsstatus und Aggressivität analysiert, wobei ihre Invasivität als Marker für die Malignität der Zellen dienen soll.

4. Patientinnen, Material und Methoden

4.1. Das Kollektiv

Untersucht wurde das Tumorgewebe von 96 Frauen mit invasiv duktalem Mammakarzinom. Die Altersverteilung zum Zeitpunkt der Diagnose lag zwischen 24 und 85 Jahren bei einem Median von 56 Jahren. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von 8 Monaten bis zu 16,9 Jahren (Median: 7,5 Jahre). Alle Frauen waren zwischen 1986 und 1987 im Berliner Universitätsklinikum Benjamin Franklin wegen eines invasiv duktales Mammakarzinoms behandelt worden.

Die Primärtherapie bestand bei 89 Frauen aus einer Mastektomie, bei 7 Frauen wurde eine brusterhaltende Therapie vorgenommen. Bei allen Patientinnen wurden die axillären Lymphknoten bis mindestens Level II entfernt und histologisch untersucht. So konnte postoperativ eine Zuordnung nach dem pTpN-Stadium erfolgen.

Bei brusterhaltendem Vorgehen wurde die Brust nachbestrahlt. Lag ein metastatischer Lymphknotenbefall der Axilla vor, wurde je nach Menopausenstatus sowie Hormonrezeptorstatus eine adjuvante Chemotherapie nach dem CMF-Schema bzw. eine antihormonelle Therapie durchgeführt.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patientinnen, die an einem anderen Malignom erkrankt waren, schwere internistische Begleiterkrankungen hatten, sich wegen eines Lokalrezidivs oder eines bereits behandelten Mammakarzinoms vorgestellt hatten, und Patientinnen, über deren Krankheitsverlauf keine sicheren Informationen eingeholt werden konnten.

13 Patientinnen (13,5%) entwickelten während des Beobachtungszeitraumes ein Lokalrezidiv, bei 39 Frauen (40,6%) traten Fernmetastasen auf, 10 (10,4%) entwickelten sowohl Lokalrezidive als auch Metastasen und 33 (34,4%) verstarben in dieser Zeit an den Folgen des Mammakarzinoms. 49 Patientinnen (59,8%) waren am Ende des Beobachtungszeitraums noch am Leben, 14 Patientinnen (17,1%) starben an anderen Ursachen (**Tab. 1**).

Nach dem Abschluss der Primärtherapie unterzogen sich die Patientinnen dem gängigen Nachsorgeprogramm mit regelmäßigen klinischen und laborchemischen Untersuchungen, Oberbauchsonographie, Thoraxröntgenaufnahme, Mammographie der kontralateralen Brust bzw. der Restbrust bei BET sowie einer Skelettszintigraphie bei auftretenden Knochenschmerzen.

Tab. 1: Patientinnenkollektiv in Bezug auf das Auftreten von Lokalrezidiven, Metastasen, Lokalrezidiven und Metastasen gemeinsam und die Mortalität in Bezug auf das Mammakarzinom.

Patientinnen	Lokalrezidive	Metastasen	Lokalrezidive + Metastasen	Mortalität
n° = 96	13,5% (n=13)	40,6% (n=39)	10,4% (n=10)	34,4% (n=33)

n° = Anzahl der Patienten

4.2. Färbung von Plakoglobin mit Hilfe der APAAP-Methode

4.2.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Pro Patientin wurden mehrere 3 µm dicke Schnitte von dem formalinfixierten, paraffineingebetteten Tumormaterial angefertigt, auf gebrauchsfertige „superfrost-plus“-Objektträger aufgebracht, bei 37°C getrocknet und über Nacht bei 56 °C gebacken.

4.2.2 Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Die Deparaffinierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Schritt 1: ca. 20 Objektträger wurden für 5 Minuten in 250 ml Xylol inkubiert .
- Schritt 2: Wiederholung von Schritt 1 mit frischem Xylol.
- Schritt 3: Inkubation der Schnitte für 10 Minuten in 250 ml Aceton
- Schritt 4: Inkubation der Schnitte für 10 Minuten in einem Aceton-Trispuffer-Gemisch (Verhältnis 1:2)
- Schritt 5 : Überführen der Schnitte für 10 Minuten in Tris-Puffer.

4.2.3 Antigendemaskierung

Die Demaskierung von Plakoglobin erfolgte bei pH 6 in einem Citratpuffer. In diesem wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht, anschließend für 20 Minuten abgekühlt und dann über 2x5 Minuten mit Tris-Puffer gewaschen.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Proben mit fetalem Kälberserum für 30 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet.

4.2.4 Die Primärantikörper

Es folgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper.

Der Nachweis von Plakoglobin (CBL 175, Clone PG 5.1, mouse monoclonal, Dianova) (**Tab.2**) wurde in einer Verdünnung von 1:20 über Nacht im Kühlraum in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Anschließend wurden die Präparate mit Tris-Puffer gewaschen.

4.2.5 Das Detektionssystem

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte die Applikation des Brückenantikörpers, der die Fc-Fragmente des Primärantikörpers mit dem APAAP-Komplex verbindet.

Bei dem APAAP-Komplex handelt es sich um einen enzymgekoppelten Antikörper (APAAP = Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase).

Die Präparate wurden mit dem Brückenantikörper (RaMa IgG, Dianova) (**Tab. 2**) in einer Verdünnung von 1:40 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und anschließend mit Tris-Puffer gewaschen.

Danach wurde der APAAP-Komplex (Maus IgG1, Dianova) (**Tab. 2**) in einer Verdünnung von 1:40 für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen und dann ebenfalls mit Tris-Puffer abgewaschen.

Zur Signalverstärkung wurden die Schritte der Brückenantikörper- und APAAP-Komplex-Inkubation mit einer verkürzten Zeit von 10 Minuten wiederholt. Zwischen jedem einzelnen dieser Schritte wurde mit Tris-Puffer gespült.

4.2.6 Die Entwicklung

Zur Entwicklung wurde das DAKO-New Fuchsin Chromogen-Substrate-Kit benutzt: 3 Tropfen (Tropfflasche) Fuchsin und 3 Tropfen Aktivierungsreagenz mussten für eine Minute miteinander reagieren und wurden auf 2 ml mit Substratpuffer aufgefüllt.

Das Gemisch wurde dann auf die Präparate aufgetragen und nach 20 Minuten mit Tris-Puffer abgewaschen.

Für 30 Sekunden wurden die Präparate mit Hämalaunlösung gegengefärbt, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 10 Minuten in Leitungswasser gewässert. Eingedeckt wurde mit Kaisers-Glyceringelatine.

4.3. Immunhistochemische Färbung von Desmoglein 2 (Avidin-Biotin-Methode)

Die Anfertigung der Gewebeschnitte, die Deparaffinierung und die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte in gleicher Weise wie für Plakoglobin. Die Antigendemaskierung wurde wie bei Plakoglobin in Zitratpuffer in der Mikrowelle durchgeführt.

4.3.1 Die Streptavidin-Biotin-Methode (LAB-Methode)

Die Streptavidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Streptavidin für Biotin. Das Streptavidin wird mit einem Enzym gekoppelt und bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper.

Die überaus starke Affinität von Avidin gegenüber Biotin verschafft dieser Methode eine höhere Sensitivität im Vergleich zu der vorher aufgeführten APAAP-Methode⁸⁴.

Diese höhere Färbesensitivität verbessert den Desmoglein-Nachweis deutlich, der aufgrund der geringen Sensitivität des zur Verfügung stehenden Primärantikörpers mit der APAAP-Methode unbefriedigend geblieben wäre.

4.3.2 Das Biotin-Blocking-System

Dieses System dient zur Blockierung aller unspezifischen Avidin- und Biotin-Bindungsstellen, die im Gewebe vorhanden sein könnten.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten mit Avidin-Lösung inkubiert und anschließend mit Tris-Puffer gewaschen.

Darauf folgte die Inkubation mit einer Biotin-Lösung für 10 Minuten und anschließender Spülung mit Tris-Puffer.

4.3.3 Der Primärantikörper

Es folgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper.

Desmoglein (CBL 174, Clone 3.10, mouse monoclonal, Dianova) (**Tab.2**) wurde mit einer Verdünnung von 1:15 über Nacht im Kühlraum in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde mit Tris-Puffer gespült.

4.3.4 Der Sekundärantikörper

Es wurde ein biotinylierter sekundärer Antikörper benutzt, Biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L), (Dianova) (**Tab. 2**).

Mit einer Verdünnung von 1:1000 wurde er für 45 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen und anschließend mit Tris-Puffer wieder abgewaschen.

4.3.5 Der AP(Alkalische Phosphatase)-Komplex

Streptavidin-AP-Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:1000 für 45 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen und anschließend mit Tris-Puffer abgewaschen (**Tab. 2**). Das Streptavidin bindet an das Biotin des zweiten Antikörpers, was zu einer verstärkten Färbung führt.

Die Entwicklung und Einbettung der Präparate wurde dann in gleicher Weise wie bei der APAAP-Methode durchgeführt.

Tab. 2: Zusammenstellung der für die IHC verwendeten Antikörper und Detektionssysteme

Antikörper	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Detektionssystem
Plakoglobin	CBL 175, Clone PG 5.1 mouse monoclonal, Dianova Verdünnung 1:20	Brückenantikörper RaMa IgG, Dianova Verdünnung 1:40	APAAP-Komplex Maus IgG1, Dianova Verdünnung 1:40
Desmoglein 2	CBL 174, Clone 3.10 mouse monoclonal, Dianova Verdünnung 1:15	Biotin-SP-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L), Dianova Verdünnung1:1000	Streptavidin-AP-Konjugat Roche Diagnostics Verdünnung1:1000

4.4. Positiv- und Negativkontrollen

Bei jedem Färbedurchgang wurde sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgefärbt, um zu sichern, dass das beobachtete Färbeergebnis plausibel ist.

Als Positivkontrolle diente normales, gesundes Brustdrüsengewebe, das sowohl Plakoglobin als auch Desmoglein 2 sicher in der Membran des Drüsenepithels exprimiert.

Als Negativkontrolle diente ebenfalls normales, gesundes Brustdrüsengewebe. Zum Ausschluss unspezifischer Färbung durch die verwendeten Reagenzien wurde bei der

Negativkontrolle anstatt des primären Antikörpers Normalserum eingesetzt, welches keine Antikörper gegen humanes Plakoglobin bzw. Desmoglein 2 enthielt.

Zeigte die Negativkontrolle keine Membranfärbung, so war sicher, dass die gefundene Färbung mit dem Primärantikörper der untersuchten Präparate spezifisch war.

4.5. Untersuchungen an kultivierten Zellen

Bei kultivierten, humanen Mammakarzinom-Zelllinien wurde die Plakoglobinexpression durch Western Blots bestimmt. Das invasive Potential dieser Zellen wurde durch Transwell-Experimente in Boyden-Kammern ermittelt.

4.5.1 Zellkultur

Untersucht wurden folgende etablierte humane Mammakarzinom-Zelllinien: MDA-MB-231, MDA-MB 435, SK-BR-3, ZR75-1, MCF-7 sowie die beiden Subklone MDA-MB-231-K18 und MCF-7-LCC2. Die etablierten Zelllinien wurden von der ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) bezogen und im jeweils empfohlenen Medium (Biochrom) im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Bei ca. 95% Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

Der Subklon MDA-MB-231-K18 war durch Transfektion des Keratin 18-Gens in die Mutterzelllinie gewonnen worden⁸¹ und unterscheidet sich von dieser durch die Expression zahlreicher differenzierungs-assoziiertes Proteine. Der Subklon MCF-7-LCC2 wurde durch mehrere Passagen der Mutterzelllinie in der Nacktmaus erzeugt. Der Wildtyp MCF-7 bildet eigentlich keine Metastasen im Tiermodell. In diesem Fall wurde der Zelltumor so lange von Maus zu Maus transplantiert, bis eine Metastasierung erfolgte. Diese Zellen wurden explantiert und in Kultur genommen (Schaller 1996). Diese beiden Paare aus Mutterlinie und Subklon sind für die geplanten Untersuchungen besonders wertvoll, da sich Wildtyp und Subklon in ihrer Aggressivität deutlich unterscheiden. Eine Korrelation von Plakoglobin mit dem Invasionsverhalten der Tumorzelllinien wurde überprüft.

Insgesamt decken die ausgewählten Zelllinien einen weitgespannten Bereich in Hinblick auf Differenzierung und Malignität ab (**Tab. 3**).

Tab. 3: Eigenschaften der untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien

Zelllinie	Differenzierungsgrad	Östrogen-Rezeptor	HER2-Rezeptor	Metastasierung im Tiermodell
MDA-MB 231	sehr gering	nein	nein	ja
MDA-MB 231-K18	sehr hoch	ja	nein	nein
MDA-MB 435	sehr gering	nein	nein	ja
SKBR 3	gering	nein	ja	ja
ZR 75-1	hoch	ja	nein	nein
MCF 7	hoch	ja	nein	nein
MCF 7-LCC2	mäßig	ja	nein	ja

4.5.2 Western Blots

Gewinnung der Proben: Die Zellen wurden in 5 cm-Petrischalen kultiviert, mit PBS gewaschen, abgesaugt und mit jeweils 500 µl heißem SDS-Probenpuffer (sodium dodecyl sulfate) (Roti-Load 1, Roth) solubilisiert. Das Material wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurde die DNA mit einer Ultraschallsonde geschert, die Probe für 5 min bei 16.000 g zentrifugiert, der Überstand aliquotiert, eingefroren und bei -80 °C gelagert.

SDS-Gelelektrophorese und Blot: Verwendet wurde eine Mini-Protean 2 Apparatur der Firma Bio-Rad (München). Polyacrylamidgele mit einer Dicke von 0,7 mm wurden nach Vorschrift des Herstellers gegossen, in die Kammer eingespannt und mit Laufpuffer (Rotiphorese SDS-Page, Roth) überschichtet. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl Probe pro Tasche. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 10 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel, bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hatte.

Das Gel wurde vorsichtig aus den Glasplatten entnommen, für 10 min in Towbin-Puffer äquilibriert, danach Luftblasen-frei auf eine befeuchtete Nitrozellulose-Membran gelegt, mit befeuchtetem Filterkarton zu einem Sandwich zusammengefügt und in die Blotapparatur verbracht. Geblottet wurde über Nacht unter Kühlung bei 30 Volt.

Immunfärbung der Proteinbanden: Nach dem Blot wurde die Membran für mindestens 1h oder über Nacht im Kühlschrank mit 4% Magermilchpulver geblockt. Danach wurde 3x mit TBST gewaschen und mit primärem anti-Plakoglobin-Antikörper (CBL 175, Cymbus Technologies, Klon PG 5.1) 1:200 in TBST / 1% Magermilchpulver für 1h bei

37 °C inkubiert. Nach 3x Waschen mit TBST wurde für 1h bei 37 °C mit anti-Maus-AK-Konjugat des Lumi-Light-Detektions-Kits (Boehringer / Roche Diagnostics) in einer Verdünnung von 1:2.000 in TBST / 1% Magermilchpulver inkubiert. Danach wurde gemäß Anleitung des Herstellers erneut gewaschen, mit Substratlösung inkubiert, die Flüssigkeit abgestreift und die Membran dann zwischen 2 transparente Folien gelegt. In einer Expositionskassette wurde die Lumineszenz der Banden auf einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR, Kodak) belichtet. Danach wurde die Membran in Blockpuffer gewaschen und zur Quantifizierung von β -Aktin, das als interner Standard diente, eine erneute Immunfärbung wie oben beschrieben durchgeführt. Verwendet wurde der anti- β -Aktin-Antikörper (AB 8226 loading control, Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:5000. Sekundär wurde das anti-Maus-Konjugat des Lumi-Light-Kits in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Die belichteten Filme wurden entwickelt (Kodak GBX, Sigma), mit einem Densitometer (GS 700, Bio-Rad) gescannt und mit der Quantifizierungs-Software Quantity One (Bio-Rad) ausgewertet.

4.5.3 Invasivität

Zur Bestimmung des invasiven Potentials wurde gemessen, wie viele Zellen pro Zeiteinheit eine künstliche Basalmembran durchdringen, wenn die Zellen versuchen, einem chemotaktischen Gradienten zu folgen. Filterinserts (Falcon 353182, Becton Dickinson) mit einer Porengröße von 8 μ M wurden mit einer künstlichen Basalmembran (ECM-Gel, Sigma) nach Anleitung des Herstellers beschichtet. Die Inserts wurden in 12 Well-Platten überführt, die Kulturmedium mit 20% FCS enthielten. In die Inserts wurden jeweils 50.000 Zellen in Medium mit 0,5% FCS verbracht und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die im Insert verbliebenen Zellen zusammen mit der Basalmembran mit angefeuchteten Wattestäbchen vorsichtig, aber gründlich ausgewischt. Die Inserts mit den an der Unterseite der Membran anhaftenden invadierten Zellen wurden in ein neues Well überführt, das Medium mit einer Viability-Testsubstanz enthielt (CellTiter 96 AQ, Promega). Die Mitochondrien der Zellen setzen gelbliches MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) zu einem blauvioletten Komplex um. Im Gegensatz zum bekannten MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist diese Verbindung jedoch Membran-gängig, so dass sie

sich im Inkubationsmedium anreichert. Nach 4h im Inkubator wurden jeweils 200 µl des Mediums in eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion der Lösung bei 495 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech) gemessen. Die Absorption ist ein unmittelbares Maß für die Anzahl der umsetzenden Zellen. Zur Kontrolle der basalen Absorption wurde ein gleich behandeltes Insert ohne Zellen mitgeführt.

4.6. Reagenzien und Puffer

- Aceton
- anti-β-Aktin-Antikörper (AB 8226 loading control, Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:5.000
- anti-Maus-AK-Konjugat des Lumi-Light-Detektions-Kits (Boehringer / Roche Diagnostics) in einer Verdünnung von 1:2.000 bzw. 1:5000 in TBST / 1% Magermilchpulver
- Biotin-Blocking-System: DAKO
- Blockpuffer: Magermilchpulver 4% in TBST
- Citratpuffer (pH 6): Stammlösung A = 0,1 M (21,01 g) Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest.
Stammlösung B = 0,1 M (29,41 g) Natriumcitrat in 1000 ml in Aqua dest.

18 ml der Stammlösung A und 82 ml der Stammlösung B mit 900 ml Aqua dest. auffüllen und gut mischen.

