

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie
Abteilung für Gynäkologische Forschung
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Fritz Jänicke

Untersuchungen zur Bedeutung von ALCAM bei der Metastasierung des Mammakarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Nadine Elisabeth Köhler
geboren in Moshi, Tansania

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: *20.3.2015*

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg:

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: *Prof. Dr. Fritz Jämicke*

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: *Dr. Karin Milde-Kangsch*

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: *Prof. Dr. Georg Zilber*

Teile dieser Arbeit wurden im „Journal of Clinical Pathology“, „Breast Cancer Research and Treatment“ und „Disease Markers“ veröffentlicht. Die Artikel sind folgend aufgelistet:

Expression levels of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166) in primary breast carcinoma and distant breast cancer metastases

M. Ihnen, N. Köhler, J.F. Kersten, K. Milde-Langosch, K. Beck, S. Höller, V. Müller, I. Witzel, F. Jänicke and E. Kilic

Disease Markers 28 (2010) 71–78 DOI 10.3233/DMA-2010-0685 IOS Press

Protein expression analysis of ALCAM and CEACAM 6 in breast cancer metastases reveals significantly increased ALCAM expression in metastases of the skin

M. Ihnen, E. Kilic, N. Köhler, T. Löning, I. Witzel, C. Hagel, S. Holler, J.F. Kerstin, V. M. Müller, F. Jänicke, K. Milde-Langosch

J Clin Pathol 2011 64: 146-152 DOI: 10.1136/jcp.2010.082602

Biologic role of activated leukocyte cell adhesion molecule overexpression in breast cancer cell lines and clinical tumor tissue

S. Hein, V. Müller, N. Köhler, H. Wikman, S. Krenkel, T. Streichert, M. Schweizer, S. Riethdorf, V. Assmann, M. Ihnen, K. Beck, R. Issa, F. Jänicke, K. Pantel, K. Milde-Langosch

Breast Cancer Res Treat Received: 14 June 2010 / Accepted: 6 October 2010 Ó Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung	2
2.1 Das humane Mammakarzinom	2
2.2 Anatomie der weiblichen Brust.....	2
2.3 Histopathologische Klassifizierung des Mammakarzinoms	4
2.4 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom	4
2.5 Tumorprogression und Metastasierung.....	5
2.6 Activated Leukocyte Cell Adhaesion Molecule (ALCAM)	7
3 Material und Methoden	10
3.1 Material	10
3.1.1 Darstellung des Patientenkollektivs und Untersuchungsgutes	10
3.1.2 Geräte	12
3.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	12
3.2 Methoden.....	14
3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E. Färbung).....	14
3.2.2 Immunhistochemische Analyse.....	14
3.2.3 Auswertung der Immunhistochemie.....	16
3.2.4 Statistische Methoden.....	17
4 Ergebnisse	19
4.1.1 Ergebnisse in der Gruppe der Metastasen	19
4.1.2 Ergebnisse in der Gruppe der Sektionsschnitte.....	22
4.1.3 Ergebnisse in der Gruppe der Tissue Microarrays	25
5 Diskussion	29
5.1 Diskussion in der Gruppe der Metastasen.....	29
5.2 Diskussion in der Gruppe der Sektionsschnitte	30
5.3 Diskussion in der Gruppe Tissue Microarrays	32
6 Zusammenfassung	34
7 Abkürzungsverzeichnis	35
8 Tabellenverzeichnis	36
9 Abbildungsverzeichnis	37
10 Literaturverzeichnis	38
11 Danksagung	42
12 Lebenslauf	43
13 Eidesstattliche Versicherung	44

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Diverse Gene und Proteinexpressionssignaturen wurden im primären Mammakarzinom zur Prognose und zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der organspezifischen Metastasierung identifiziert. Diese Expressionssignaturen beinhalten oft einige Gene, die für Adhäsionsmoleküle kodieren wie für das Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166), welches dem menschlichen Chromosom 3q13 zugeordnet wurde (King et al., 2004). ALCAM ist ein transmembranäres Glykoprotein und gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Es besteht aus fünf extrazellulären Immunglobulin Domänen, einer transmembranären Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Ende und vermittelt die Interaktion zwischen Zellen.

Gewebe, die dynamisches Zellwachstum aufweisen oder an Zellmigration beteiligt sind, weisen oft eine erhöhte Expression von ALCAM-Transkripten auf. Vorangehende Untersuchungen ergaben widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf deren Rolle sowie den prognostischen Wert von ALCAM in Mammakarzinomen. Eigene Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass rezidierte Tumore mit hoher ALCAM-Expression häufig Knochenmetastasen aufwiesen, während Tumore mit geringer oder fehlender ALCAM-Expression ein anderes Metastasierungsverhalten zeigten. Dies deutet darauf hin, dass ALCAM eine Bedeutung für das Metastisierungsmuster von Mammakarzinomen haben könnte und möglicherweise auch als Prognosefaktor für die Einschätzung des Erkrankungsverlaufes dienen könnte.