- ECM-Gel: Sigma
- FCS: fetales Kälberserum; Biochrom KG, hitzeinaktiviert (1/2 Stunde bei 56°C)
- Hämalaunlösung
- Kaiser-Glyceringelatine
- Laufpuffer (Rotiphorese SDS-Page): Roth
- New Fuchsin Chromogen-Substrate-Kit : DAKO
- PBS: Phosphate buffered saline
- Polyacrylamidgele : nach Vorschrift des Herstellers gegossen
- Sammelgel (4%): 3,075 ml H₂O, 1,25 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,7), 0,67 ml Acrylamid/Bis (30%), 50 µl SDS (10%), 25 µl Ammoniumpersulfat (10%), 5 µl TEMED (alle Chemikalien: Roth)

-
- SDS-Gelelektrophorese
 - SDS-Probenpuffer (Roti-Load 1): Roth
 - Substratlösung des Lumi-Light-Detektions-Kits
 - TBST: 50 mM Tris-Puffer, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6
 - Trenngel (10%): 12,3 ml H₂O, 7,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 9,9 ml Acrylamid/Bis (30%), 150 µl SDS (10%), 150 µl Ammoniumpersulfat (10%), 20 µl TEMED (Roth)
 - Tris-Puffer (5-fach konzentriert):

171,25 g Tris-HCl	(0.217 M)
20,00 g Tris-Base	(33 mM)
219,50 g NaCl	(0,75 mM)

Der Tris-Puffer wurde für alle Färbungen 1:5 verdünnt und zur Verdünnung aller Antikörper benutzt.

- Towbin-Puffer: 25 mM Tris-Puffer, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3
- Viability-Testsubstanz: CellTiter 96 AQ; Promega: MTS
- Xylol

4.7. Auswertung und statistische Analyse

Die Gewebeschnitte wurden von mindestens zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt, die zum Zeitpunkt der Auswertung keine Kenntnis der dazugehörigen Patientinnendaten und deren Krankheitsverläufen besaßen.

Plakoglobin und Desmoglein 2 werden nicht nur an der Membran, sondern auch in weiteren Zellkompartimenten wie dem Zytoplasma und Kern nachgewiesen. Die verschiedenen Lokalisationen sollten prognostisch bewertet werden. Dafür war das übliche Scoring-System (immunreaktiver Score (IRS) nach *Remmele und Stegner* (1987)⁸⁴) aufgrund der Komplexität ungeeignet, da die Vielzahl der Bewertungsziffern die Interpretation der Ergebnisse erschwert und statistische Aussagen verwässert hätten. Daher wurde in enger Abstimmung mit dem Institut für Statistik ein eigener Score mit reduziertem Umfang entwickelt.

Die Einteilung der Färbeintensität (SI=staining intensity) erfolgte in Anlehnung an den IRS-Score, jedoch wurde der Prozentsatz positiver Zellen (PP) lediglich in weniger als 50% oder mehr als 50% gefärbte Zellen unterteilt.

- 0 = keine positiven Zellen
- 1 = weniger als 50% positive Zellen
- 2 = mehr als 50% positive Zellen

Die einzelnen so auf diese Weise nach der Formel:

$$\text{IRS} = \text{SI} \times \text{PP}$$

mit 0 bis 6 bewerteten Kompartimente Zytoplasma, Membran und Kern wurden daraufhin addiert, so dass sich ein Reaktionsgrad zwischen 0 und 18 ergab (**Tab. 4**). Auch hier wurden Positiv- und Negativkontrollen zur Justierung der Bewertung herangezogen.

Tab. 4: Modifizierter immunreaktiver Score für Plakoglobin und Desmoglein 2

Färbeintensitätsstufen	Prozentualer Anteil
0 = keine Färbung	0 = keine positiven Zellen
1 = schwache Färbung	1 = < 50 % positive Zellen
2 = mäßige Färbung	2 = > 50 % positive Zellen
3 = starke Färbung	

Multiplikation der Färbeintensität und des prozentualen Anteils positiver Tumorzellen ergeben den immunreaktiven Score mit einem Bereich von 0-6 für die einzelnen Kompartimente. Die Addition der einzelnen Kompartimente zeigte so Reaktionsgrade zwischen 0 und 18.

Die Cut-Points für Plakoglobin und Desmoglein 2 wurden sowohl getrennt für die einzelnen Kompartimente als auch für einen gemeinsamen Gesamtscore des jeweiligen Proteins festgelegt (**Tab. 5**). Prognostische Zielkriterien waren das Auftreten eines Lokalrezidivs, einer Metastase oder beider gemeinsam, bzw. das Versterben der Patientin durch das Mammakarzinom.

Hierbei steht *Plako-M* für die Membranfärbung, *Plako-Z* für die Zytoplasmafärbung und *Plako-K* für die Kernfärbung von Plakoglobin. *Plako-gesamt* beschreibt die Summe aller drei Kompartimente.

Desmo-M steht für die Membranfärbung, *Desmo-Z* für die Zytoplasmafärbung und *Desmo-K* für die Kernfärbung von Desmoglein 2. *Desmo-gesamt* beschreibt die Summe aller drei Kompartimente.

Desmo-1 berücksichtigt sowohl die Membran- als auch die Zytoplasmafärbung von Desmoglein 2, aber nicht dessen Kernfärbung.

Tab. 5: Ermittelte Cut-Points für Plakoglobin und Desmoglein 2 jeweils gemeinsam und nach Kompartimenten getrennt für die verschiedenen Ereignisse

Variable	Auftreten eines Lokalrezidivs	Auftreten von Metastasen	Auftreten von Lokalrezidiv und Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Plakoglobin	5,5	13,5	5,5	4,5
Plako-M	1,5	5	0,5	0,5
Plako-Z	3,5	5	3,5	3,5
Plako-K	5	0,5	2,5	2,5
Desmo	3,5	10,5	6,5	6,5
Desmo-1	9	9	3,5	4,5
Desmo-M	5	5	1,5	3,5
Desmo-Z	0,5	5	2,5	2,5
Desmo-K	5	3,5	0,5	0,5

Somit waren die Werte über dem jeweils ermittelten Cut-Point als positiv zu werten, Werte darunter als negativ.

Der Lymphknotenstatus (N) war postoperativ histologisch (p) untersucht worden. Gemäß der damaligen TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) entsprach pN0 einem nicht vorliegendem Tumorbefall, pN1 einem Tumorbefall in beweglichen, homolateralen axillären Lymphknoten, pN2 entsprach einem Tumorbefall in homolateralen axillären Lymphknoten mit Fixation untereinander oder an anderen Strukturen. pN=0 wurde als negativ gewertet (=0), pN>0 als positiv (=1).

Der postoperative Nachweis der Östrogenrezeptoren (ER) erfolgte immunhistochemisch. Ein Tumor galt als ER-positiv (ER=1), wenn in $\geq 10\%$ der Zellen Östrogenrezeptoren nachweisbar waren. Waren unter 10% nachweisbar, lag ein negativer Östrogenrezeptorstatus (ER=0) vor⁸⁵.

Die Tumorgröße wurde gemäß der TNM-Klassifikation beurteilt. pT1 bezeichnet eine Tumorgröße von max. 2 cm, pT2 eine Tumorgröße von über 2 bis 5 cm, pT3 eine Tumorgröße von über 5 cm und pT4 Tumore jeglicher Größe mit direkter Infiltration von Brustwand, Haut oder inflammatorische Karzinome.

In der Beurteilung des histologischen Gradings (G) wurden die Mitoseraten, die Kernpleomorphie und die tubuläre Differenzierung berücksichtigt. G1 entsprach einem hohen, G2 einem mäßigen und G3 einem niedrigen Differenzierungsgrad.

K18 war mit dem IRS bewertet worden und der Cut-Point bei 4 festgesetzt. Ein IRS >4 wurde positiv, ein IRS<4 negativ gewertet⁸⁵.

Her2/neu wurde in dieser Studie für die Vergleichbarkeit der Parameter bei diesem Patientinnenkollektiv ebenso mit dem IRS bewertet, wie dies vor Einführung des Dako-Scoring-Systems üblich war. Ein IRS >4 wurde positiv, ein IRS <4 negativ gewertet.

Die Färbedaten für K18 sowie Her2/neu wurden bei anteilig gleichem Patientinnenkollektiv mit freundlicher Überlassung von PD Dr. Ilka Fuchs übernommen⁸⁵.

Da Her2/neu nicht für alle Patientinnen bekannt war, wurde die Mehrzahl der Analysen jeweils einmal mit allen Variablen, aber ohne die Patientinnen, deren Her2/neu -Werte nicht bekannt waren, und einmal mit allen Patientinnen, aber ohne die Variable Her2/neu durchgeführt.

Bei der Analyse des Gesamtüberlebens wurden nur Patientinnen mit einbezogen, deren Todesursache bekannt war.

Die statistische Analyse der klinischen Daten wurde mit SPSS für Windows, Versionen 12.0.1 und 13.0.1, bzw. R⁸⁶ durchgeführt.

Cut-Points, Kaplan-Meier-Kurven und entsprechende χ^2 -Statistiken wurden mit von R. Mundry (Max-Planck-Institut für Evolutionäre Anthropologie, Abteilung Statistik, Leipzig) geschriebenen Programmen durchgeführt.

Multivariate Zusammenhänge der Parameter wurden in Regressionsanalysen nach Cox untersucht.

Vor der eigentlichen statistischen Analyse wurden sämtliche Variablen auf Normalität geprüft; diese Prüfung ergab keine schwerwiegenden Abweichungen von einer Normalverteilung, weswegen parametrische Analysen durchgeführt werden konnten.

Es erfolgte die Durchführung einer zweiteiligen Analyse, wobei zunächst eine globale Analyse bestehend aus Hauptkomponentenanalyse und nachfolgender Cox-Regression durchgeführt wurde.

Die Durchführung der globalen Analyse war notwendig, um die unabhängigen Variablen im Zusammenhang betrachten und außerdem das Risiko irrtümlicher Signifikanzen minimieren zu können.

Im ersten Schritt dieser globalen Analyse, der Hauptkomponentenanalyse, wurden zunächst sämtliche Variablen (ausgenommen Her2/neu, da nicht für alle Patientinnen vorhanden) auf Interkorrelationen geprüft. Es ergaben sich 5 Hauptkomponenten, in welchen jeweils diejenigen Variablen zusammengefasst sind, welche untereinander korrelieren (**Tab. 6**).

Tab. 6: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse. Dargestellt sind die Ladungen der Variablen auf die fünf extrahierten Hauptkomponenten. Werte nahe 1 bzw. -1 bedeuten, dass die jeweilige Variable mit der entsprechenden Hauptkomponente stark positiv bzw. negativ korreliert. Die jeweils absolut höchste Ladung pro Zeile wurde hervorgehoben. In der letzten Zeile (% var. expl.) ist die insgesamt von der jeweiligen Hauptkomponente erklärte Varianz angegeben.

Variable	1	2	3	4	5
Desmo-1	0.97	0.19	-0.01	-0.11	-0.01
Desmo-gesamt	0.91	0.14	0.01	0.38	0.00
De-M	0.82	0.08	0.02	-0.40	0.18
De-Z	0.78	0.24	-0.04	0.25	-0.22
PI-K	0.19	0.73	0.01	0.03	-0.13
Plako-gesamt	0.18	0.97	0.06	-0.10	-0.03
PI-M	0.12	0.59	0.23	-0.36	0.06
PI-Z	0.07	0.83	-0.12	0.12	0.02
Grading	-0.14	-0.17	-0.67	-0.04	0.37
K18	-0.06	-0.14	0.65	0.06	0.00
ER	-0.01	0.10	0.74	-0.12	0.03
De-K	0.09	-0.04	0.02	0.93	0.05
N	-0.09	-0.02	0.49	0.06	0.57
T	0.04	-0.04	-0.22	0.00	0.82
% var. expl.	28.72	14.81	12.15	10.00	8.10

Die erste Hauptkomponente korrelierte ausschließlich mit „Desmoglein 2-Variablen“, die zweite ausschließlich mit „Plakoglobin-Variablen“, die dritte mit dem Grading, K18 und dem Östrogenrezeptor, die vierte mit der Kernfärbung von Desmoglein 2 und die fünfte mit dem Lymphknotenstatus und der Tumorgröße.

Nachfolgend wurden die ermittelten Hauptkomponenten mittels einer Cox-Regression auf signifikante Einflüsse in Bezug auf das Eintreten von Lokalrezidiven, Metastasen, Lokalrezidiven und Metastasen gemeinsam bzw. das Überleben hin untersucht. Für den Fall, dass die jeweilige Analyse ein insgesamt signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,05$) ergab, wurde eine weitere Cox-Regression mit den einzelnen Variablen (anstelle der Hauptkomponenten) der jeweiligen Hauptkomponente durchgeführt.

Entsprechend wurden Analysen für den reduzierten Patientinnensatz mit der Variablen Her2/neu durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser kombinierten Analysen und die Darstellung der multivariaten Zusammenhänge der unabhängigen Variablen sind unter 5.2. aufgeführt.

Im zweiten Schritt der Analyse wurde der Einfluss der einzelnen unabhängigen Variablen jeweils auch isoliert betrachtet. Dies geschah zum einen, um die in der vorherigen Analyse ermittelten Zusammenhänge genauer zu betrachten, zum anderen aber auch um mögliche, durch korrelierende unabhängige Variablen verursachte, Fehlschlüsse zu vermeiden.

In diesen sogenannten Einzelanalysen wurden für sämtliche unabhängigen Variablen Kaplan-Meier-Kurven in Bezug auf Lokalrezidiv-, Metastasen-, Lokalrezidiv- und Metastasenfreiheit gemeinsam sowie die Überlebenswahrscheinlichkeit erstellt und mit dem entsprechenden χ^2 -Test auf Signifikanz geprüft.

5. Ergebnisse

5.1. Einzelanalysen

Insgesamt hatten die untersuchten Prognosefaktoren, sowohl die bereits etablierten als auch die hier neu beschriebenen, eine hoch signifikante Korrelation mit den untersuchten Ereignissen. Dies ergab sich aus dem alle Irrtumswahrscheinlichkeiten zusammenfassenden Fishers Omnibus-Test ($\chi^2=270$; $df=144$; $p<0,0001$). Im Folgenden wird daher die Prognosefähigkeit der verschiedenen unabhängigen Variablen (Prognosefaktoren) auf die abhängigen Variablen (Ereignisse) genauer betrachtet. Die Patientinnen mit progredienter Erkrankung werden gruppiert nach „Lokalrezidive“ und „Metastasen“. Als Zeichen eines generellen Progresses wurde zusätzlich eine Auswertung für „Lokalrezidive + Metastasen“ durchgeführt.

5.1.1 Der Lymphknotenstatus als Prognosekriterium

Der Lymphknotenstatus (N) war postoperativ histologisch (p) beurteilt worden. Gemäß der damaligen TNM-Klassifikation der UICC entsprach pN1 einem Tumorbefall in beweglichen, homolateralen axillären Lymphknoten, pN2 entsprach einem Tumorbefall in homolateralen axillären Lymphknoten mit Fixation untereinander oder an andere Strukturen.

pN=0 wurde als negativ gewertet (=0), pN>0 als positiv (=1).

43 (45%) der 96 Patientinnen hatten einen negativen Lymphknotenstatus (43x pN=0).

53 (55%) der 96 Patientinnen hatten einen positiven Lymphknotenstatus (53x pN>0).

Von den 43 nodal-negativen Patientinnen entwickelten 3 (7%) Lokalrezidive, 14 (32,5%) entwickelten Metastasen, 2 (5%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 10 (23%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 53 nodal-positiven Patientinnen entwickelten 10 (19%) Lokalrezidive, 25 (47%) entwickelten Metastasen, 8 (15%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 23 (43%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 7**).

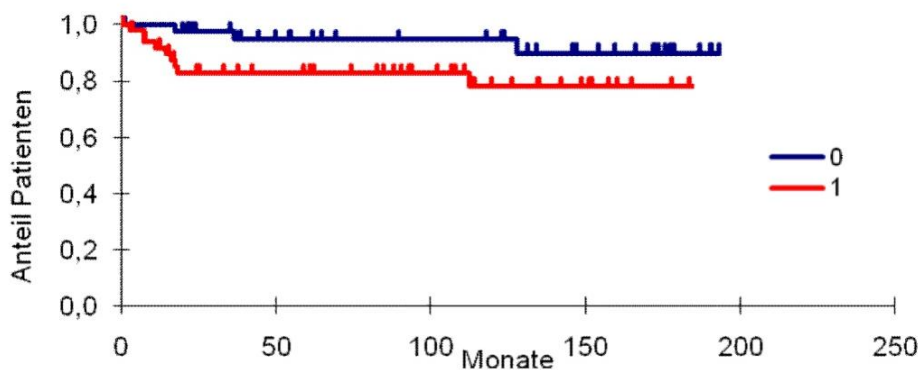
Tab. 7: Der Nodalstatus in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastase	Tod durch Mammakarzinom
pN=0	43	7% (n=3)	32,5% (n=14)	5% (n=2)	23% (n=10)
pN=1	53	19% (n=10)	47% (n=25)	15% (n=8)	43% (n=23)

n° = Anzahl der Patienten

Es zeigte sich, dass ein positiver Lymphknotenstatus signifikant mit einer schlechteren Prognose sowohl hinsichtlich des Gesamtüberlebens (Log-Rank-Test: $p < 0,014$) als auch des rezidivfreien Überlebens (Log-Rank-Test: $p < 0,027$) korreliert (**Abb. 2**). Bezüglich des metastasenfremen Überlebens bzw. bezüglich des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen zeigten sich bei der Auswertung keine Signifikanzen in der statistischen Analyse.

a)



b)

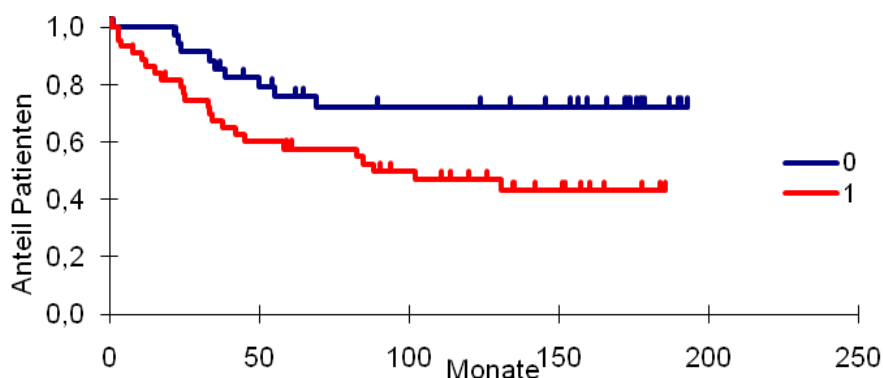


Abb. 2 : Rezidivfreies Überleben (a) und Gesamtüberleben (b) in Abhängigkeit vom Lymphknotenstatus (LK): 0=LK neg.; 1=LK pos.
Ein positiver Lymphknotenstatus korrelierte signifikant mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben (Log-Rank-Test: $p < 0,027$) und Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,014$)

5.1.2 Die Tumorgröße als Prognosekriterium

Die Tumorgröße (T) war postoperativ histologisch untersucht worden (p). Gemäß der TNM-Klassifikation der UICC bezeichnete pT1 eine Tumorgröße von max. 2 cm, pT2 eine Tumorgröße von über 2 bis 5 cm, pT3 eine Tumorgröße von über 5 cm und pT4 Tumore jeglicher Größe mit direkter Infiltration von Brustwand, Haut oder inflammatorische Karzinome.

33 (34%) der 96 Patientinnen hatten einen pT1-Tumor, 45 (47%) der 96 Patientinnen hatten einen pT2-Tumor, 7 (7%) der 96 Patientinnen hatten einen pT3-Tumor und 11 (11%) der 96 Patientinnen hatten einen pT4-Tumor.

Von den 33 Patientinnen mit pT1-Tumor entwickelten 4 (12%) Lokalrezidive, 10 (30%) entwickelten Metastasen, 4 (12%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 8 (24%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 45 Patientinnen mit pT2-Tumor entwickelten 5 (11%) Lokalrezidive, 19 (42%) entwickelten Metastasen, 4 (9%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 15 (33%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 7 Patientinnen mit pT3-Tumor entwickelten 1 (14%) Lokalrezidive, 4 (57%) entwickelten Metastasen, 1 (14%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 3 (43%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 11 Patientinnen mit pT4-Tumor entwickelten 3 (27%) Lokalrezidive, 6 (55%) entwickelten Metastasen, 1 (9%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 7 (64%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 8**).

Tab. 8: Die Tumorgröße in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastase	Lokalrezidiv + Metastase	Tod durch Mammakarzinom
pT1	33	12% (n=4)	30% (n=10)	12% (n=4)	24% (n=8)
pT2	45	11% (n=5)	42% (n=19)	9% (n=4)	33% (n=15)
pT3	7	14% (n=1)	57% (n=4)	14% (n=1)	43% (n=3)
pT4	11	27% (n=3)	55% (n=6)	9% (n=1)	64% (n=7)

n° = Anzahl der Patienten

Nur das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit der Tumorgröße. Hier zeigte sich mit zunehmender Tumorgröße ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,014$) (**Abb. 3**).

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, des metastasenfremen Überlebens bzw. des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen zeigte sich keine signifikante Korrelation in der statistischen Analyse.

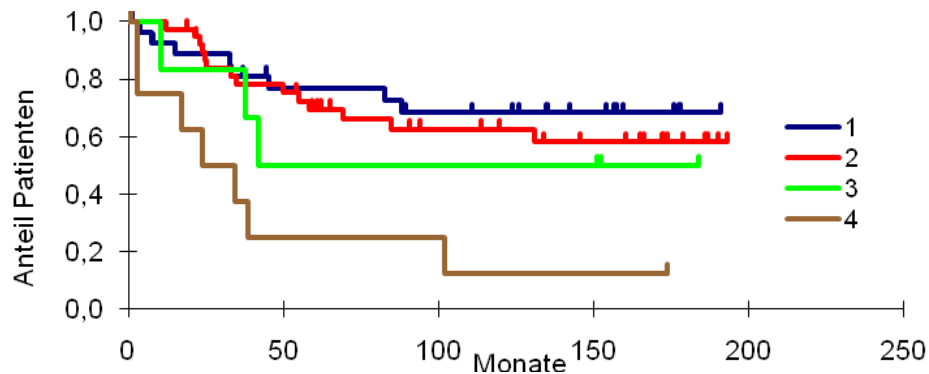


Abb. 3: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Tumorgröße (T)
1=T1, 2=T2, 3=T3, 4=T4
Mit zunehmender Tumorgröße zeigte sich ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,014$).

5.1.3 Das Grading als Prognosekriterium

In der Beurteilung des histologischen Gradings (G) wurden die Mitoseraten, die Kernpleomorphie und die tubuläre Differenzierung des Tumorgewebes berücksichtigt. G1 entsprach einem hohen, G2 einem mäßigen und G3 einem niedrigen Differenzierungsgrad des Tumors.

9 (9%) der 96 Patientinnen hatten einen G1-Tumor, 42 (44%) der 96 Patientinnen hatten einen G2-Tumor, 45 (47%) der 96 Patientinnen hatten einen G3-Tumor.

Von den 9 Patientinnen mit G1-Tumor entwickelten 2 (22%) Lokalrezidive, 1 (11%) entwickelten Metastasen, 1 (11%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 0 (0%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 42 Patientinnen mit G2-Tumor entwickelten 7 (17%) Lokalrezidive, 15 (36%) entwickelten Metastasen, 5 (12%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 12 (29%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 45 Patientinnen mit G3-Tumor entwickelten 4 (9%) Lokalrezidive, 23 (51%) entwickelten Metastasen, 4 (9%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 21 (47%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 9**).

Tab. 9: Das Grading in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastase	Lokalrezidiv + Metastase	Tod durch Mammakarzinom
G1	9	22% (n=2)	11% (n=1)	11% (n=1)	0% (n=0)
G2	42	17% (n=7)	36% (n=15)	12% (n=5)	29% (n=12)
G3	45	9% (n=4)	51% (n=23)	9% (n=4)	47% (n=21)

n° = Anzahl der Patienten

Das metastasenfremie Überleben sowie das Gesamtüberleben korrelierten signifikant mit dem Grading. Mit zunehmendem Grading verkürzte sich sowohl das Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,020$) als auch das metastasenfremie Überleben (Log-Rank-Test: $p < 0,047$) (**Abb. 4**).

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens bzw. des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen zeigte sich keine signifikante Korrelation in der statistischen Analyse.

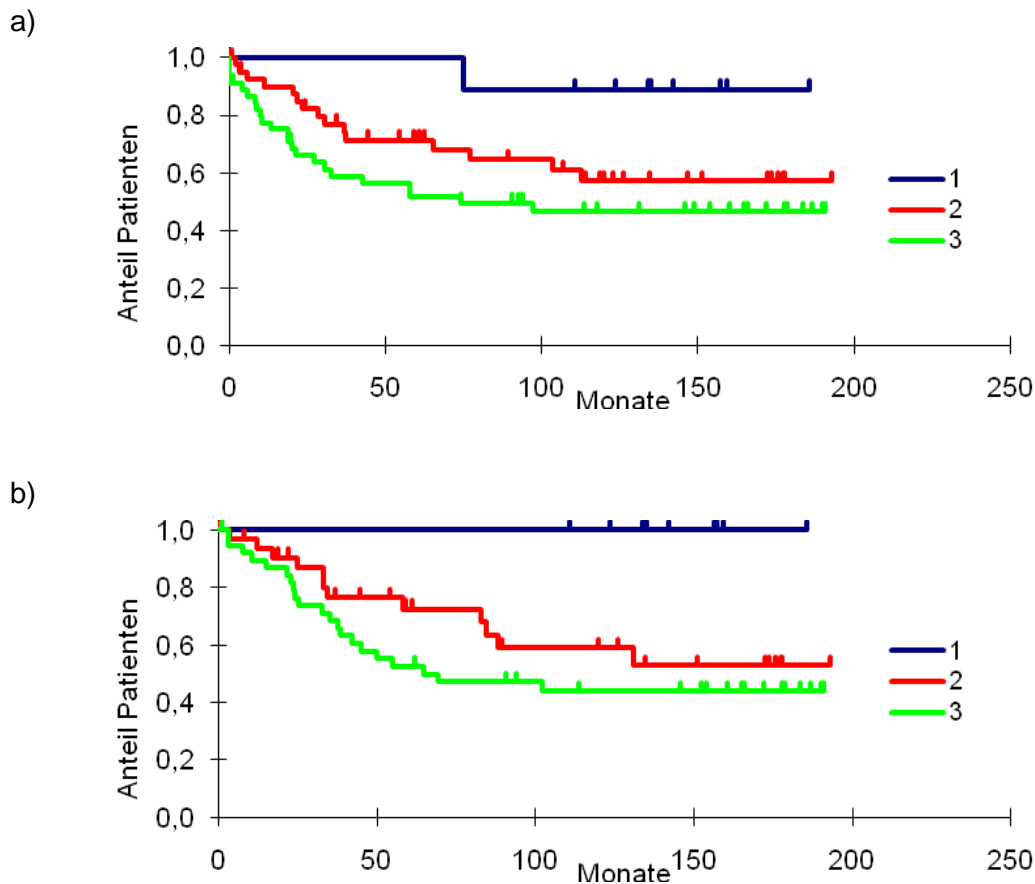


Abb. 4 : Metastasenfreies Überleben (a) und Gesamtüberleben (b) in Abhängigkeit vom Grading: 1=G1, 2=G2, 3=G3
 Mit zunehmendem Grading zeigte sich sowohl ein signifikant verkürztes metastasenfreies Überleben (Log-Rank-Test: $p < 0,047$) als auch ein verkürztes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,020$).

5.1.4 Der Hormonrezeptorstatus als Prognosekriterium

Der postoperative Nachweis der Östrogenrezeptoren (ER) erfolgte immunhistochemisch. Ein Tumor galt als ER-positiv (ER=1), wenn in $>10\%$ der Zellen Östrogenrezeptoren nachweisbar waren. Waren unter 10% nachweisbar, lag ein negativer Östrogenrezeptorstatus (ER=0) vor.

33 (34%) der 96 Patientinnen wiesen einen negativen Östrogenrezeptorstatus (33 x ER=0) auf.

63 (66%) der 96 Patientinnen wiesen einen positiven Östrogenrezeptorstatus (63 x ER=1) auf.

Von den 33 Östrogenrezeptor-negativen Patientinnen entwickelten 6 (18%) Lokalrezidive, 22 (67%) entwickelten Metastasen, 6 (18%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 15 (45%) verstarben am Mammakarzinom. Von den 63 Östrogenrezeptor-positiven Patientinnen entwickelten 7 (11%) Lokalrezidive, 17 (27%) entwickelten Metastasen, 4 (6%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 18 (29%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 10**).

Tab. 10: Der Hormanrezeptorstatus in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
ER=0	33	18% (n=6)	67% (n=22)	18% (n=6)	45% (n=15)
ER=1	63	11% (n=7)	27% (n=17)	6% (n=4)	29% (n=18)

n° = Anzahl der Patienten

Das metastasenfrie sowie das Gesamtüberleben korrelierten signifikant mit dem Östrogenrezeptorstatus. Bei einem negativen Östrogenrezeptorstatus verkürzte sich sowohl das Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,009$) als auch das metastasenfrie Überleben (Log-Rank-Test: $p < 0,002$) (**Abb. 5**).

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens bzw. des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Rezidiven und Metastasen zeigte sich keine signifikante Korrelation in der statistischen Analyse.

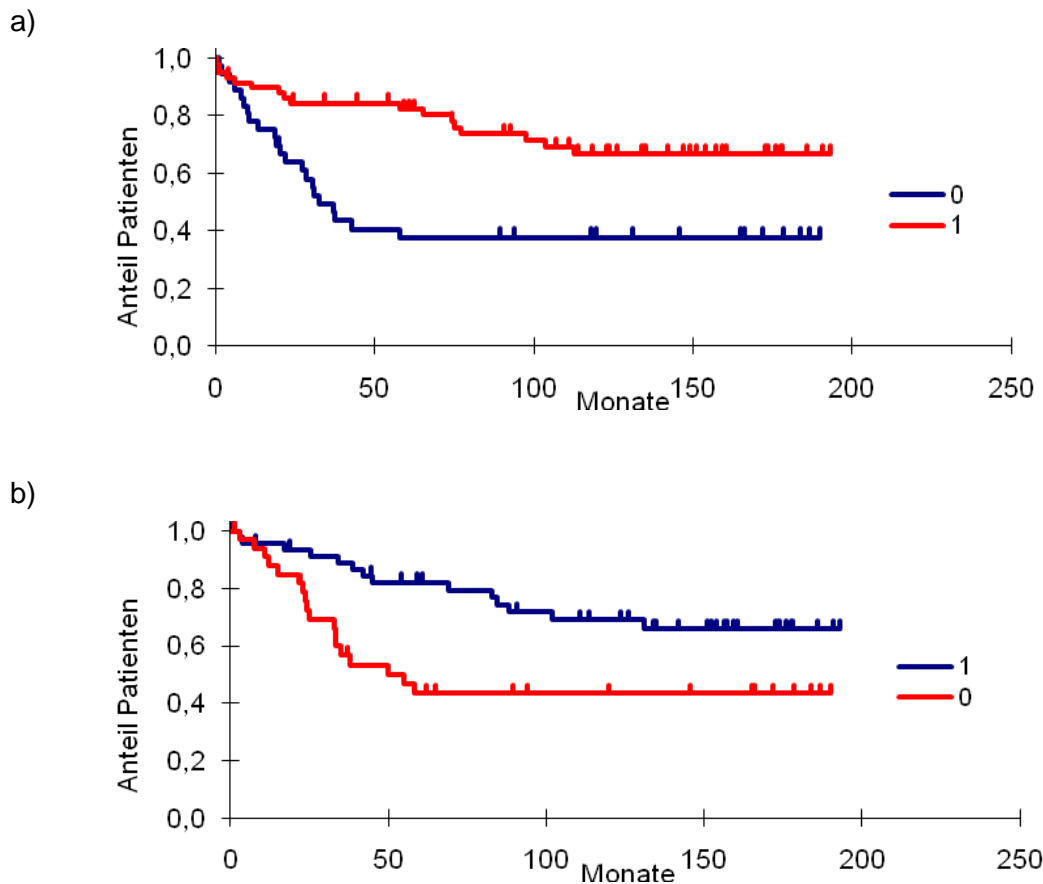


Abb. 5: Metastasenfreies Überleben (a) und Gesamtüberleben (b) in Abhängigkeit vom Östrogenrezeptorstatus (ER). 0=negativer ER-Status, 1=positiver ER-Status. Bei negativem Östrogenrezeptor-Status zeigt sich sowohl ein signifikant verkürztes metastasenfreies Überleben (Log-Rank-Test: $p < 0,002$) als auch ein verkürztes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,009$).

5.1.5 Keratin 18 als Prognosekriterium

K18 war postoperativ immunhistochemisch nachgewiesen worden.

56 (58%) der 96 Präparate wurden aufgrund geringer Expression von K18 im Tumor ($IRS < 4$) als negativ bewertet (K18=0). 40 (42%) der 96 Präparate wurden aufgrund deutlicher Expression von K18 im Tumor ($IRS > 4$) als positiv bewertet (K18=1).

Von den 56 K18-negativen Patientinnen entwickelten 10 (18%) Lokalrezidive, 27 (48%) entwickelten Metastasen, 9 (16%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 22 (39%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 40 K18-positiven Patientinnen entwickelten 3 (8%) Lokalrezidive, 12 (30%) entwickelten Metastasen, 1 (3%) entwickelte sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 11 (28%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 11**).

Tab. 11: K18 in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
K18=0	56	18% (n=10)	48% (n=27)	16% (n=9)	39% (n=22)
K18=1	40	8% (n=3)	30% (n=12)	3% (n=1)	28% (n=11)

n° = Anzahl der Patienten

Nur das metastasenfreie Überleben korrelierte signifikant mit der Expression von K18. Bei einer negativen K18-Expression verkürzte sich das metastasenfreie Überleben signifikant (Log-Rank-Test: $p < 0,032$) (**Abb. 6**).

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen bzw. des Gesamtüberlebens zeigte sich keine signifikante Korrelation in der statistischen Analyse.

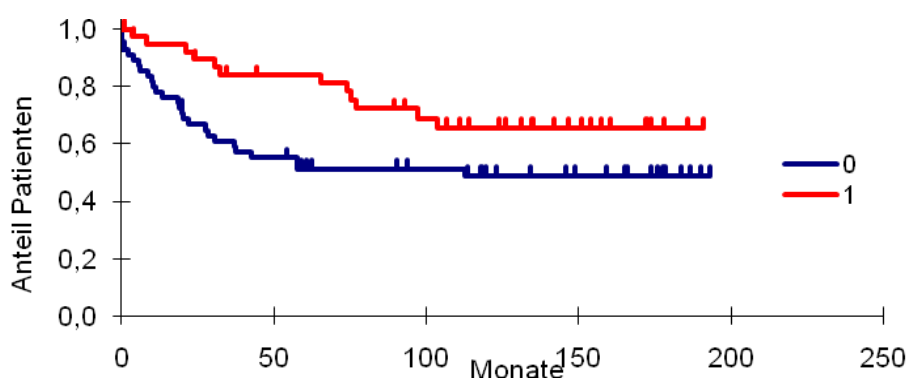


Abb. 6: Metastasenfreies Überleben in Abhängigkeit von der K18-Expression. 0=K18-negativ (IRS<4), 1=K18-positiv (IRS>4)
Bei negativer K18-Expression zeigte sich ein signifikant verkürztes metastasenfreies Überleben (Log-Rank-Test: $p < 0,032$).

5.1.6 Her2/neu als Prognosekriterium

Her2/neu war postoperativ immunhistochemisch nachgewiesen worden.

49 (66%) der 74 Präparate wurden aufgrund geringer Expression von Her2/neu im Tumor (IRS<4) als negativ bewertet (Her2/neu =0). 25 (34%) der 74 Präparate wurden aufgrund deutlicher Expression von Her2/neu im Tumor (IRS>4) als positiv bewertet (Her2/neu =1).

Von den 49 Her2/neu -negativen Patientinnen entwickelten 6 (12%) Lokalrezidive, 17 (35%) entwickelten Metastasen, 5 (10%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 13 (27%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 25 Her2/neu -positiven Patientinnen entwickelten 4 (16%) Lokalrezidive, 11 (44%) entwickelten Metastasen, 2 (8%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 11 (44%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 12**).

Tab. 12: Her2/neu in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv +Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Her2/neu =0	49	12% (n=6)	35% (n=17)	10% (n=5)	27% (n=13)
Her2/neu =1	25	16% (n=4)	44% (n=11)	8% (n=2)	44% (n=11)

n° = Anzahl der Patienten

In der statistischen Analyse zeigten sich weder hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, noch des metastasenfremen Überlebens, noch des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen bzw. des Gesamtüberlebens signifikante Korrelationen.

5.1.7 Plakoglobin als Prognosekriterium

Im gesunden Brustdrüsengewebe färbt sich Plakoglobin als Adhäsionsprotein v.a. in der Membran an. Teilweise ist auch eine leichte zytosolische Färbung darstellbar, die darauf zurückzuführen ist, dass neusynthetisiertes Plakoglobin auf seinem Weg von den Ribosomen in die Membran das Zytosol passiert. Gleiches gilt für seinen turnusmäßigen Austausch durch den Abbau in den Proteasomen.

Eine Kernfärbung im gesunden Gewebe tritt nicht auf.

In den Tumoren zeigte sich teilweise ein sehr heterogenes Färbemuster. Vorherrschend war eine fehlende Membranfärbung. Aber im Gegensatz zum gesunden Gewebe traten teilweise auch eine ausgeprägte Zytosol- sowie Kernfärbung auf, was jeweils auf eine funktionelle Störung hindeuten könnte.