In bisherigen Forschungsergebnissen wurden hauptsächlich Daten aus Primärtumoren ermittelt. Daten aus Metastasen sind rar. In dieser Ausarbeitung wurde die Bedeutung von ALCAM für die Metastasierung und das Metastisierungsmuster des Mammakarzinoms näher untersucht. Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression von ALCAM die Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark beeinflusst. Es wurde evaluiert, ob die ALCAM-Expressionen sich in unterschiedlichen Lokalisationen der Metastasen unterscheiden, um so mögliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen des Organotropismus von Brustkrebs-Metastasen zu ermitteln. Viele Adhäsionsmoleküle sind in Krebserkrankungen beim Menschen in charakteristischer Weise dysreguliert. Deshalb ist eine tiefer gehende Einsicht in die Funktion der beteiligten Proteine erforderlich, unter anderem, um die schon laufende Entwicklung der therapeutischen Anti-Adhäsions-Strategien weiter zu ergründen.

Zur Analyse der ALCAM-Expression in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden Metastasen von Mammakarzinomen mit zum Teil korrespondierenden Primärtumoren mittels Immunhistochemie untersucht. Es wurden Metastasen unterschiedlicher Lokalisation (Lymphknoten, Knochen, Lunge, Leber, Gehirn) miteinander verglichen. Zudem wurde eine retrospektive Untersuchung an einem Tissue Microarray mit ins Knochenmark disseminiertem Tumorgewebe vom Mammakarzinom ausgehend von 411 Patienten untersucht. Die Gewebeproben wurden von verschiedenen Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. In der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte wurde die membranöse und zytoplasmatische Anfärbung von ALCAM separat ausgewertet und dann zu einem gesamten Score zusammengerechnet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anschließend mittels statistischer Methoden.

2 Einleitung

2.1 Das humane Mammakarzinom

Die häufigste Krebserkrankung der Frau mit 72.000 Neuerkrankungen jährlich deutschlandweit ist das maligne Mammakarzinom. Hinzu kommen noch etwa 6500 in situ Tumore. Statistisch gesehen erkrankt in ihrem Leben jede achte bis zehnte Frau in Deutschland an Brustkrebs. Etwa jede vierte betroffene Frau ist bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre, jede zehnte noch keine 45 Jahre alt. Im Jahre 2008 erkrankten etwa doppelt so viele Frauen wie noch 1980, die altersstandardisierte Erkrankungsrate stieg seitdem um etwa 50% (RKI, 2007/2008). Dies lässt sich auf ein verändertes Reproduktionsverhalten und den Einsatz von Hormonersatztherapien zurückführen. Ebenso spielt die höhere Anzahl an Screening-Untersuchungen eine Rolle, wo einige Tumore diagnostiziert wurden, die sonst lebenslang unerkant geblieben wären (Jemal et al., 2011).

Zu den Risikofaktoren an einem Mammakarzinom zu erkranken zählen eine frühe erste und eine späte letzte Regelblutung, Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt. Mehrere bzw. frühe Geburten und Stillzeiten verringern umgekehrt das Brustkrebsrisiko. Die Hormonersatztherapie in und nach den Wechseljahren steigert das Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Hormonhaltige Ovulationshemmer beeinflussen es dagegen nur geringfügig. Übergewicht und Bewegungsmangel nach den Wechseljahren sowie Alkohol sind als Risikofaktoren bekannt. Frauen mit sehr dichtem Brustdrüsengewebe und bestimmten gutartigen Veränderungen wie lobuläre Neoplasien und atypische duktale Hyperplasien haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Auftreten von Brust- und Eierstockkrebs in der Familie ergeben ebenso eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken (RKI, 2007/2008). Des Weiteren spielen bei der Entstehung des Mammakarzinoms weitere genetische Faktoren eine bedeutende Rolle, die zum Beispiel mit Mutationen des BRCA1- oder BRCA2-Gens (breast cancer gene 1 oder 2) oder des Tumorsuppressor-Gens p53 einhergehen.

Im Gegensatz zu den steigenden Inzidenzzahlen ist die Brustkrebsmortalitätsrate in den letzten 25 Jahren in den Industrieländern gesunken (Jemal et al., 2011). Dies ist hauptsächlich auf die frühe Detektion mittels der Mammographie und der verbesserten Therapiemöglichkeiten zurück zu führen. Die Therapiekomponenten setzen sich aus der operativen Tumorentfernung und einer anschließenden Radio- und Chemotherapie zusammen. Bei Rezeptorpositivität kann die Gabe von Antiöstrogenen oder Trastuzumab (Herceptin®) in das Therapiekonzept integriert werden.