Daher überprüften wir sowohl alle Kompartimente zusammen als auch einzeln in Hinblick auf ihre Wertigkeit als Prognosekriterium.

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit einigen Expressionsmustern von Plakoglobin, was im Folgenden detailliert aufgezeigt werden soll. Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, des metastasenfremen Überlebens bzw. des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen zeigten sich jeweils keine signifikanten Korrelationen in der statistischen Analyse für Plakoglobin.

5.1.7.1 Die Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung aller Kompartimente

23 (24%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung aller Kompartimente im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens ($IRS < 4,5$) als negativ bewertet (Plako-gesamt=0) (**Abb. 8**).

73 (76%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung aller Kompartimente im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens ($IRS > 4,5$) als positiv bewertet (Plako-gesamt=1) (**Abb. 9**).

Von den 23 Plako-gesamt negativen Patientinnen entwickelten 3 (13%) Lokalrezidive, 14 (60,8%) entwickelten Metastasen, 3 (13%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 13 (56,5%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 73 Plako-gesamt positiven Patientinnen entwickelten 10 (13,7%) Lokalrezidive, 25 (34,2%) entwickelten Metastasen, 7 (9,6%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 20 (27,3%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 13**).

Tab. 13: Plako-gesamt in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Plako-gesamt=0	23	13% (n=3)	60,8% (n=14)	13% (n=3)	56,5% (n=13)
Plako-gesamt =1	73	13,7% (n=10)	34,2% (n=25)	9,6% (n=7)	27,3% (n=20)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit Plako-gesamt. Hier zeigte sich bei positiver Plakoglobin-gesamt-Expression ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log Rank-Test: $p < 0,008$) (**Abb. 7**).

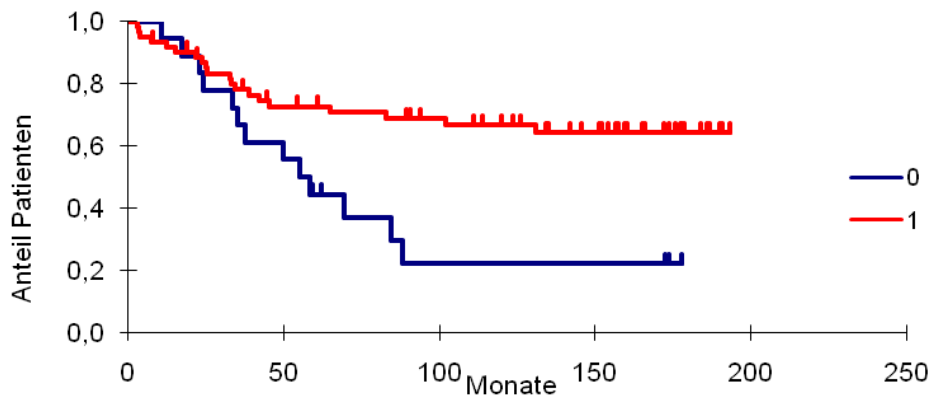


Abb. 7: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Plakoglobinexpression aller Kompartimente gemeinsam (=Plako-gesamt)
 0=Plako-gesamt negativ (IRS<4,5), 1=Plako-gesamt positiv (IRS>4,5)
 Bei positiver Plakoglobin-gesamt-Expression zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,008$).

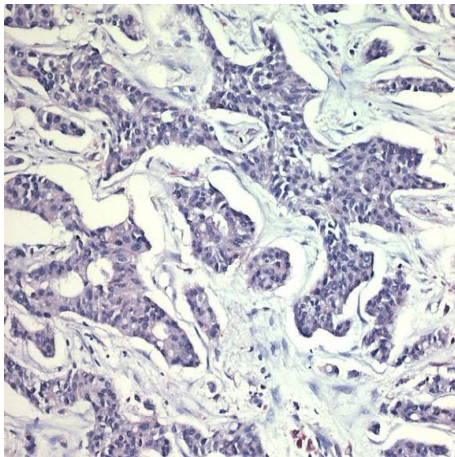


Abb. 8: Keine nachweisbare Plakoglobinexpression im Tumor

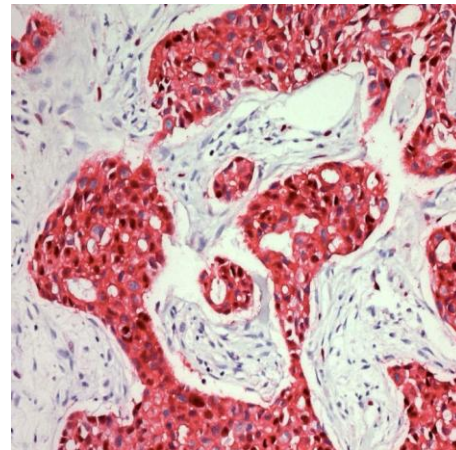


Abb. 9: Plakoglobinexpression in allen Kompartimenten im Tumor

5.1.7.2 Die Expression von Plakoglobin an der Membran

25 (26%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung alleine der Membranfärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS<0,5) als negativ bewertet (Plako-M=0).

71 (74%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung alleine der Membranfärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS>0,5) als positiv bewertet (Plako-M=1) (**Abb. 11**).

Von den 25 Plako-M negativen Patientinnen entwickelten 4 (16%) Lokalrezidive, 14 (56%) entwickelten Metastasen, 4 (16%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 13 (52%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 71 Plako-M positiven Patientinnen entwickelten 9 (12,7%) Lokalrezidive, 25 (35,2%) entwickelten Metastasen, 6 (8,5%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 20 (28,2%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 14**).

Tab. 14: Plako-M in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Plako-M=0	25	16% (n=4)	56% (n=14)	16% (n=4)	52% (n=13)
Plako-M=1	71	12,7% (n=9)	35,2% (n=25)	8,5% (n=6)	28,2% (n=20)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit der Membranfärbung von Plakoglobin. Hier zeigte sich bei positiver Membranfärbung ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,032$) (**Abb. 10**).

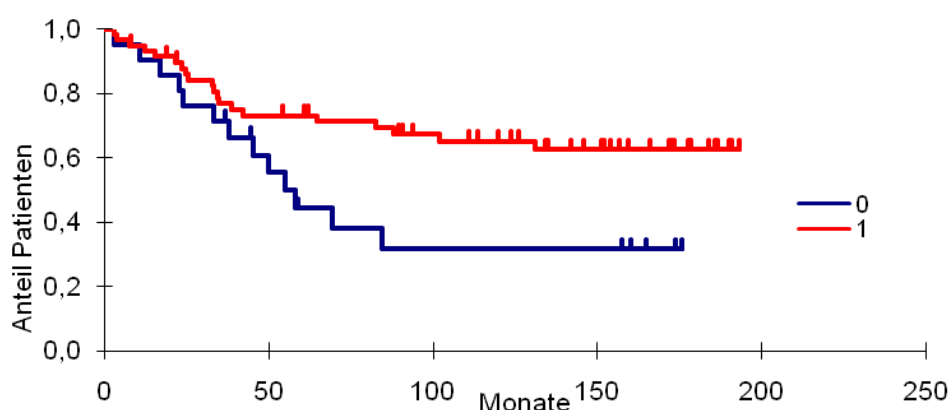


Abb. 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Plakoglobinexpression an der Membran (=Plako-M)
 0=Plako-M negativ (IRS<0,5), 1=Plako-M positiv (IRS>0,5)
 Bei positiver Plakoglobinexpression an der Membran zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,032$).

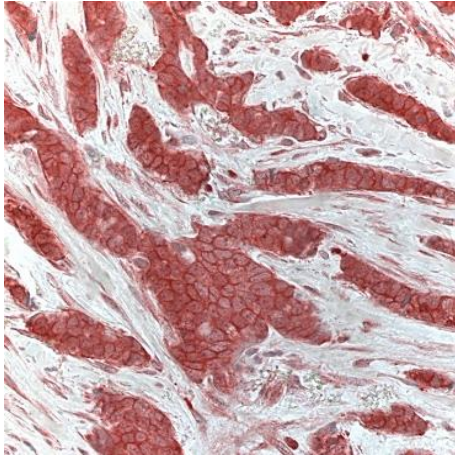


Abb. 11: Plakoglobinexpression an der Membran im Tumor

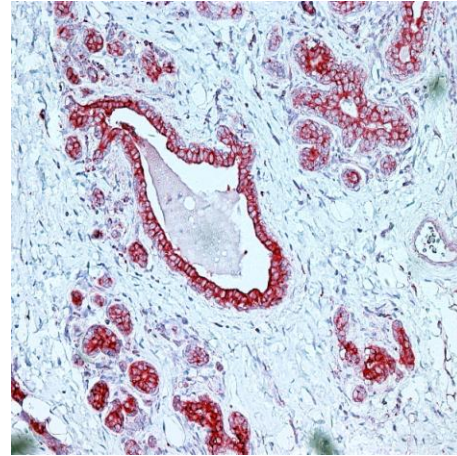


Abb. 12: Plakoglobinexpression in gesundem Mammagewebe

5.1.7.3 Die Expression von Plakoglobin im Kern

64 (66,7%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung alleine der Kernfärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS<2,5) als negativ bewertet (Plako-K=0).

32 (33,3%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung alleine der Kernfärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS>2,5) als positiv bewertet (Plako-K=1) (**Abb. 14**).

Von den 64 Plako-K negativen Patientinnen entwickelten 11 (17,2%) Lokalrezidive, 31 (48,4%) entwickelten Metastasen, 8 (12,5%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 28 (43,8%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 32 Plako-K positiven Patientinnen entwickelten 2 (6,25%) Lokalrezidive, 8 (25%) entwickelten Metastasen, 2 (6,25%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 5 (15,6%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 15**).

Im gesunden Mammaepithel wird keine Expression im Kern beobachtet. Daher überrascht die hier festgestellte prognostische Wertigkeit im Karzinom. Hypothesen hierzu werden in der Diskussion näher beleuchtet.

Tab. 15: Plako-K in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Plako-K=0	64	17,2% (n=11)	48,4% (n=31)	12,5% (n=8)	43,8% (n=28)
Plako-K=1	32	6,25% (n=2)	25% (n=8)	6,25% (n=2)	15,6% (n=5)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit der Expression von Plakoglobin im Kern. Hier zeigte sich bei positiver Plakoglobin-Expression im Kern ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,001$) (**Abb. 13**).

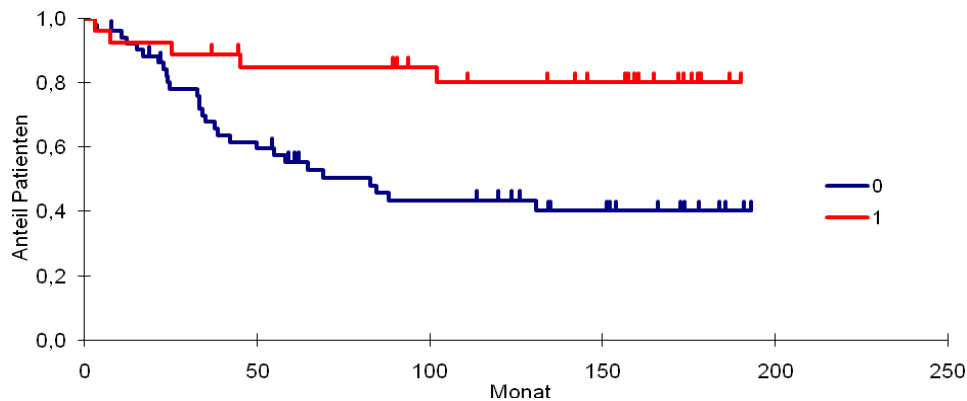


Abb. 13 : Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Plakoglobinexpression im Kern (=Plako-K)
0=Plako-K negativ (IRS<2,5), 1=Plako-K positiv (IRS>2,5)
Bei positiver Plakoglobinexpression im Kern zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,001$).

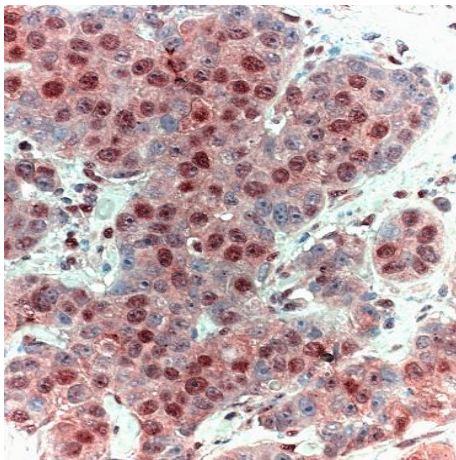


Abb. 14: Plakoglobinexpression im Kern im Tumor

5.1.7.4 Die Expression von Plakoglobin an Membran und im Zytoplasma

21 (21,9%) der 96 Präparate zeigten weder eine Membran- noch Zytoplasmafärbung (Plako-MZ=0), 44 (45,8%) der 96 Präparate zeigten sich für mind. eines der Kompartimente positiv (Plako-MZ=1) und 31 (32,3%) der 96 Präparate zeigten sowohl eine positive Membran- als auch Zytoplasmafärbung (Plako-MZ=2) (**Abb. 16**).

Von den 21 Patientinnen, die weder eine Membran- noch Zytoplasmafärbung aufwiesen, entwickelten 4 (19%) Lokalrezidive, 13 (62%) entwickelten Metastasen, 4 (19%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 13 (62%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 44 Patientinnen, die mindestens ein Kompartiment positiv gefärbt zeigten, entwickelten 2 (4,5%) Lokalrezidive, 16 (36,4%) entwickelten Metastasen, 2 (4,5%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 11 (25%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 31 Patientinnen, die sowohl eine positive Membran- als auch Zytoplasmafärbung zeigten, entwickelten 7 (22,6%) Lokalrezidive, 10 (32,3%) entwickelten Metastasen, 4 (12,9%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 9 (29%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 16**).

Tab. 16: Plako-MZ in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastase	Lokalrezidiv + Metastase	Tod durch Mammakarzinom
Plako-MZ=0	21	19% (n=4)	62% (n=13)	19% (n=4)	62% (n=13)
Plako-MZ=1	44	4,5% (n=2)	36,4% (n=16)	4,5% (n=2)	25% (n=11)
Plako-MZ=2	31	22,6% (n=7)	32,3% (n=10)	12,9% (n=4)	29% (n=9)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit gemeinsamer Membran- und Zytoplasmafärbung von Plakoglobin. Hier zeigte sich bei gleichzeitig positiver Expression von Plakoglobin an Membran und im Zytoplasma ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,016$) (**Abb. 15**).

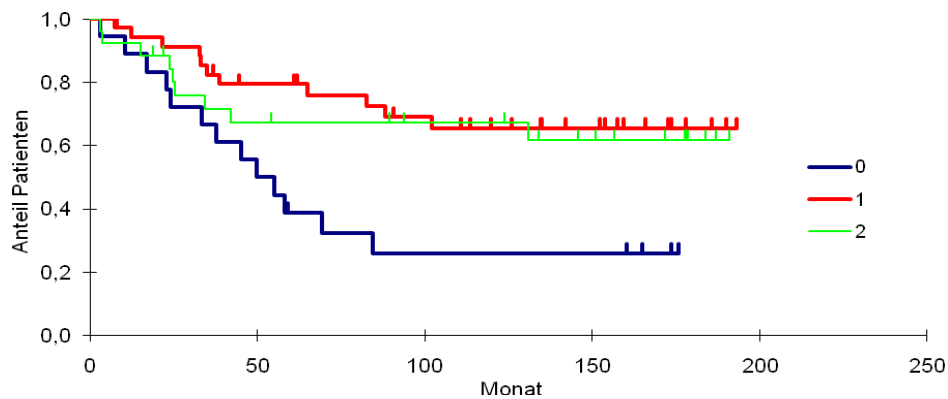


Abb. 15: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Plakoglobinexpression sowohl an der Membran als auch im Zytoplasma (=Plako-MZ)
 0= beide Kompartimente negativ, 1= mind. 1 Kompartiment positiv, 2= beide Kompartimente positiv.
 Bei positiver Plakoglobinexpression sowohl an der Membran als auch im Zytoplasma zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,016$).

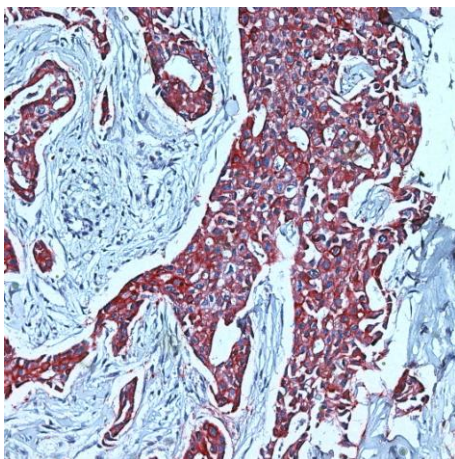


Abb. 16: Plakoglobinexpression an Membran und Zytoplasma im Tumor

5.1.7.5 Die Expression von Plakoglobin an der Membran und im Kern

17 (17,7%) der 96 Präparate zeigten weder eine Membran- noch Kernfärbung (Plako-MK=0), 55 (57,3%) der 96 Präparate zeigten sich für mind. eines der Kompartimente positiv (Plako-MK=1) und 24 (25%) der 96 Präparate zeigten sowohl eine positive Membran- als auch Kernfärbung (Plako-MK=2) (**Abb. 18**).

Von den 17 Patientinnen, die weder eine Membran- noch Kernfärbung zeigten, entwickelten 3 (17,6%) Lokalrezidive, 12 (70,6%) entwickelten Metastasen, 3 (17,6%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 12 (70,6%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 55 Patientinnen, die mind. ein Kompartiment positiv gefärbt zeigten, entwickelten 9 (16,4%) Lokalrezidive, 21 (38,2%) entwickelten Metastasen, 6 (10,9%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 17 (30,9%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 24 Patientinnen, die sowohl eine positive Membran- als auch Kernfärbung zeigten, entwickelte 1 (4,2%) Lokalrezidive, 6 (25%) entwickelten Metastasen, 1 (4,2%) entwickelte sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 4 (16,7%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 17**).

Tab. 17: Plako-MK in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastase	Lokalrezidiv + Metastase	Tod durch Mammakarzinom
Plako-MK=0	17	17,6% (n=3)	70,6% (n=12)	17,6% (n=3)	70,6% (n=12)
Plako-MK=1	55	16,4% (n=9)	38,2% (n=21)	10,9% (n=6)	30,9% (n=17)
Plako-MK=2	24	4,2% (n=1)	25% (n=6)	4,2% (n=1)	16,7% (n=4)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit gemeinsamer Membran- und Kernfärbung von Plakoglobin. Hier zeigte sich bei gleichzeitig positiver Expression von Plakoglobin an Membran und im Kern ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,0002$) (**Abb. 17**).