2.2 Anatomie der weiblichen Brust

Die weibliche Brust (siehe Abb. 1) wird von den Brustdrüsen (Glandulae mammae) und dem umliegenden Fett- und Bindegewebe gestaltet. Die Brustdrüse besteht aus 15–20 einzelnen tubulo-alveolären Drüsen mit jeweils eigenem Ausführungsgang (Ductus lactifer colligens), der in seinem Endabschnitt zum Sinus lactifer erweitert ist. In die Sammelgänge münden zahlreiche Ductus lactiferi mit Endstücken. Durch das Binde- und Fettgewebe werden die Drüsen in irreguläre Lappen (Lobi) geteilt. Eine weitere Untergliederung in Drüsenläppchen (Lobuli) erfolgt durch bindegewebige Septa interlobularia. Straffe Kollagenfaserzüge (Retinacula) erreichen die Fascia pectoralis, gegen welche die Brust beweglich ist. Alle Ausführungsgänge der Brustdrüse münden an der Spitze der zylindrisch-konischen Brustwarze. Ihre Haut ist stark pigmentiert. Umgeben ist die Brustwarze von einem gleichfalls (hellbraun) pigmentierten Warzenhof, der elastische Fasern, glatte

Muskulatur, Nerven, Blut- und Lymphgefäße, apokrine Schweißdrüsen (Gll. areolares), sehr feine Härchen und einige kleine Talgdrüsen enthält.

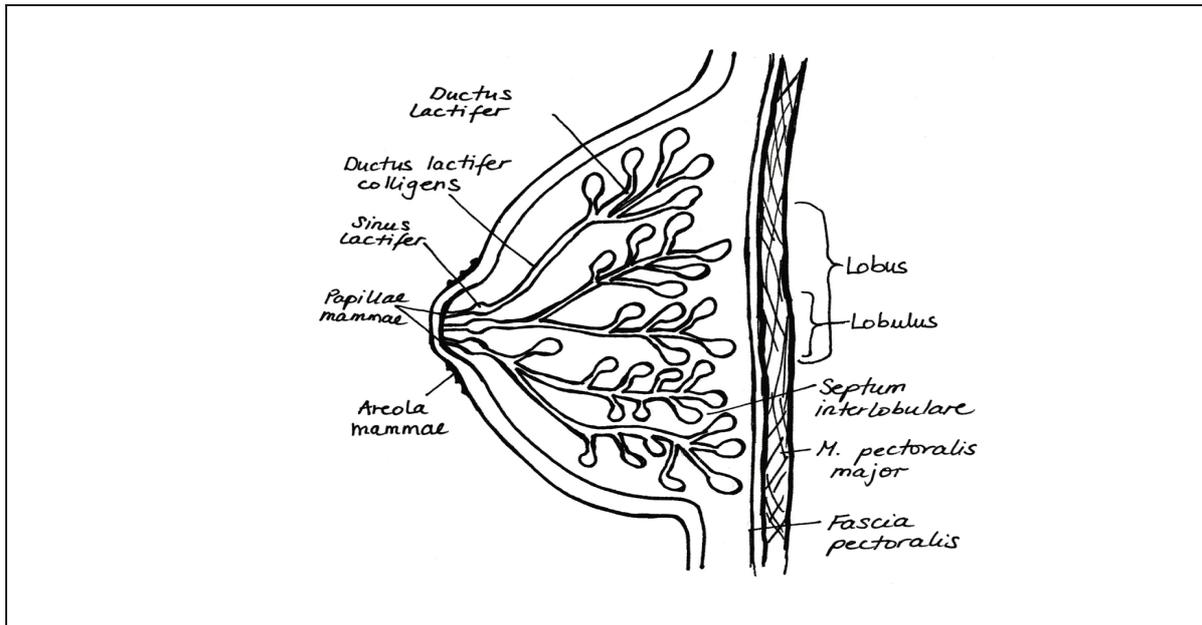


Abbildung 1: Anatomie der weiblichen Brust (Modifiziert nach (Schiebler and Korf, 2007))

Die Lymphe erreicht die lateralen und oberen Nodi lymphoidei axillares (ca. 75%), parasternale Lymphknoten in der Nachbarschaft der A. thoracica interna und interkostale Lymphknoten in der Nähe von Kopf und Hals der Rippen (siehe Abb. 2). Auf dem Lymphweg kann es beim Mammakarzinom zu Metastasen kommen, dann zunächst in den regionären Lymphknoten.