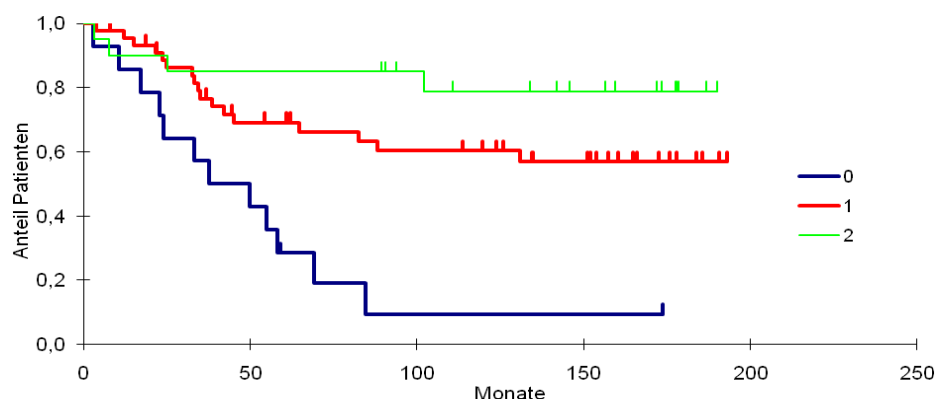


Abb. 17: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Plakoglobinexpression sowohl an der Membran als auch im Kern (=Plako-MK)
 0= beide Kompartimente negativ, 1= mind. 1 Kompartiment positiv, 2= beide Kompartimente positiv
 Bei positiver Plakoglobinexpression sowohl an der Membran als auch im Kern zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,0002$)

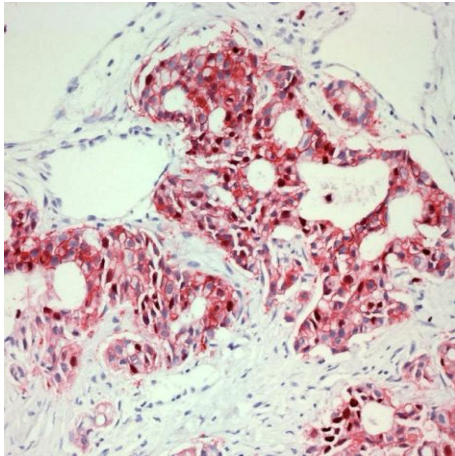


Abb. 18: Plakoglobinexpression an der Membran und im Kern im Tumor

5.1.8 Desmoglein 2 als Prognosekriterium

Im gesunden Brustdrüsengewebe färbt sich Desmoglein 2 als Adhäsionsprotein v.a. in der Membran an. Teilweise ist auch eine leichte zytosolische Färbung darstellbar, die darauf zurückzuführen ist, dass neusynthetisiertes Desmoglein 2 auf seinem Weg von den Ribosomen in die Membran das Zytosol passiert. Gleiches gilt für seinen turnusmäßigen Austausch durch den Abbau in den Proteasomen.

Eine Kernfärbung im gesunden Gewebe tritt nicht auf.

In den Tumoren zeigte sich teilweise ein sehr heterogenes Färbemuster. Vorherrschend war eine fehlende Membranfärbung. Aber im Gegensatz zum gesunden Gewebe traten teilweise auch eine ausgeprägte Zytosol- sowie Kernfärbung auf, was jeweils auf eine funktionelle Störung hindeuten könnte.

Daher überprüften wir sowohl alle Kompartimente zusammen als auch einzeln in Hinblick auf ihre Wertigkeit als Prognosekriterium.

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit einigen Expressionsmustern von Desmoglein 2, was im Folgenden detailliert aufgezeigt werden soll.

Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens, des metastasenfremen Überlebens bzw. des Überlebens bei gleichzeitigem Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen zeigten sich jeweils keine signifikanten Korrelationen in der statistischen Analyse für Desmoglein 2.

5.1.8.1 Die Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung aller Kompartimente

38 (39,6%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung aller Kompartimente im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS<6,5) als negativ bewertet (Desmo-gesamt=0).

58 (60,4%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung aller Kompartimente im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS>6,5) als positiv bewertet (Desmo-gesamt=1) (**Abb. 20**).

Von den 38 Desmo-gesamt negativen Patientinnen entwickelten 6 (15,8%) Lokalrezidive, 21 (55,3%) entwickelten Metastasen, 4 (10,5%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 20 (52,6%) verstarben am Mammakarzinom. Von den 58 Desmo-gesamt positiven Patientinnen entwickelten 7 (12,1%) Lokalrezidive, 18 (31%) entwickelten Metastasen, 6 (10,3%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 13 (22,4%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 18**).

Tab. 18: Desmo-gesamt in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Desmo-gesamt =0	38	15,8% (n=6)	55,3% (n=21)	10,5% (n=4)	52,6% (n=20)
Desmo-gesamt =1	58	12,1% (n=7)	31% (n=18)	10,3% (n=6)	22,4% (n=13)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit der Expression von Desmoglein 2 in allen Kompartimenten. Hier zeigte sich mit positiver Desmoglein 2-gesamt-Expression ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log Rank-Test: p<0,0003) (**Abb. 19**).

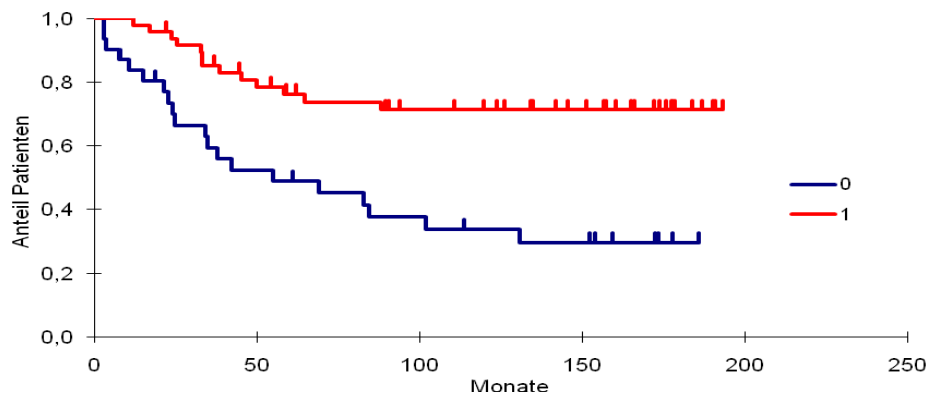


Abb. 19: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Desmoglein 2-Expression aller Kompartimente gemeinsam (=Desmo-gesamt)
 0=Desmo-gesamt negativ (IRS<6,5), 1=Desmo-gesamt positiv (IRS>6,5)
 Bei positiver Desmoglein 2-gesamt-Expression zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,0003$).

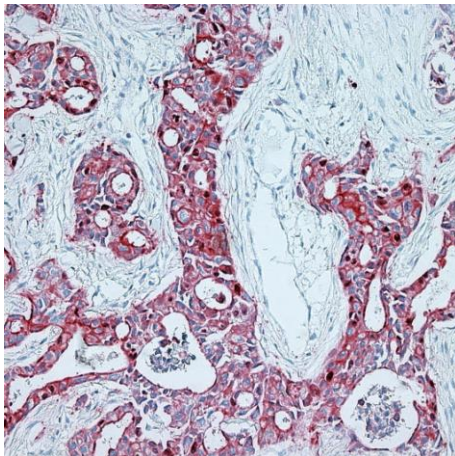


Abb. 20: Desmoglein 2-Expression in allen Kompartimenten im Tumor

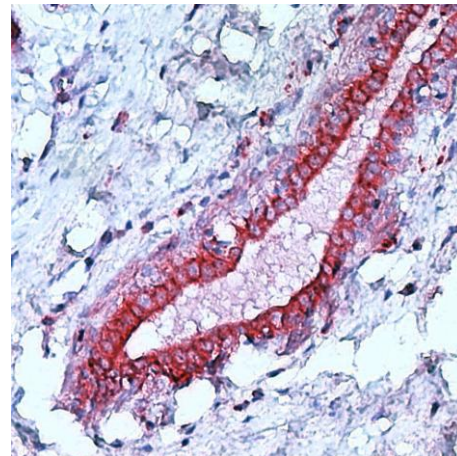


Abb. 21: Desmoglein 2-Expression im gesunden Mammagewebe

5.1.8.2 Die Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung aller Kompartimente bis auf den Kern

Da die beobachtete Expression von Desmoglein 2 im Zellkern bisher noch nicht beschrieben wurde, wurden die Daten zusätzlich ohne Fälle mit Kernexpression analysiert, da ein Färbeartefakt nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

55 (57,3%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 im Tumor unter Berücksichtigung aller Kompartimente bis auf den Kern hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS<4,5) als negativ bewertet (Desmo-1=0).

41 (42,7%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 im Tumor unter Berücksichtigung aller Kompartimente bis auf den Kern hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS>4,5) als positiv bewertet (Desmo-1=1) (**Abb. 23**).

Von den 55 Desmo-1-negativen Patientinnen entwickelten 9 (16,4%) Lokalrezidive, 30 (54,5%) entwickelten Metastasen, 7 (12,7%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 27 (49,1%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 41 Desmo-1-positiven Patientinnen entwickelten 4 (9,8%) Lokalrezidive, 9 (22%) entwickelten Metastasen, 3 (7,3%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 6 (14,6%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 19**).

Tab. 19: Desmo-1 in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Desmo-1 =0	55	16,4% (n=9)	54,5% (n=30)	12,7% (n=7)	49,1% (n=27)
Desmo-1 =1	41	9,8% (n=4)	22% (n=9)	7,3% (n=3)	14,6% (n=6)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit der Expression von Desmoglein 2 im Tumor unter Berücksichtigung aller Kompartimente bis auf den Kern.

Hier zeigte sich mit positiver Desmo-1-Expression ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,0001$) (**Abb. 22**).

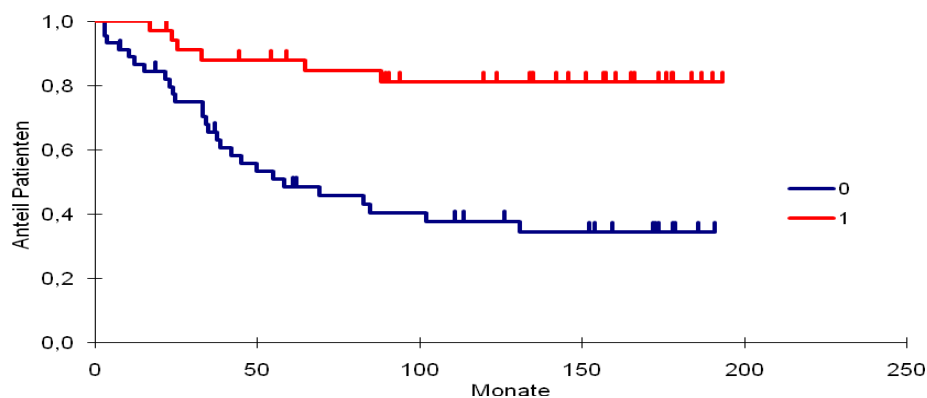


Abb. 22: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Desmoglein 2-Expression ohne Berücksichtigung der Kernfärbung (=Desmo-1)
 0=Desmo-1 negativ (IRS<4,5), 1=Desmo-1 positiv (IRS>4,5)
 Bei positiver Desmoglein 2-Expression ohne Berücksichtigung der Kernfärbung zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,0001$).

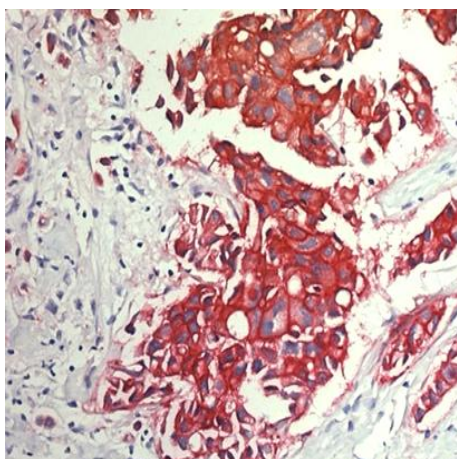


Abb. 23: Desmoglein 2-Expression an Membran und im Zytosol im Tumor

5.1.8.3 Die Expression von Desmoglein 2 an der Membran

84 (87,5%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung alleine der Membranfärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS<3,5) als negativ bewertet (Desmo-M=0).

12 (12,5%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung alleine der Membranfärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS>3,5) als positiv bewertet (Desmo-M=1) (**Abb. 25**).

Von den 84 Desmo-M negativen Patientinnen entwickelten 11 (13,1%) Lokalrezidive, 38 (45,2%) entwickelten Metastasen, 9 (10,7%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 32 (38,1%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 12 Desmo-M positiven Patientinnen entwickelten 2 (16,7%) Lokalrezidive, 1 (8,3%) entwickelte Metastasen, 1 (8,3%) entwickelte sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 1 (8,3%) verstarb am Mammakarzinom (**Tab. 20**).

Tab. 20: Desmo-M in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Desmo-M=0	84	13,1% (n=11)	45,2% (n=38)	10,7% (n=9)	38,1% (n=32)
Desmo-M=1	12	16,7% (n=2)	8,3% (n=1)	8,3% (n=1)	8,3% (n=1)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit der Membranfärbung von Desmoglein 2. Hier zeigte sich bei positiver Membranfärbung ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: p<0,028) (**Abb. 24**).

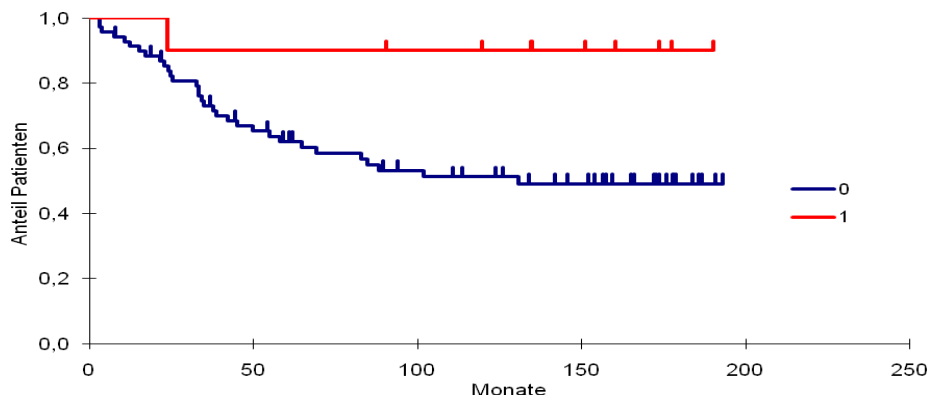


Abb. 24: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Desmoglein 2-Expression an der Membran (=Desmo-M)
 0=Desmo-M negativ (IRS<3,5), 1=Desmo-M positiv (IRS>3,5)
 Bei positiver Desmoglein 2-Expression an der Membran zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,028$).

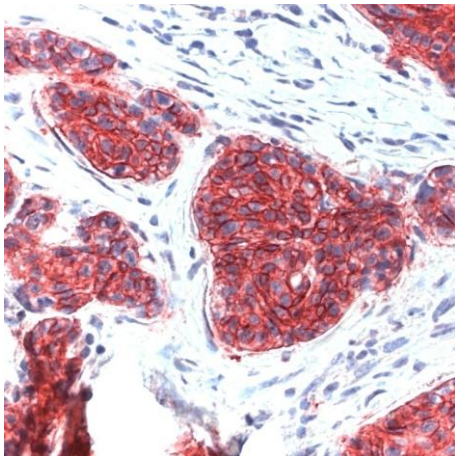


Abb. 25: Desmoglein 2-Expression an der Membran im Tumor

5.1.8.4 Die Expression von Desmoglein 2 im Zytoplasma

60 (62,5%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung alleine der Zytoplasmafärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS<2,5) als negativ bewertet (Desmo-Z=0).

36 (37,5%) der 96 Präparate wurden aufgrund ihrer Expression von Desmoglein 2 unter Berücksichtigung alleine der Zytoplasmafärbung im Tumor hinsichtlich des Gesamtüberlebens (IRS>2,5) als positiv bewertet (Desmo-Z=1) (**Abb. 27**).

Von den 60 Desmo-Z negativen Patientinnen entwickelten 9 (15%) Lokalrezidive, 28 (46,7%) entwickelten Metastasen, 6 (10%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 25 (41,7%) verstarben am Mammakarzinom.

Von den 36 Desmo-Z positiven Patientinnen entwickelten 4 (11,1%) Lokalrezidive, 11 (30,6%) entwickelten Metastasen, 4 (11,1%) entwickelten sowohl Metastasen als auch Lokalrezidive und 8 (22,2%) verstarben am Mammakarzinom (**Tab. 21**).

Tab. 21: Desmo-Z in Bezug auf die untersuchten Ereignisse des Kollektivs

	n°	Lokalrezidiv	Metastasen	Lokalrezidiv + Metastasen	Tod durch Mammakarzinom
Desmo-Z =0	60	15% (n=9)	46,7% (n=28)	10% (n=6)	41,7% (n=25)
Desmo-Z =1	36	11,1% (n=4)	30,6% (n=11)	11,1% (n=4)	22,2% (n=8)

n° = Anzahl der Patienten

Das Gesamtüberleben korrelierte signifikant mit der Zytoplasmafärbung von Desmoglein 2. Hier zeigte sich bei positiver Zytoplasmafärbung ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,007$) (**Abb. 26**).

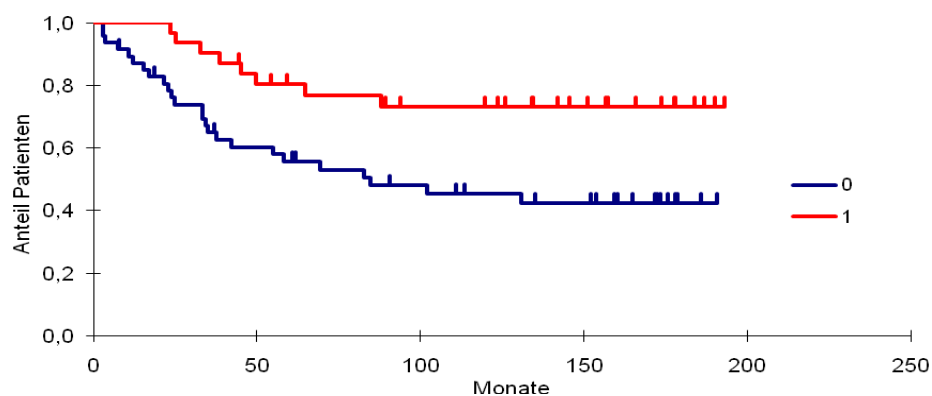


Abb. 26: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Desmoglein 2-Expression im Zytoplasma (=Desmo-Z)
 0=Desmo-Z negativ (IRS<2,5), 1=Desmo-Z positiv (IRS>2,5)
 Bei positiver Desmoglein 2-Expression im Zytoplasma zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben (Log-Rank-Test: $p < 0,007$).