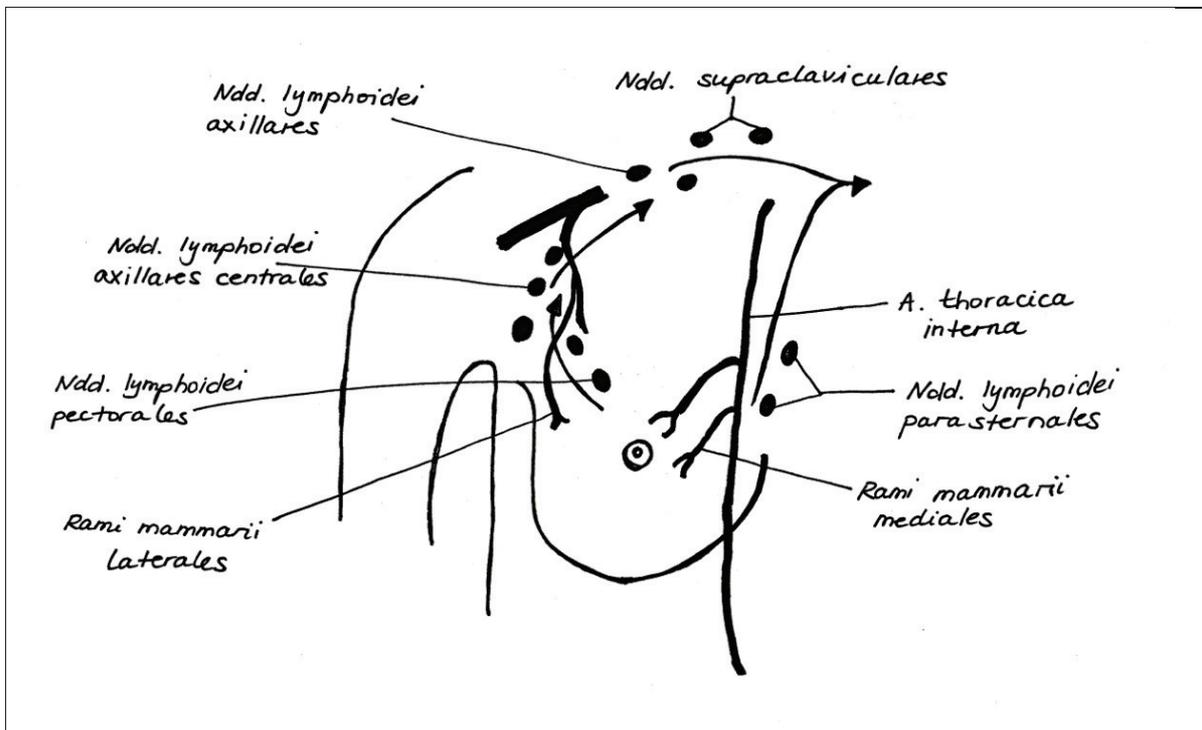


Abbildung 2: Darstellung der Lymphabflußwege der Mamma (Modifiziert nach (Schiebler and Korf, 2007))

Die Brustdrüse entwickelt sich zur adulten Form unter dem Einfluss von Hormonen (Östrogen) durch Längenwachstum der Milchgänge, Entfaltung der Gangepithelien und Bildung der Drüsenläppchen. Das Brustgewebe unterliegt einem hormonellen Einfluss während des monatlichen Zyklus, in der Schwangerschaft sowie in der Menopause. Proliferation und Funktion des Brustgewebes unterliegen einer endokrinen und lokal wirksamen autokrinen und parakrinen Regulation. Die Rolle der Hormonabhängigkeit der weiblichen Brustdrüse ist eine mögliche Erklärung für das vermehrte Auftreten von Mammakarzinomen bei Frauen (Schiebler and Korf, 2007).

2.3 Histopathologische Klassifizierung des Mammakarzinoms

Die histologische Typisierung des Mammakarzinoms erfolgt nach der WHO-Klassifikation (World Health Organisation, 2002). Diese gibt eine Vielzahl benigner und maligner Tumore in der Brust an. Unter dem Begriff Mammakarzinom werden sehr heterogene, bösartige von den Epithelien ausgehende Erkrankungen der weiblichen Brustdrüse zusammengefasst. Das häufigste invasive Mammakarzinom ist das invasiv-duktales Karzinom (von den Milchgängen ausgehend; 65-80%). Daneben treten andere histologische Typen wie das invasiv-lobuläre (von den Drüsenläppchen ausgehend; 6-15%), das medulläre (3%), das tubuläre (1-15%), das muzinöse (schleimbildend; 1-2%) oder das papilläre (1-7%) Karzinom gehäuft auf. Beim muzinösen, papillären und tubulären Karzinom wird häufig ein günstigerer Verlauf beobachtet. Tumore, welche die Basalmembran der Milchgänge und Drüsenläppchen noch nicht durchbrochen haben und sich ausschließlich innerhalb des Drüsengewebes befinden, werden definitionsgemäß als Carcinomata in situ (CIS) bezeichnet. Tumorzellen denen es gelingt in das angrenzende Bindegewebe einzudringen und die umgebende Basalmembran zu durchbrechen, werden als invasives Karzinom bezeichnet. Da das lobuläre Karzinom in situ (LCIS) wesentlich seltener in die invasive Form übergeht als das duktales Karzinom in situ (DCIS) wird es mit einem günstigeren Verlauf assoziiert.