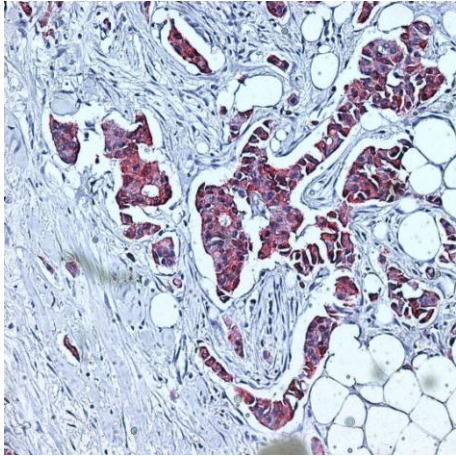


Abb 27: Desmoglein 2-Expression im Zytoplasma im Tumor

5.1.8.5 Die Expression von Desmoglein 2 im Kern

Vereinzelt konnten wir in unseren Präparaten Kernfärbung von Desmoglein 2 nachweisen (**Abb. 28**), die mit verlängerter Metastasenfreiheit assoziiert war. Aufgrund der kleinen Fallzahl konnten allerdings keine Signifikanzen berechnet werden.

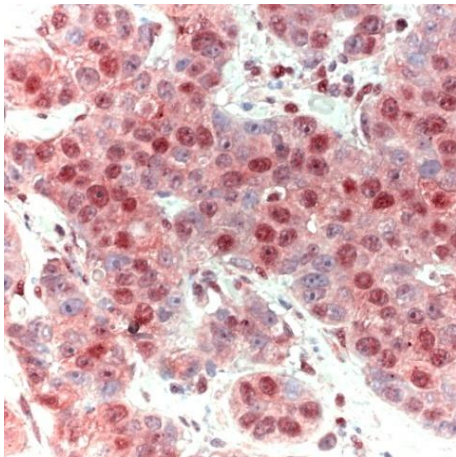


Abb. 28: Desmoglein 2-Expression im Kern im Tumor

5.2. Kombinierte Analysen

Multivariate Zusammenhänge der unabhängigen Variablen (Prognosefaktoren) wurden in Regressionsanalysen nach Cox untersucht.

5.2.1 Multivariate Analyse der Plakoglobinvariablen

Wie in den Einzelanalysen zeigten sich keine statistischen Signifikanzen der Plakoglobinvariablen in Bezug auf das Auftreten von Metastasen, Lokalrezidiven bzw. Metastasen und Lokalrezidiven gemeinsam.

In Bezug auf die Überlebenszeit zeigten sich bis auf Plako-Z alle Plakoglobinvariablen statistisch signifikant (**Tab. 22-24**).

Der Lymphknotenstatus, das Grading sowie die Tumorgöße wurden dabei als Prognosefaktoren stets statistisch übertroffen.

Tab. 22: Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox in Bezug auf Plakoglobin und die Färbung aller Kompartimente

	Plako-gesamt	N	T	G
OS	p<0,001	p<0,008	p<0,07	p<0,02

OS=Gesamtüberleben Plako-gesamt=alle Kompartimente N=Lymphknotenstatus
T=Tumorgöße G=Grading

Tab. 23: Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox in Bezug auf Plakoglobin und seine Membranfärbung

	Plako-M	N	T	G
OS	p<0,008	p<0,01	p<0,06	p<0,05

OS=Gesamtüberleben Plako-M=Membranfärbung von Plakoglobin N=Lymphknotenstatus
T=Tumorgöße G=Grading

Tab. 24: Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox in Bezug auf Plakoglobin und seine Kernfärbung

	Plako-K	N	T	G
OS	p<0,003	p<0,01	p<0,16	p<0,01

OS=Gesamtüberleben Plako-K=Kernfärbung von Plakoglobin N=Lymphknotenstatus
T=Tumorgöße G=Grading

5.2.2 Multivariate Analyse der Desmogleinvariablen

Wie in den Einzelanalysen zeigten sich keine statistischen Signifikanzen der Desmogleinvariablen in Bezug auf das Auftreten von Metastasen, Lokalrezidiven bzw. Metastasen und Lokalrezidiven gemeinsam.

In Bezug auf die Überlebenszeit zeigten sich bis auf Desmo-Z und Desmo-K alle Desmogleinvariablen statistisch signifikant (**Tab. 25-27**).

Der Lymphknotenstatus, das Grading sowie die Tumorgöße wurden dabei als Prognosefaktoren stets statistisch übertroffen.

Tab. 25: Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox in Bezug auf Desmoglein 2 und die Färbung aller Kompartimente

	Desmo-gesamt	N	T	G
OS	p<0,01	p<0,02	p<0,27	p<0,05

OS=Gesamtüberleben Desmo-gesamt=alle Kompartimente N=Lymphknotenstatus
T=Tumorgöße G=Grading

Tab. 26: Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox in Bezug auf Desmoglein 2 und die Färbung aller Kompartimente bis auf den Kern

	Desmo-1	N	T	G
OS	p<0,001	p<0,03	p<0,31	p<0,04

OS=Gesamtüberleben Desmo-1=alle Kompartimente bis auf den Kern N=Lymphknotenstatus
T=Tumorgöße G=Grading

Tab. 27: Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox in Bezug auf Desmoglein 2 und seine Membranfärbung

	Desmo-M	N	T	G
OS	p<0,001	p<0,02	p<0,22	p<0,03

OS=Gesamtüberleben Desmo-M=Membranfärbung von Desmoglein 2 N=Lymphknotenstatus
T=Tumorgöße G=Grading

5.3. Univariate Analyse der Parameter

5.3.1 Analyse von Plakoglobin auf die untersuchten Parameter

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer Plakoglobinexpression und dem Lymphknotenstatus, der Tumorgöße, dem Her2/neu- oder ER-Status herstellen. Das heißt Plakoglobin und seine Variablen können von diesen als unabhängig gelten.

Bei niedriger Plakoglobin-gesamt- bzw. Plako-M-Expression wurde dagegen überdurchschnittlich häufig ein hohes Grading beobachtet. Dies ergab eine statistisch signifikante Korrelation (Plako-gesamt $p < 0,04$; Plako-M $p < 0,06$).

5.3.2 Analyse von Desmoglein 2 auf die untersuchten Parameter

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer Desmogleinexpression und dem Lymphknotenstatus, der Tumorgroße, dem Grading, dem Her2/neu- oder ER-Status herstellen. Das heißt Desmoglein 2 und seine Variablen können von diesen als unabhängig gelten.

5.4. Expression von Plakoglobin in kultivierten Mammakarzinomzellen

An etablierten humanen Mammakarzinom-Zelllinien, die sich in Differenzierung und Aggressivität deutlich unterscheiden, wurde die Expression von Plakoglobin per Western Blot bestimmt und mit ihrer Invasivität in Boydenkammern als Parameter der Malignität verglichen (**Tab. 28**)

Tab. 28: Plakoglobinexpression im Western Blot und Invasivität, bestimmt in Transwell-Experimenten von sieben Mammakarzinom-Zelllinien

Zelllinie	Plakoglobinexpression [AU]	Invasivität [OD]
MDA-MB 231	$0,09 \pm 0,06$	$0,526 \pm 0,027$
MDA-MB 231-K18	$21,19 \pm 2,50$	$0,100 \pm 0,042$
MDA-MB 435	$0,26 \pm 0,17$	$0,451 \pm 0,093$
SK-BR 3	$3,79 \pm 1,92$	$0,650 \pm 0,061$
ZR 75-1	$14,16 \pm 2,91$	$0,314 \pm 0,052$
MCF 7	$17,48 \pm 2,07$	$0,141 \pm 0,050$
MCF 7-LCC2	$6,17 \pm 2,53$	$0,411 \pm 0,039$

AU= arbitrary unit; OD= optical density

Die Messwerte zeigen, dass zwischen beiden eine ausgeprägte inverse Korrelation besteht. Besonders deutlich wird die reziproke Proportionalität in einer grafischen Darstellung (Abb. 29)

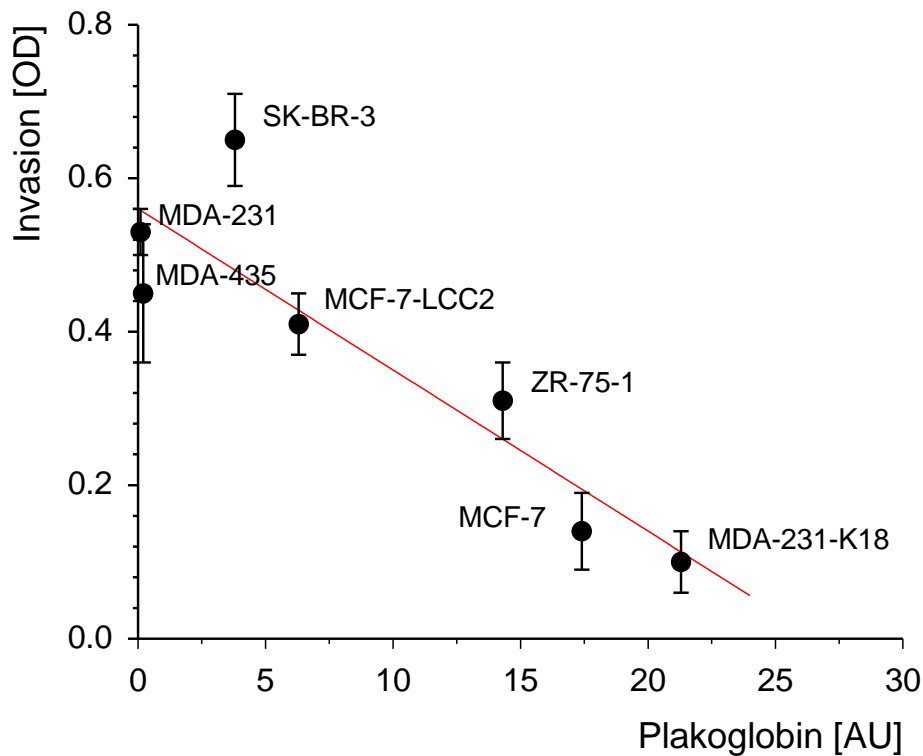


Abb. 29 : Korrelation von Plakoglobinexpression und Invasivität bei verschiedenen humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Die Proteinexpression wurde in Western Blots ermittelt, die Invasivität in Transwell-Experimenten (n= 3).

Je höher die Expression desto geringer die Invasivität und damit auch die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung. Die Punkte liegen nahe bei der Regressionsgeraden, was auf eine sehr gute Korrelation der beiden Parameter hinweist. SK-BR-3-Zellen korrelieren etwas schlechter und zeigen eine gesteigerte Invasivität in Relation zur Plakoglobinexpression. Dies ist wahrscheinlich dem Umstand geschuldet, dass sie als einzige der untersuchten Zelllinien Her2/neu-positiv sind. Von besonderem Interesse sind die beiden Paare MCF-7/MCF-7-LCC2 und MDA-231/ MDA-231-K18, da sich Wildtyp und Subklon in ihrer Aggressivität deutlich unterscheiden. Auch hier wird eine eindeutige Korrelation von hoher Plakoglobinexpression und niedriger Malignität beobachtet. Diese ist besonders aussagekräftig, da die Paare in ihrer genetischen Ausstattung jeweils identisch sind und so vielerlei Fremdeinflüsse ausgeschlossen werden können.

6. Diskussion

Unsere derzeitigen Möglichkeiten, einen in seiner Verhaltensweise so vielfältigen Tumor wie das Mammakarzinom ausreichend einschätzen zu können, sind im individuellen Fall nicht immer zufriedenstellend. Das wesentliche Malignitätskriterium des Mammakarzinoms ist seine Metastasierungsfähigkeit, da mit der Absiedlung von Tumorzellen ein Übergang von einer lokalisierten in eine systemische Erkrankung stattfindet. Trotz aller therapeutischen Möglichkeiten verschlechtert sich damit die Prognose der Patientin entscheidend.

Anhand von Prognosekriterien wie Lymphknotenstatus, Tumorgröße, Grading, Hormonrezeptorstatus und Her2/neu-Status versucht man den wahrscheinlichen Krankheitsverlauf abzuschätzen.

Sie gelten unter Berücksichtigung des Menopausenstatus, der peritumoralen Gefäßinvasion sowie des Alters der Patientin als die Entscheidungskriterien für eine adjuvante Therapie⁸⁷ (Konsensuskonferenz St. Gallen, 2013).

Trotzdem ist für einen Teil der behandelten Frauen die adjuvante Therapie ineffektiv oder überflüssig. Die ideale Therapie sollte möglichst genau auf den individuellen Tumor zugeschnitten sein.

Spezifische prognostische und prädiktive Marker

Mit einer adjuvanten Chemotherapie auf Basis dieser allgemeinen Kriterien wird ein Teil der Patientinnen übertherapiert mit beträchtlichen Nebenwirkungen bei hohen Kosten. Daher werden neue prognostische Parameter benötigt, die einerseits genaue Informationen über das individuelle Tumorverhalten geben sowie andererseits die molekularbiologischen Gesetzmäßigkeiten der Krankheit besser verständlich machen. Solche Biomarker könnten das Potential eines Tumors zur Invasion und Metastasierung aufzeigen und somit Patienten, die eine intensive Therapie benötigen, identifizieren und solche, bei denen kein Metastasierungsrisiko besteht, aussparen⁸⁰.

Ein gutes Beispiel für solch einen Biomarker ist das Onkogen Her2/neu, auch c-neu oder c-erb-B2 genannt, welches in verschiedensten Karzinomen, vor allem aber im Mammakarzinom nachgewiesen werden kann. Es handelt sich dabei um ein

transmembranöses Phosphoglykoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität, das mit dem Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR) homolog ist^{88,89}.

Neben der Steigerung der Proliferation scheint ein weiterer Wirkmechanismus von Her2/neu die Störung der Zelladhäsion zu sein, wodurch Tumorzellen eine Ablösung aus dem Gewebeverband erleichtert wird.

Ein Verlust von Zell-Zell-Kontakten durch EGFR-induzierte Tyrosinphosphorylierung sowohl von klassischen als auch von desmosomalen Cadherinen und Cateninen ist bekannt⁶⁵.

Hier wurde bisher vor allem eine Schädigung der E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakte durch Phosphorylierung von β -Catenin beschrieben^{76,77,78}.

Mit Etablierung des Onkogens Her2/neu als wichtigem Prognosekriterium beim Mammakarzinom konnte durch eine zielgerichtete Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab eine signifikante Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens bei Her2/neu-positiven Patientinnen erreicht werden⁹⁰.

Zu den neueren prognostischen Markern zählt auch das Protein u-PA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) und dessen Gegenspieler PAI-1 (Plasminogen Aktivator-Inhibitor). In Studien konnte belegt werden, dass bei Brustkrebs-Patientinnen im Frühstadium, bei denen keine Lymphknoten befallen sind, ein niedriger uPA/PAI-1-Anteil im Tumorgewebe ein zuverlässiger Prognosefaktor für ein geringes Rückfallrisiko ist. Diesen Patientinnen – in Studien immerhin mehr als ein Drittel aller Betroffenen – kann eine begleitende Chemotherapie erspart bleiben, ohne ihr Risiko, erneut zu erkranken, zu erhöhen⁷⁹.

Frixen and Nagamine⁹¹ beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Expression von E-Cadherin und uPA. So kommt es in Mammakarzinomgewebe, in welchem die Expression von E-Cadherin in vitro geblockt wurde, zu einem Anstieg der uPA-Expression und somit zu einem erhöhten Invasionspotential des Tumors. Ähnliche Zusammenhänge könnten für das desmosomale Cadherin Desmoglein 2 vermutet werden. Studien hierzu liegen bislang jedoch nicht vor.

Zusätzlich zu diesen beiden prognostischen Markern erscheinen weitere Prognosekriterien für das Mammakarzinom sinnvoll.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die desmosomalen Proteine Plakoglobin und Desmoglein 2 auf ihre diesbezügliche Eignung überprüft und ihre Wertigkeit mit

etablierten Parametern verglichen. Durch diesen Kontext sollte nicht nur ihre Güte ermittelt, sondern auch sichergestellt werden, dass das gewählte Patientinnenkollektiv repräsentativ ist.

Patientinnenkollektiv

Die Untersuchungen wurden an einem Kollektiv von 96 Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinom erhoben, bei dem eine ausgesprochen lange Nachbeobachtung von bis zu über 17 Jahren durchgeführt werden konnte.

In unserem Kollektiv bestätigten sich die gängigen Prognosefaktoren als valide.

Ein positiver Lymphknotenstatus korrelierte signifikant mit einer schlechteren Prognose sowohl hinsichtlich des Gesamtüberlebens als auch des rezidivfreien Überlebens.

Mit zunehmender Tumorgröße zeigte sich ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben.

Mit zunehmendem Grading verkürzte sich sowohl das Gesamtüberleben als auch das metastasenfreie Überleben.

Bei negativem Östrogenrezeptorstatus verkürzte sich sowohl das Gesamtüberleben als auch das metastasenfreie Überleben. Hier zeigte sich auch der prozentuale Anteil Hormonrezeptor-positiver Frauen repräsentativ.

Als interessante Beobachtung in Studien beschreiben Bracke et al. einen möglichen Zusammenhang zwischen Tamoxifen und der Wiederherstellung defekter Cadherin-Catenin-Komplexe in Mammakarzinomgewebe⁹².

Her2/neu ist ein Prognoseparameter, welcher mit einer hohen Metastasierungsrate und Mortalität verbunden ist.

In unserem Kollektiv erreichte die Her2/neu-Expression allerdings keine statistische Signifikanz, was am ehesten auf die begrenzte Fallzahl zurückzuführen ist.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Untersuchungen zeigen, dass auch K18 als Prognosefaktor geeignet ist^{61,81,85}. Im hier untersuchten Kollektiv korrelierte das metastasenfreie Überleben signifikant mit der K18-Expression, jedoch nicht das Gesamtüberleben.

Zusammengenommen zeigen all diese Befunde, dass das Patientinnenkollektiv insgesamt repräsentativ ist und die Aussagen bezüglich der Eignung von Plakoglobin

und Desmoglein 2 als prognostische Faktoren wahrscheinlich verallgemeinert werden können.

Plakoglobin als Prognosefaktor

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Resultate von Plakoglobin zeigen, dass es ein hervorragendes Prognosekriterium darstellt. Da in der Literatur nur wenige Daten zur prognostischen Wertigkeit von Plakoglobin beim Mammakarzinom verfügbar sind, wurde „Neuland“ betreten und es wurden daher alle zellulären Lokalisationen von Plakoglobin sowohl gemeinsam als auch getrennt voneinander untersucht.

Von seiner Funktion als wichtiger Bestandteil zweier zellulärer Adhäsionsstrukturen, den Adherens Junctions und den Desmosomen, war zu vermuten, dass v.a. eine Lokalisation in der Membran ein Prognosekriterium darstellen könnte. Es zeigte sich jedoch, dass auch andere Lokalisationen aussagekräftig sind.

Betrachtet man die Karzinom-assoziierten Sterbefälle, so findet man in der Plakoglobin-positiven Gruppe bei beliebiger Lokalisation des Proteins 27,3% verstorbene Patientinnen gegenüber 56,5% in der Plakoglobin-negativen Kohorte. Ein ganz ähnlicher Wert von 28,2% verstorbenen Patientinnen findet sich bei Lokalisation des Proteins in der Membran.

Eine noch bessere Prognose haben jedoch Patientinnen, bei denen Plakoglobin im Zellkern lokalisiert ist. Aus dieser Gruppe verstarben lediglich 15,6% während des Beobachtungszeitraums. Dieser Befund ist überraschend, da im gesunden Mammaepithel keine Plakoglobinexpression im Kern beobachtet wird.

Dennoch erweist sich hier die Plakoglobinfärbung im Zellkern als positiver Prognosefaktor. Wir vermuten, dass dies mit der spezifisch veränderten Signaltransduktion im Tumor zusammenhängt. β -Catenin transloziert in Tumoren mit aktiviertem Wnt-Signalweg in den Kern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor proliferativ und anti-apoptotisch. Nur über die Wnt-Kaskade kann β -Catenin in den Kern eingeschleust werden. In gesundem Gewebe ist es im E-Cadherin-Komplex fixiert. Möglicherweise nutzt Plakoglobin im Tumor denselben Mechanismus wie β -Catenin, um in den Kern einzudringen und verdrängt es dort kompetitiv von seinen Bindungsstellen am Genom. Hierfür spricht, dass Plakoglobin (= γ -Catenin) eine hohe

Sequenzhomologie zu β -Catenin aufweist. Beide verfügen über mehrere identische Armadillo-Repeats.

Ein ganz ähnlicher Wert für die Sterberate findet sich mit 16,7% für jenes Kollektiv mit gleichzeitiger Lokalisation von Plakoglobin sowohl im Kern als auch in der Membran. Die zusätzliche Membranlokalisation verbessert also den günstigen Wert der Kernexpression nicht noch zusätzlich. Andererseits ist die Prognose für Patientinnen, die weder Kern- noch Membranexpression aufweisen, extrem schlecht: 70,6% dieses Kollektivs verstarben an der Tumorerkrankung.

Dadurch stellt die Kombination von Membran- und Kernfärbung ein überragendes Prognosekriterium dar, das der Evaluation des Lymphknotenstatus eindeutig überlegen war.

Auch die In-vitro-Experimente bestätigen Plakoglobin als geeigneten Marker für die Aggressivität von kultivierten Mammakarzinom-Zellen. Als Maß für die Aggressivität der Tumorzellen wurde ihre Invasivität gewählt. Untersucht wurde, wie gut sie eine künstliche Basalmembran durchdringen können. Es zeigte sich, dass ein Verlust der Plakoglobinexpression eng mit einer gesteigerten Invasivität der Zellen und damit mit ihrem metastatischen Potential korreliert. Die drei als aggressiv bekannten Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 435 und SK-BR-3 zeigten keine oder nur geringe Plakoglobinexpression bei hoher Invasivität, während die gut differenzierten Zelllinien ZR-75-1 und MCF 7 (beide sind Östrogenrezeptor-positiv) eine deutliche Plakoglobinexpression bei nur geringer Invasivität aufwiesen.

Am anschaulichsten ist der Vergleich der beiden Subklone MDA-MB 231-K18 und MCF 7-LCC2 mit der jeweiligen Mutterlinie. Durch Transfektion des Keratin 18-Gens in MDA-MB 231-Zellen wurde eine ausgeprägte Re-Expression von Plakoglobin induziert und gleichzeitig die hohe Invasivität der Mutterlinie stark eingeschränkt. Der transfizierte Klon zeigt die höchste Plakoglobinexpression und gleichzeitig die geringste Invasivität aller untersuchten Zelllinien. Die Invasivität in vitro ist übereinstimmend mit früheren Tierexperimenten⁸¹: Nach orthotoper Inokulation von Wildtyp-Zellen wurden Metastasen in Lunge, Leber und Knochen nachgewiesen, während der Subklon nicht tumorigen war. Die inokulierten Zellen waren nicht in der Lage, einen lokalen Tumor zu etablieren, Absiedlungen waren nicht nachweisbar.

Bei der Paarung MCF 7 und Subklon LCC2 ist es genau umgekehrt. Während die Mutterlinie Plakoglobin exprimiert und nur schwach invasiv ist, hat der metastatische Subklon das Membranprotein weitgehend verloren und ist gleichzeitig erheblich invasiver als die Mutterlinie.

Diese eindeutige Korrelation von hoher Plakoglobinexpression und niedriger Malignität in den verwandten Zellklonen ist besonders aussagekräftig, da die Paare in ihrer genetischen Ausstattung jeweils identisch sind und so vielerlei Fremdeinflüsse ausgeschlossen werden können, die Fehlinterpretationen verursachen könnten.

Insgesamt korreliert Plakoglobin mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen. Alle Zelllinien mit deutlicher Plakoglobinexpression exprimieren auch den Östrogenrezeptor und die Keratine 8/18 des gesunden Mammaepithels (Daten hier nicht gezeigt).

In der Literatur finden sich einige Publikationen, die ebenfalls die Eignung von Plakoglobin als Prognosefaktor belegen.

Ueda et al. zeigten, dass Plakoglobin beim oralen Plattenepithelkarzinom einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt und dass verminderte bzw. nicht vorhandene Membranfärbung signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben und einer erhöhten Metastasenwahrscheinlichkeit einhergeht⁵.

Clairotte et al.³² zeigen Plakoglobin als unabhängigen Prognoseparameter beim Blasenkarzinom, der mit signifikant erhöhtem Auftreten von Metastasen bei verminderter Membranfärbung einhergeht.

In weiteren Studien über epitheliale Tumoren wurde ein Zusammenhang mit einem erhöhten Metastasenrisiko bzw. schlechterem Gesamtüberleben bei verminderter Plakoglobinexpression beschrieben²⁵⁻³⁵. Aberle et al.²⁵ stellen das Plakoglobin als mögliches Tumorsuppressorgen für das Mamma- bzw. Ovarialkarzinom dar. Bukholm et al.⁹³ untersuchten den Zusammenhang der Expression des Cadherin-Catenin-Komplexes (E-Cadherin, alpha-, beta- und gamma-catenin) und der Auftrittswahrscheinlichkeit von Metastasen beim Mammakarzinom und zeigten signifikante Ergebnisse bzgl. der Auftrittswahrscheinlichkeit von Metastasen, wenn alle vier Proteine als eine Gruppe analysiert wurden und mindestens eines der Proteine eine verminderte Expression zeigte. Betrachtete man die Proteine alleine, zeigten sich keine Signifikanzen. Sie nahmen daraufhin an, dass ein Zusammenhang zwischen dem

Expressionsverlust von einem der Proteine alleine die Funktion der anderen bezüglich der Verhinderung von Metastasen verändert.

In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von Plakoglobin die Invasivität maligner Zellen drastisch reduziert und das unabhängig von einem intakten Cadherin-Catenin-Komplex⁵⁹.

Auch für eine Lokalisation von Plakoglobin im Kern finden sich Hinweise in der Literatur, deren prognostische Relevanz jedoch insgesamt widersprüchlich ist.

Von im Zellkern lokalisiertem Plakoglobin wird berichtet, dass es die Tumoraggressivität unterdrückt⁵⁹. Cho⁵¹ beschreibt beim Ovarialkarzinom jedoch, dass nukleäres Plakoglobin mit Tumorprogression und höheren FIGO-Stadien korreliert ist. Pirinen hingegen⁶⁰ findet beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom keinen Einfluss von nukleärem Plakoglobin auf das Gesamtüberleben. Ueda⁵ beschreibt beim oralen Plattenepithelkarzinom vermehrt nukleäres Plakoglobin, welches aber nicht signifikant mit dem Auftreten von Metastasen bzw. dem Gesamtüberleben korreliert.

Insgesamt scheint Plakoglobin ein ausgezeichneter Prognosefaktor zu sein. Zum einen ist es ein Differenzierungsmarker, da es als einziges Protein sowohl in den Adherens Junctions als auch in den Desmosomen vorkommt und damit an über 90% der epithelialen Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist. Es stellt somit einen ausgezeichneten Parameter für den Differenzierungsverlust im Zuge der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) dar. Sein Verlust korreliert daher eng mit der zunehmenden Aggressivität des Karzinoms. Zum anderen könnte es über seine Homologie mit β -Catenin in die Tumor-spezifische Signaltransduktion des Wnt-Wegs eingreifen.

Freies β -Catenin ist hier als Transkriptionsfaktor an der Ausbildung eines aggressiven Phänotyps von Malignomen beteiligt. De-differenzierte Karzinome erfahren so nicht nur einen Verlust an zellulärer Adhäsion und Integrität des Gewebeverbandes, sondern gewinnen zusätzlich auch noch Proliferationssignale durch freigesetztes β -Catenin^{27,28,29}. Als unabhängiger Prognosefaktor für ein signifikant verschlechtertes Gesamtüberleben wird eine Überexpression von β -catenin im Nukleus beim kolorektalen Karzinom beschrieben⁹⁴.

Wie oben ausgeführt, könnte im Kern lokalisiertes Plakoglobin allerdings die Wirkung von β -Catenin hemmen, indem es dessen Bindungsstellen am Genom kompetitiv besetzt. Einige Autoren schreiben im Nukleus befindlichen Plakoglobin eine Tumorsuppressorfunktion zu, indem es β -catenin im Nukleus downreguliert^{96,97,98,99,59}. Eine eigene Transkriptionsaktivität wie β -Catenin kann Plakoglobin dabei nicht zugeordnet werden⁹⁵.

Diese Hypothese müsste allerdings noch durch weitergehende, detaillierte Untersuchungen der Signaltransduktionswege verifiziert werden. Das hier angewendete Auswerteschema, das aufgrund fehlender Anhaltspunkte so breit gefasst werden musste, könnte auf Membran- und Kernfärbung fokussiert und weiter optimiert werden.

Desmoglein 2 als Prognosefaktor

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Resultate zeigen, dass auch Desmoglein 2 ein hervorragendes Prognosekriterium darstellt. Da in der Literatur keine Daten bezüglich der prognostischen Wertigkeit von Desmoglein 2 beim Mammakarzinom verfügbar sind, musste wie bei Plakoglobin ein eigenes Scoring-System entwickelt werden. Daher wurden auch hier alle zellulären Lokalisationen sowohl gemeinsam als auch getrennt voneinander untersucht.

Wie aufgrund der zellbiologischen Funktion von Desmoglein 2 zu erwarten war, korrelierte eine konservierte Membranexpression hochsignifikant mit verlängertem Überleben. Wie bei Plakoglobin korrelierten jedoch auch weitere zelluläre Lokalisationen mit einer guten Prognose im Hinblick auf ein verlängertes Gesamtüberleben. Betrachtet man die Karzinom-assoziierten Sterbefälle, so findet man bei erhaltener Expression von Desmoglein 2 in der Membran eine außerordentlich niedrige Rate von nur 8,3%. Bei Lokalisation im Zytosol beträgt die Rate 22,2% und bei Lokalisation sowohl in der Membran als auch im Zytosol liegt sie mit 14,6% zwischen den beiden Werten. Der Wert für eine beliebige Lokalisation in einem der drei untersuchten Kompartimente betrug 22,4%. In allen Fällen lag die Sterblichkeit in der Desmoglein 2-negativen Kontrollgruppe wesentlich höher.

Die desmosomalen Cadherine sind nicht so gut untersucht wie E-Cadherin, jedoch kann man vermuten, dass sie ebenfalls im Zuge einer EMT (epithelialen-mesenchymalen Transition) verloren gehen und damit ein vergleichbares Merkmal für den Differenzierungsverlust bei der malignen Transformation darstellen. Daher ist eine enge

Korrelation mit der Malignität des Tumors und damit mit der Prognose für die Patientin absolut vorstellbar.

In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Expression von Desmoglein 2 die Invasivität maligner Zellen drastisch reduziert³⁹.

In einer Studie über das squamöse Ösophaguskarzinom zeigte das Karzinomgewebe einen deutlichen Verlust der Membranfärbung von Desmoglein 2 mit vermehrter Anreicherung von Desmoglein 2 im Zytoplasma sowie perinukleär. Es wurde ein Zusammenhang mit diesem Expressionsverlust und dem damit einhergehenden Verlust der interzellulären Adhäsion und auftretender Metastasierung vermutet⁴⁰.

Eine andere Studie zeigt eine anormale Desmoglein 2-Expression beim Magenkarzinom und vermutet einen Zusammenhang zwischen dem Verlust dieses desmosomalen Cadherins und der Zunahme der Tumoraggressivität⁴¹.

Vereinzelt fand sich auch eine Lokalisation von Desmoglein 2 im Kern, die tendenziell mit metastasenfreiem Überleben korrelierte. Jedoch war die Fallzahl zu klein, um eine signifikante Aussage treffen zu können.

Eine solche Akkumulation von Desmoglein 2 im Zellkern überrascht, da es als desmosomales Cadherin funktionell in der Zellmembran verankert ist und mit seiner extrazellulären Domäne für Zell-Zell-Kontakte verantwortlich ist. Keim et al.¹⁰⁰, die bisher als Einzige eine nukleäre Lokalisation beschrieben haben, vermuten aufgrund derselben Überlegung, dass es sich hierbei um unspezifische Färbungen handeln müsse. Da wir nun dieselbe Beobachtung machen, wäre zu überlegen, ob hier nicht doch bisher unbekanntes Funktionalitäten vorliegen, zumal für das klassische E-Cadherin in einer Vielzahl von Studien eine nukleäre Lokalisation beschrieben wird. Wie es dorthin gelangt und welche Funktion es ausüben könnte, ist noch nicht geklärt.

Neuroendokrinen Pankreaskarzinomen wurde bei nukleär nachweisbarem E-Cadherin ein deutlich erhöhtes Aggressionspotential zugeschrieben, klarzellige Nierenkarzinome andererseits zeigten bei nukleärem E-Cadherin-Nachweis eine deutlich bessere Prognose¹⁰¹.

Möglicherweise erfüllt daher auch das desmosomale Cadherin Desmoglein 2 eine bis jetzt noch nicht geklärte Funktion im Nukleus.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde zur prognostischen Wertigkeit von Desmoglein 2 beim Mammakarzinom sind insofern auch von besonderem Interesse, da in der Literatur kaum Informationen zu diesem Themenkreis verfügbar sind.

Abschließend lässt sich sagen, dass Plakoglobin und Desmoglein 2 in dieser Studie valide und hoch signifikante Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben beim Mammakarzinom darstellen, die in diesem Kollektiv den etablierten Kriterien Nodalstatus und Grading überlegen waren.

Allerdings müssen diese Ergebnisse in weiteren Untersuchungen überprüft und verifiziert werden. Insbesondere wäre eine prospektiv randomisierte Studie erforderlich, damit den Anforderungen einer modernen evidenzbasierten Medizin Rechnung getragen wird.

7. Zusammenfassung

Entscheidend für die Prognose des Mammakarzinoms ist das Metastasierungs- bzw. Rezidivrisiko des Primärtumors. Im Rahmen der malignen Transformation werden grundlegende Veränderungen des Zytoskeletts sowie der Adhäsionsmoleküle beobachtet.

Zelluläre Adhäsion wird im Brustdrüsenepithel vor allem durch zwei Strukturen erbracht: Die Adherens Junctions und die Desmosomen. Sie sind die beiden wichtigsten epithelialen Strukturen für einen intakten Zellverband^{1,7}.

E-Cadherin, das Cadherin der Adherens Junctions, ist in Bezug auf das invasiv duktales Mammakarzinom schon gut untersucht. Über die Rolle der desmosomalen Cadherine wie Desmoglein 2 weiß man diesbezüglich dagegen wenig.

Plakoglobin (γ -Catenin) ist von zentralem Interesse, da es als einziges Protein in beiden Adhäsionsstrukturen vorkommt.

In dieser Arbeit wurde an Paraffinschnitten von 96 Frauen mit invasiv duktalem Mammakarzinom die Expression von Plakoglobin und Desmoglein 2 untersucht. Der Nachweis erfolgte immunhistochemisch. Die Expression von Plakoglobin und Desmoglein 2 in jedem einzelnen Zellkompartiment (Membran, Zytoplasma und Kern) bzw. aller Kompartimente gemeinsam wurde mit dem Krankheitsverlauf (Auftreten von Metastasen, Lokalrezidiven, Metastasen und Lokalrezidiven gemeinsam, Gesamtüberleben) korreliert.

Alle Frauen waren zwischen 1986 und 1987 im Berliner Universitätsklinikum Benjamin Franklin wegen eines invasiv duktales Mammakarzinoms behandelt worden. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis 2003.

Bei den Einzelanalysen für **Plakoglobin** korrelierten die Expression von Plakoglobin unter Berücksichtigung aller Kompartimente, die Expression von Plakoglobin an der Membran alleine, die Expression von Plakoglobin im Kern alleine, die Expression von Plakoglobin an Membran und Zytoplasma gemeinsam als auch die Expression von Plakoglobin an Membran und Kern gemeinsam signifikant mit dem Gesamtüberleben. Vor allem die Kombination von Membran- und Kernfärbung stellte in dieser

Untersuchung ein überragendes Prognosekriterium dar, das der Evaluation des Lymphknotenstatus eindeutig überlegen war.

Schon die Expression von Plakoglobin allein an der Membran bzw. allein im Kern zeigten sich hoch signifikant und scheinen als Prognosefaktoren geeignet, sind der kombinierten Bewertung jedoch eindeutig unterlegen.

Überraschend ist die Aussagekraft der Kernlokalisierung von Plakoglobin. Ausgehend von seiner Funktion als Bestandteil von Zelladhäsionsstrukturen würde man nicht erwarten, dass ihm eine biologische Funktion im Kern zukommt, zumal eine Kernlokalisierung in gesundem Mammaepithel nicht beobachtet wird.

In der Tumorzelle mit aktiviertem Wnt-Signaltransduktionsweg könnte es allerdings eine wichtige antiproliferative Rolle spielen. Im Wnt-aktiven Tumor transloziert das ebenfalls membranassoziierte Protein β -Catenin in den Kern und aktiviert als Transkriptionsfaktor tumorspezifische Gene. Durch seine ausgeprägte Homologie mit β -Catenin könnte Plakoglobin dessen Bindungsstellen am Genom blockieren.

Einige Autoren schreiben dementsprechend Plakoglobin im Nukleus eine Tumorsuppressorfunktion zu, indem es β -Catenin im Nukleus downreguliert^{96,97,98,99,59}.

Diese Hypothese müsste allerdings noch durch weitergehende, detaillierte Untersuchungen der Signaltransduktionswege verifiziert werden. Das hier angewendete Auswerteschema, das aufgrund fehlender Anhaltspunkte so breit gefasst werden musste, könnte dann auf Membran- und Kernfärbung fokussiert und weiter optimiert werden.