Anhand der pathologischen TNM-Klassifikation, dem sogenannten Staging und der Bestimmung des Differenzierungsgrades, dem sogenannten Grading erfolgt die histologische Einteilung der Tumortypen. Entsprechend der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) gibt das Staging die Tumorgöße (T), den Lymphknotenstatus der regionalen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose an. Erfolgt diese Einteilung postoperativ durch die Beurteilung des OP-Präparates durch einen Pathologen, besitzen diese die Bezeichnung pT (pTis- bis pT4), pN (pN0- und pN+) und pM (bzw. M0/M+ falls Fernmetastasen vorhanden sind). Bei Patienten die eine neoadjuvante Therapie erhalten haben wird zusätzlich das Präfix y verwendet. Mit dem Grading werden verschiedene histologische und zytologische Merkmale zusammengefasst und in drei Differenzierungsgrade angegeben. Beginnend mit der Bezeichnung G1 wird ein gut differenzierter Tumor beschrieben, G2 einen mäßig differenzierten und G3/G4 wird als einen schlecht differenzierten Tumor bezeichnet.

2.4 Prognosefaktoren beim Mammakarzinom

Die Abschätzung der Prognose bei Brustkrebspatienten erfolgt zunächst über die oben beschriebene TNM Klassifikation und dem Grading um einen möglichst effektiven und individuellen Therapieplan für jede einzelne Patientin erstellen zu können. Das Alter der Patientin, die Gefäßinvasion sowie der Steroidhormonrezeptorstatus sind ebenso von prognostischer und therapeutischer Bedeutung. Der Hormonrezeptorstatus und der Status des Onkogens HER2-neu (human epidermal growth factor receptor, type 2) werden als

prädiktive Faktoren für ein Ansprechen auf eine endokrine Therapie oder eine Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) angesehen (Goldhirsch et al., 2005). Das HER2-neu fungiert als Mediator für die Proliferation, die Differenzierung und für die metabolischen Abläufe in der Zelle.

Ein kleiner Tumor mit negativem Lymphknotenstatus, ein hoher Differenzierungsgrad und einen positiven ER-Status sind Marker für eine gute Prognose (Fitzgibbons et al., 2000). Dementsprechend ist die Prognose bei einem großen Tumor, beim Befall mehrerer Lymphknoten, bei einem hochwertigem Grading und je jünger die Patientin ist als ungünstiger einzuschätzen. Auch wenn diese klassischen Marker in der klinischen Routine regelmäßig angewandt werden, ist der Bedarf für weitere prognostische und prädiktive Faktoren groß, da die etablierten Marker eine begrenzte Aussagefähigkeit innerhalb ihrer definierten Risikogruppen haben. Marker für ein Therapieansprechen im Mammakarzinom sind bis auf den Östrogenrezeptor und den HER2-Rezeptor bislang nicht vorhanden. Derzeit gibt es zum Beispiel keinen in der Klinik eingeführten Parameter, der das Ansprechen einer Chemotherapie vorhersagen kann. Zur Planung einer individuellen Behandlungsstrategie ist eine Prognoseeinschätzung und die Vorhersage des Therapieansprechens entscheidend. Da die klinisch etablierten Marker innerhalb der definierten Risikogruppen keine Vorhersage zu Prognose und Therapieansprechen erlauben, besteht Bedarf für weitere prognostische und prädiktive Faktoren (Henningsen, 2012).