Wie in den Einzelanalysen zeigten sich bei der multivariaten Analyse der Plakoglobinvariablen keine statistischen Signifikanzen in Bezug auf das Auftreten von Metastasen, Lokalrezidiven bzw. Metastasen und Lokalrezidiven gemeinsam.

In Bezug auf die Überlebenszeit zeigten sich bis auf Plako-Z alle Plakoglobinvariablen statistisch signifikant. Der Lymphknotenstatus, das Grading sowie die Tumorgöße wurden dabei als Prognosefaktoren statistisch übertroffen.

In der univariaten Analyse ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer Plakoglobinexpression und dem Lymphknotenstatus, der Tumorgöße, dem Her2/neu- oder ER-Status herstellen. Das heißt, Plakoglobin und seine Variablen können von diesen als unabhängig gelten.

Allerdings wurde bei niedriger Plakoglobin-gesamt- bzw. Plako-M-Expression überdurchschnittlich häufig ein hohes Grading beobachtet. Dies ergab eine statistisch signifikante Korrelation (Plako-gesamt $p < 0,04$; Plako-M $p < 0,06$).

Dieser Zusammenhang eines Plakoglobinverlustes mit einem hohen Grading kann als Ergebnis einer epithelialen-mesenchymalen Transition mit zunehmender Entdifferenzierung des Tumors gewertet werden.

Die retrospektiven Patientinnendaten konnten durch In-vitro-Experimente an kultivierten Mammakarzinom-Zellen, in denen die Plakoglobinexpression mit der Invasivität verglichen wurde, bestätigt werden.

Je stärker Plakoglobin exprimiert war, desto geringer war die Invasivität in der Boyden-Kammer. Je geringer also der Differenzierungsverlust im Zuge der malignen Transformation ausfiel, desto weniger aggressiv verhält sich die Zelllinie.

Bei den Einzelanalysen für **Desmoglein 2** zeigte sich ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben bei Desmoglein 2-Expression an der Membran, bei Desmoglein 2-Expression in allen Kompartimenten, bei Desmoglein 2-Expression an Membran und im Zytoplasma gemeinsam, sowie bei Desmoglein 2-Expression allein im Zytoplasma. Wie in den Einzelanalysen zeigten sich in der multivariaten Analyse keine statistischen Signifikanzen der Desmogleinvariablen in Bezug auf das Auftreten von Metastasen, Lokalrezidiven bzw. Metastasen und Lokalrezidiven gemeinsam.

In Bezug auf die Überlebenszeit zeigten sich bis auf Desmo-Z und Desmo-K alle Desmogleinvariablen statistisch signifikant.

Der Lymphknotenstatus, das Grading sowie die Tumorgöße wurden dabei als Prognosefaktoren statistisch übertroffen.

Bei der univariaten Analyse ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer Desmoglein 2-Expression und dem Lymphknotenstatus, der Tumorgöße, dem Grading, dem Her2/neu- oder ER-Status herstellen. Das heißt, Desmoglein 2 und seine Variablen können als unabhängige Prognosefaktoren angesehen werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde zur prognostischen Wertigkeit von Desmoglein 2 beim Mammakarzinom sind insofern von besonderem Interesse, als dass in der Literatur kaum Informationen zu diesem Themenkreis verfügbar sind.

Abschließend lässt sich sagen, dass Plakoglobin und Desmoglein 2 in dieser Studie valide und hoch signifikante Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben beim Mammakarzinom darstellen, die den etablierten Kriterien Nodalstatus, Tumorgroße und Grading überlegen sind.

Allerdings müssen diese Ergebnisse in weiteren Untersuchungen überprüft und verifiziert werden. Insbesondere wäre eine prospektiv randomisierte Studie erforderlich, damit den Anforderungen einer modernen evidenzbasierten Medizin Rechnung getragen wird.

8. Literaturverzeichnis

- 1) Kowalczyk A, Bornslager EA, Norvell SM, et al. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol* 1999;185:237-302.
- 2) Liotta LA, Kohn E. Cancer invasion and metastasis (clinical conference). *J Am Med Assoc* 1990;263:1123-1126.
- 3) Raz A, Ben-Ze`ev A. Cell-contact and -architecture of malignant cells and their relationship to metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 1987;6:3-21.
- 4) Ben-Ze`ev A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:99-108.
- 5) Ueda G, Sunakawa H, Nakamori K, et al. Aberrant expression of beta- and gamma-catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Maxillofac Surg* 2006;35:356-61.
- 6) Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenic regulator. *Science* 1991;251:1451-1455.
- 7) Genda T, Sakamoto M, Ichida T, et al. Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell-substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* 2000;80:387-94.
- 8) Leckband D, Prakasam A. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:259-287.
- 9) Nagafuchi A. Molecular architecture of adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:600-3.
- 10) Yap AS, Kovacs EM. Direct cadherin-activated cell-signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol* 2003;160:11-16.
- 11) Bryant DM, Stow JL. The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trens Cell Biol* 2004;14:427-434.
- 12) Wheelock MJ, Soler AP, Knudsen KA. Cadherin Junctions in mammary tumors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:275-85.
- 13) Gumbiner BM, McCrea PD. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci* 1993;17:155-158.
- 14) Ilyas M, Tomlinson IP. The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol* 1997;182:128-137.

-
- 15) Franke WW, Nuber UA, Schmidt A, et al. Desmosomes – dual junctional principles of intra- and supracellular order in epithelial differentiation and tissue formation. *Verh Dtsch Ges Path* 1994;78:8-14.
 - 16) Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 1988;7:3679-3684.
 - 17) Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin. *EMBO J* 1989;8:1711-1717.
 - 18) Sommers CL, Gelmann EP, Kemler R, et al. Alteration in beta-catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells. *Cancer res* 1994;54:3544-52.
 - 19) Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-85.
 - 20) Moll R, Mitze M, Frixen UH. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 1993;143:1731-42.
 - 21) Suciuc C, Cimpean AM, Muresan AM, et al. E-cadherin expression in invasive breast cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2008;49:517-23.
 - 22) Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008;27:6920-6929.
 - 23) Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, et al. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993;53:1696-1701.
 - 24) Vleminckx K, Vakaet L, Mareel M, et al. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991;66:107-119.
 - 25) Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta* 1994;1198:11-26.
 - 26) Thiery J-P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev cancer* 2002;101:552-557.
 - 27) Lin SY, Xia W, Wang JC, et al. β -catenin, a novel prognostic marker for breast cancer; its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4262-4266.

- 28) Nollet F, Berx G, van Roy F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; 2:77-85.
- 29) Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:303-9.
- 30) Chitaev NA, Troyanovsky SM. Direct Ca²⁺-dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell-adhesion. *J Cell Biol* 1997;138:193-201.
- 31) Garrod D, Chidgey M, North A. Desmosomes: differentiation, development, dynamics and disease. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:670-8.
- 32) Schäfer S, Koch PJ, Franke WW. Identification of the ubiquitous human Desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Experimental Cell Research* 1994;211:391-399.
- 33) Schmidt A, Heid HW, Schafer S, et al. Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell-type-specific plaque components and intermediate filament anchorage. *Eur J Cell Biol* 1994;65:229-45.
- 34) Huber O. Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1872-1890.
- 35) Jung EG, Goerdts S, Franke WW, et al. Differenzierungsspezifische Expression der Plakoglobin-/Armadillo-Genfamilie in der Haut und ihren Tumoren: neue diagnostische Möglichkeiten. *Forschungsschwerpunkt IV: Universitäts-Hautklinik im Universitätsklinikum Mannheim, Abteilung für Zellbiologie Deutsches Krebszentrum, Haut- und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf* 2002:285-7.
- 36) Burdett IDJ. Aspects of the structure and assembly of desmosomes. *Micron* 1998;29:309-328.
- 37) Chitaev NA, Leube RE, Troyanovsky RB, et al. The binding of Plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. *J Cell Biol* 1996;133:359-69.
- 38) Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z. Desmosomal cadherins. *Current Opinion in Cell Biology* 2002;14:537-545.
- 39) Tselepis C, Chidgey M, North A, et al. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8064-9.

-
- 40) Pitella F, Katsube K, Takemura T, et al. Perinuclear and cytoplasmic distribution of desmoglein in esophageal squamous cell carcinomas. *Pathol Res Pract* 2001;197:85-91.
 - 41) Biedermann K, Vogelsang H, Becker I, et al. Desmoglein 2 is expressed abnormally rather than mutated in familial and sporadic gastric cancer. *The Journal of Pathology* 2005;207:199-206.
 - 42) Fukushima K, Yonezawa H, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease-associated gene expression in intestinal epithelial cells by differential cDNA screening and mRNA display. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:290-301.
 - 43) Ilyas M. Adhesion molecule expression in breast cancer: the phoenix in tumor metastasis. *J Pathol* 2000;190:15-9.
 - 44) Cowin P, Kapprell HP, Franke WW, et al. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 1986;46:1063-73.
 - 45) Troyanowsky SM, Leube RE. Molecular dissection of desmosomal assembly and intermediate filament anchorage. *Subcellular Biochemistry* 1998;31:263-282.
 - 46) Korman NJ, Eyre RW, Klaus-Kovtun V, et al. Demonstration of an cadherin-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med* 1989;321:631-635.
 - 47) Palka HL, Green KJ. Roles of plakoglobin end domains in desmosome assembly. *Journal of Cell Science* 1997;110: 2359-2371.
 - 48) Aberle H, Bierkamp C, Torchard D, et al. The human plakoglobin gene localizes on chromosome 17q21 and is subjected to loss of heterozygosity in breast and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6384-6388.
 - 49) Navarro P, Lozano E, Cano A. Expression of E- or P-Cadherin is not sufficient to modify the morphology and tumorigenic behavior of murine spindle carcinoma cells. Possible involvement of Plakoglobin. *J Cell Sci* 1993; 105:923-934.
 - 50) Pantel K, Passlick B, Vogt J, et al. Reduced expression of Plakoglobin indicates an unfavorable prognosis in subsets of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1407-1413.
 - 51) Cho EY, Choi Y, Chae SW, et al. Immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in ovarian serous neoplasms. *Pathol Int* 2006;56:62-70.
 - 52) Wang CX, Chen J, Yang Z, et al. Correlations of E-cadherin, beta-catenin and gamma-catenin gene expression with the invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003;23:1198-201.

- 53) Lin YC, Wu MY, Li DR, et al. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:3235-9.
- 54) Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, et al. Expression of E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin in patients with bladder cancer: identification of gamma-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T1 superficial urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* 2006;125:119-26.
- 55) Endo K, Ueda T, Ueyama J, et al. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: Relationship with tumor grade, clinicopathologic parameters and patients survival. *Hum Pathol* 2000;31:558-65.
- 56) Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, et al. Expression patterns of alpha-, beta- and gamma-catenin in pancreatic cancer: correlation with E-cadherin expression, pathological features and prognosis. *Anticancer res* 2001;21:4127-34.
- 57) Morita N, Uemura H, Tsumatani K, et al. E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin expression in prostate cancers: correlation with tumor invasion. *Br J Cancer* 1999;79:1879-83.
- 58) Zschesche W, Schonborn I, Behrens J, et al. Expression of E-cadherin and catenins in invasive mammary carcinomas. *Anticancer Res* 1997;17:561-7.
- 59) Simcha I, Geiger B, Yehuda-Levenberg S, et al. Suppression of tumorigenicity by plakoglobin: an augmenting effect of N-cadherin. *J Cell Biol* 1996; 133:199-209.
- 60) Pirinen RT, Hirvikovski P, Johansson RT, et al. Reduced expression of alpha-catenin, beta-catenin and gamma-catenin is associated with high cell proliferative activity and poor differentiation in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2001;54:391-5.
- 61) Schaller G, Fuchs I, Pritze W, et al. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1879-85.
- 62) Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7.

-
- 63) Silvestrini R, Daidone MG, Luisi A, et al. Biologic and clinicopathologic factors of specific relapse types in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:697-704.
 - 64) Arriagada R, Rutqvist LE, Skoog L, et al. Prognostic factors and natural history in lymph node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1992;21:101-9.
 - 65) Klessner JL, Desai BV, Amargo EV, et al. EGFR and ADAMs cooperate to regulate shedding and endocytic trafficking of the desmosomal cadherin desmoglein 2. *Mol Biol Cell* 2009;20:328-37.
 - 66) Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. β -catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 1994;127:1375-80.
 - 67) Hanzan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulated the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273:9078-84.
 - 68) Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, et al. Effect of epidermal growth factor on cadherin mediated adhesion in a human esophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 1995;71:250-8.
 - 69) Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, et al. Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1994;1:295-305.
 - 70) Green KJ, Gaudry CA. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:208-16.
 - 71) Yin T, Getsios S, Caldelari R, et al. Mechanisms of plakoglobin-dependent adhesion: desmosome-specific functions in assembly and regulation by epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2005;280:40355-63.
 - 72) Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993;9:317-21.
 - 73) Gaudry CA, Palka HL, Dusek RL, et al. Tyrosine-phosphorylated plakoglobin is associated with desmogleins but not desmoplakin after epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 2001;276:24871-80.
 - 74) Garrod DR, Fisher C, Smith A, et al. Pervandate stabilizes desmosomes. *Cell Adh Migr* 2008;2:161-6.

- 75) Moon HS, Choi EA, Park HY, et al. Expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin, β - and gamma-catenin and epidermal growth factor receptor in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001;81:355-9.
- 76) Turashvili G, Bouchalova K, Bouchal J, et al. Expression of E-cadherin and c-erbB-2/HER-2/neu oncoprotein in high-grade breast cancer. *Cesk Patol* 2007 Jul;43:87-92.
- 77) Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol* 1999;187:272-278.
- 78) Nagae Y, Kameyama K, Yokoyama M, et al. Expression of E-Cadherin, catenins and c-erbB-2 gene products in invasive ductal-type cell carcinomas. *J Nippon med Sch* 2002;69:165-71.
- 79) Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2010, Internetseite
- 80) Heimann R, Hellmann S. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2000;36:1631-9.
- 81) Bühler H, Schaller G. Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* 2005;3:365-71.
- 82) Park JW, Hong K, Kirpotin DB, et al. Anti-HER2 immunoliposomes for targeted therapy of human tumors. *Cancer Letters* 1997;118:153-160.
- 83) Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol* 1981;75:816-21.
- 84) Remmele W, Stegner HE. Immunohistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (Er-ICA) im Mammakarzinomgewebe. Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes. *Der Frauenarzt* 1987;2:41-43.
- 85) Fuchs I. Die Bedeutung von Intermediärfilamenten beim Mammakarzinom und der Zusammenhang mit dem Onkoprotein HER-2/neu. Inaugural-Dissertation 1999:21.
- 86) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing 2009, Vienna, Austria.
- 87) Konsensuskonferenz St. Gallen, 2013
- 88) Padhy L, Shih C, Cowing D, et al. Identification of phosphoprotein specifically induced by transforming DNA of rat neuroblasts. *Cell* 1982;28:865-871.

-
- 89) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986;319:230-234.
 - 90) Slamon D, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Addition of Herceptin (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anticancer activity: a randomized, multinational controlled phase III trial. 34th Meeting Am Soc Clin Oncol (ASCO) 1998: Abstract 377.
 - 91) Frixen UH, Nagamine Y. Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res* 1993;53:3618-23.
 - 92) Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;213:123-61.
 - 93) Bukholm IK, Nesland JM, Karesen R, et al. E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *J Pathol* 1998;185:262-6.
 - 94) Cheah PY, Choo PH, Yao J, et al. A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with β -catenin and p27. *Cancer* 2002;95:2479-2486.
 - 95) Simcha I, Shtutmann M, Salomon D. Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* 1998;141:1433-1448.
 - 96) Salomon D, Sacco AS, Roy SG, et al. Regulation of β -catenin levels and localization by overexpression of Plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *The Journal of Cell Biology* 1997;139:1325-1335.
 - 97) Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin Tcf-signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-1790.
 - 98) Pfeifer M. Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. *Science* 1997;275:1752-1753.
 - 99) Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, et al. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275:1790-1792.
 - 100) Keim SA, Johnson KR, Wheelock MJ, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against the proregion of human desmoglein-2. *Hybridoma (Larchmt.)*. 2008;27:249-58.

- 101) Chetty R, Serra S. Nuclear E-Cadherin immunoexpression: from biology to potential applications in diagnostic pathology. *Adv Anat Pathol* 2008;15:234-40.

9. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Ellen Mahnke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: " Die prognostische Relevanz von Proteinen des zellulären Adhäsionsapparates beim invasiv duktalem Mammakarzinom" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10. Publikationen

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ellen Mahnke hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

- H Bühler, S Papadopoulos, E Mahnke, Y Saklaoui, A Abdallah. Plakoglobin als potentieller Prognosefaktor beim Mammakarzinom. Zentralbl Gynäkol 2005; 127-FV1_3
Beitrag im Einzelnen: Immunhistochemische Färbung von Plakoglobin an invasiv duktalem Mammakarzinom-Präparaten; statistische Auswertung der Expression von Plakoglobin im Hinblick auf den Krankheitsverlauf beim invasiv duktalem Mammakarzinom, seiner Wertigkeit als Prognosefaktor sowie der Vergleich mit bereits etablierten Prognosefaktoren; Bestimmung der Plakoglobinexpression in kultivierten, humanen Mammakarzinom-Zelllinien durch Western Blot.
- **Poster:**
Bühler, H., Mahnke, E., Duvnjak, B., Schaller G. *Plakoglobin (gamma-catenin) is a prognostic marker in breast cancer.* San Antonio Breast Cancer Symposium 2005; Abstract, Breast cancer research and treatment, 94(Suppl. 1), 138.
Beitrag im Einzelnen: s.o.
- **Poster:**
Bühler H, Mahnke E, Duvnjak B, Schaller G
Prognostic value of the desmosomal protein plakoglobin (gamma-catenin) in breast cancer. 27th German Cancer Congress Berlin 2006, German Cancer Society (Frankfurt/M.), 22. - 26.03.2006, Berlin
Beitrag im Einzelnen: s.o.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Danksagung

Von ganzem Herzen danke ich Dr. Helmut Bühler, der mich und die Arbeit über all die Jahre mit Fachkompetenz und Geduld begleitet hat und mir stets hilfreich zur Seite stand.

PD Dr. Ilka Fuchs danke ich für die gute Weiterbetreuung nach Übernahme der Arbeit. Dr. Roger Mundry danke ich sehr für seine hilfreiche Unterstützung in allen Fragen der Statistik.

Blanka Duvnjak danke ich für die Einführung in die notwendige Laborarbeit.

Prof. Dr. Gerhard Schaller danke ich für die Überlassung des Themas.

Marco Solinski und Natasha Aruri danke ich für all ihre liebevolle Unterstützung.