2.5 Tumorprogression und Metastasierung

Wissenschaftler erforschen bereits seit mehr als einhundert Jahren die Metastasierung von Tumorzellen. Doch erst in den letzten Jahren wurden nähere Einsichten in die Mechanismen zur Entstehung von Metastasen gewonnen und in die Gründe, weshalb bestimmte Tumore in spezifische Organe metastasieren. Trotz entscheidender Entwicklungen in der Diagnosestellung, den operativen Verfahren, der Patientenversorgung, der lokalen und der systemischen adjuvanten und neoadjuvanten Therapien sind die meisten Todesfälle bei Krebserkrankten durch Metastasen verursacht. Eine Metastase ist eine neoplastische Läsion, die aus ihren primären Ursprungszellen in fernere Organe abgibt, zu denen sie ihre unmittelbare Nachbarschaft verliert, und ein unnachgiebiges Zellwachstum entsteht. Sozusagen eine Übersiedelung an einen anderen Ort. Die Fähigkeit eine Metastase zu bilden besitzen nur maligne Tumorzellen. Benigne Tumorzellen besitzen diese Fähigkeit nicht. Klinische und experimentelle Studien haben jedoch gezeigt, dass Neoplasien eine Serie an Veränderungen durchlaufen und ein initial benigner Tumor sich in einen malignen, letalen Tumor verwandeln kann. Der Metastasierungsprozess (schematisch in Abb. 3 dargestellt) involviert eine Reihe von sequentiellen und in Wechselbeziehung stehende Abläufe, in denen sich maligne Zellen vom Primärtumor ablösen und in ferne Lokalisation disseminieren und dort proliferieren, um einen neuen Tumorfokus zu bilden. Hierfür ist eine Interaktion mit homeostatischen Faktoren notwendig, die das Tumorzellwachstum, das Zellüberleben, die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung begünstigen. Der Prozess ist abhängig von den intrinsischen Eigenschaften der Tumorzellen und die Antwort des Wirtes (Poste and Fidler, 1980).

Die Metastasierung beginnt mit der lokalen Invasion des umliegenden Gewebes, ausgehend vom Primärtumor, entweder als einzelne Zelle oder in Zellgruppen. Die lokale Ausbreitung in Fasziennetzen oder größeren Körperhöhlen ist ebenso möglich, jedoch sind die Routen der Tumorausbreitung in ferne Organe über die Invasion und Penetration der Tumorzellen in Blutgefäße oder Lymphgefäße mit der Folge der Disseminierung in ferne Organe üblich. Hier erfolgt die Penetration üblicherweise über Venolen oder Lymphgefäße. Arterien und

Arteriole zeigen hingegen eine größere Resistenz gegen eine Penetration von Tumorzellen, wahrscheinlich aufgrund der mechanischen Barriere. Nach dem Eindringen in das Blutgefäßsystem werden die Tumorzellen entweder mit dem Blutstrom in die fernen Organe gespült oder verbleiben in der Eintrittsstelle und geben dann sukzessive Tumorzellen als Embolus ab (Poste and Fidler, 1980).

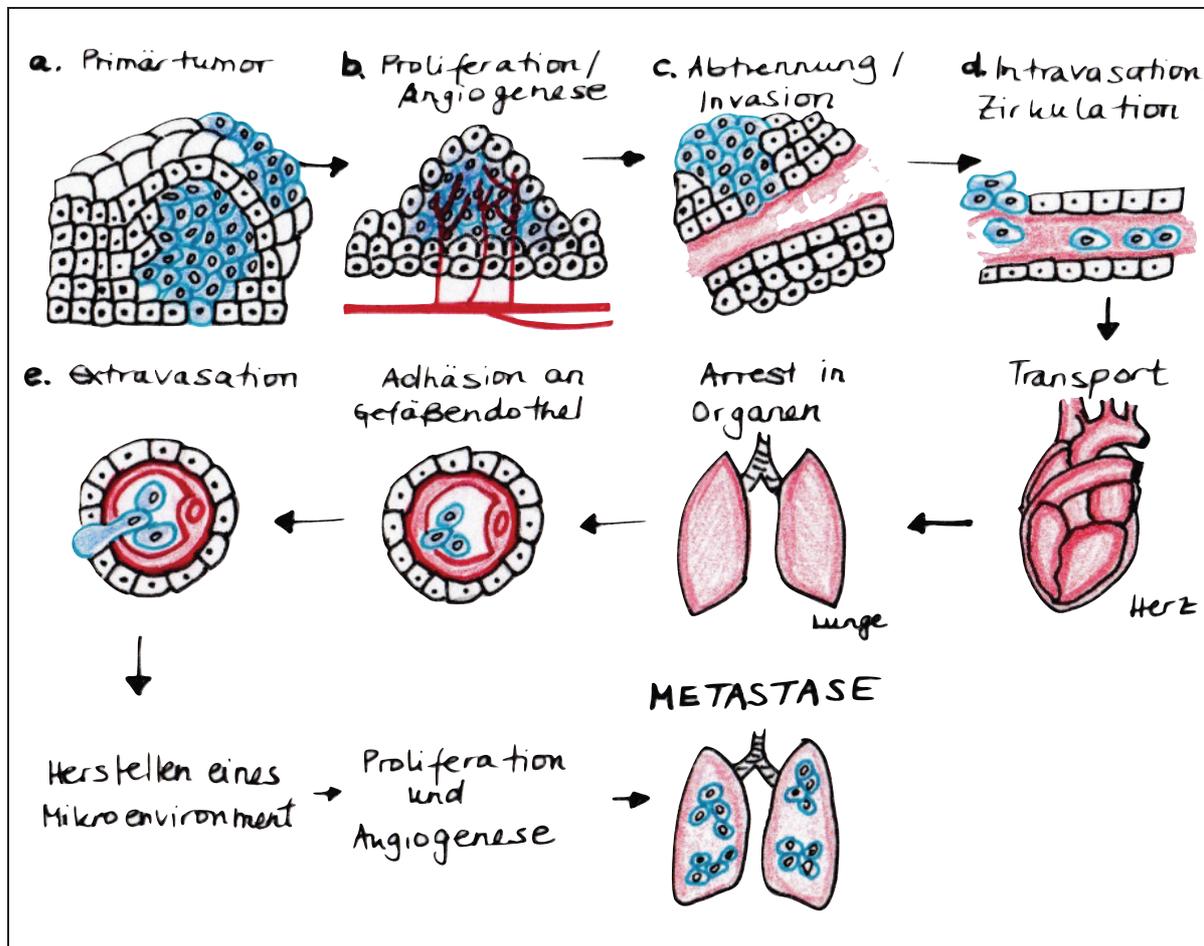


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Tumorzell-Metastasierungskaskade (Modifiziert nach (Fidler, 2003)).

a. Zelltransformation und Tumorwachstum.

b. Bildung einer ausgeprägten Vaskularisation als Voraussetzung für ein Tumorwachstum. Synthese und Sekretion von angiogenen Faktoren bilden ein Kapillarnetzwerk der Tumorzellen zum umliegenden Wirtsgewebe.

c. Lokale Abtrennung von einigen Tumorzellen aus dem Primärtumor.

d. Invasion des Tumorembolus in die Blutzirkulation, hier wird ein Großteil der Tumorzellen von körpereigenen Abwehrmechanismen zerstört. Die überlebenden Zellen werden in Kapillarbetten der Zielorgane aufgenommen z. B. durch Adhäsion an Endothelzellen der Kapillare.

e. Extravasation und Eintreten in das Zielorgan, vermutlich durch ähnliche Mechanismen wie bei der Invasion.

f. Tumorwachstum im Zielgewebe, hierfür wird eine Vasularisation und eine Vernichtung der Wirtsabwehrmechanismen benötigt, um den Metastasierungsprozeß abzuschließen. Diese Zellen können wiederum erneut über die Blutbahn weitere Metastasen bilden.

Der Ort der Fernmetastasierung wird zum Teil über mechanische Faktoren wie die Größe, die Verformbarkeit und dem Durchmesser der Tumorzellen oder der Flexibilität der Gefäße an den Zielorganen bestimmt. James Ewing vertritt die Meinung, dass die Organspezifität der Metastasen ausschließlich auf mechanischen Faktoren beruht und zwar mit Beteiligung des ersten Kapillarbettes, auf welches die Tumorzellen treffen. Klinische Beobachtung

hingegen zeigen, dass gewisse Tumorentitäten in bestimmte Organe metastasieren, sodass gewiss auch andere Faktoren bei der Wahl des Zielorgans eine Rolle spielen und dass die Verteilung der Tumorzellen an den Zielorganen nicht unwillkürlich erfolgt, sondern organspezifisch. So metastasiert Brustkrebs bevorzugt in Knochen, Leber, Lunge und Hirngewebe. Diese organspezifische Selektivität wurde erstmals vor über hundert Jahren von Stephen Paget in der sogenannten „Seed and Soil“-Theorie beschrieben. In diesem Konzept der Metastasierung, das „homing“, ist die erfolgreiche Interaktion der Tumorzelle (der Samen=Seed) mit der Umgebung eines anderen Organes (die Erde=soil) die Voraussetzung für die Bildung einer Metastase an einem spezifischen Organ. Studien haben gezeigt, dass Tumorzellen, die bevorzugt in die Lunge metastasieren, gut im subcutan eingebrachtes Lungengewebe wachsen. Im Gegensatz dazu wachsen die Tumorzellen nicht gut, wenn sie in subcutan eingebrachten Gewebe eines anderen Organes eingepflanzt werden (Fidler, 2003).

Nachdem die Tumorzellen am Zielorgan haften und die Implantation in die Gefäße erfolgt ist, müssen die Tumorzellen um sich dort anzusiedeln in das umliegende Gewebe des Zielorganes gelangen. Es wird stark angenommen, dass die Extravasation in das umliegende Gewebe auf ähnliche Weise wie die initiale Invasion geschieht. Nach erfolgreicher Extravasation führt eine eingeschränkte Proliferation der malignen Tumorzellen zu kleinen Kolonien an Tumorzellen, die Blutgefäße umgeben, und sogenannte Mikrometastasen bilden. Das weitere Wachstum dieser Kolonien zu klinisch relevanten Metastasen benötigt eine Gefäßbildung, um für die Ernährung und Proliferation zu sorgen. Die metastatischen Zellen müssen über Faktoren für die Angiogenese verfügen, wobei gewisse Faktoren auch von den Wirtszellen (Lymphozyten und Monozyten) im Rahmen der Interaktion mit den Tumorzellen zur Verfügung gestellt werden (Fidler, 2003).

Die Metastasierung ist ein hoch selektiver Prozess. Maligne Zellen, welche die oben genannten Prozesse überstanden haben, überstanden bereits eine anspruchsvolle Folge an feindlichen Prozessen, die zu einer Vernichtung der meisten Tumorzellen führt. Durch die radioaktive Markierung mit Iod-Iod-Desoxyuridine an Tumorzellen konnte eine Studie der Arbeitsgruppe von Fidler et al. in den 70-er Jahren des 20. Jahrhunderts zeigen, dass 24 Stunden nach Eintritt der Tumorzellen in den Blutkreislauf weniger als 0,1% noch überlebensfähig sind und nur 0,01% dieser Zellen überleben, um Metastasen zu bilden. Insofern sind nur wenige Zellen aus dem Primärtumor in der Lage zu überleben, um eine Metastase zu bilden. Jedoch kann schon eine einzelne Tumorzelle einen tödlichen Krankheitsverlauf hervorrufen.

2.6 Activated Leukocyte Cell Adhaesion Molecule (ALCAM)

Die Adhäsionsmoleküle werden in verschiedene Kategorien eingeteilt. Die Einteilung erfolgt in Immunglobuline, Cadherine, Selektine, Integrine und Mucine. ALCAM ist Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie der Adhäsionsmoleküle (IgCAMs). IgCAMs sind zum größten Teil transmembranäre Proteine, die nicht nur Zell-Adhäsionsrezeptoren sind, sondern auch an der Signaltransduktion bei den Kommunikationswegen aus der extrazellulären Matrix in die intrazelluläre Matrix teilnehmen (van Kempen et al., 2001).

ALCAM besitzt fünf extrazelluläre Immunglobulin-Domänen (zwei NH₂-terminal, distal der Membran variable V-förmige Falten und drei konstante C₂-förmige Immunglobulin Falten proximal der Membran) und ist an homophilen (ALCAM/ALCAM) und heterophilen (ALCAM /CD6) Zellinteraktionen beteiligt (siehe Abb. 4 und 5). Die Adhäsionsmoleküle, wie das Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule, sind wichtig für das Zellwachstum,

das Zellüberleben und die Mortalität sowie für die Invasion bei der Tumorprogression und die Metastasierung (Degen et al., 1998). Sie regulieren somit wichtige tumorbezogene biologische Prozesse, unter anderem auch die Migration, die Extravasation und das „homing“ der Tumorzellen.

Obwohl ALCAM in einer großen Anzahl an Geweben exprimiert wird, ist die genaue Lokalisation normalerweise auf die Zellabschnitte beschränkt, die mit dynamischem Zellwachstum, der Migration, der neuronalen Entwicklung, der Hämatopoese, der Immunantwort und der Tumorprogression involviert sind (Swart, 2002). Ein Verlust, Überexpression oder Defekt dieser Adhäsionsmoleküle könnte zu einer Abtrennung von Tumorzellen führen und somit die lokale Ausbreitung und Tumorprogression begünstigen (Jiang et al., 1994). Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle wie ALCAM verringern die Proliferation von Brustkrebszellen, jedoch auch die Adhäsion von Brustkrebszellen aneinander (King et al., 2004). Verschiedene Brustkrebssubtypen metastasieren in spezifische Organe. Deshalb haben unterschiedliche Studien Marker untersucht, die eine Metastasierung hervorrufen könnten. Dabei wurde versucht, die zugrundeliegenden Mechanismen der Metastasierungsprozesse zu verstehen (Landemaine et al., 2008, Minn et al., 2005a, Kang et al., 2003, Minn et al., 2005b). Diese Marker kodieren Proteine für einige Zell-Zell oder Zell-Matrix Adhäsionen (Smid et al., 2008).

In malignen Tumoren geht man davon aus, dass die Dysregulierung der Adhäsionsmoleküle zur Invasion und Metastasierung beitragen (Paschos et al., 2009, Schmidmaier and Baumann, 2008). Außerdem geht man davon aus, dass unterschiedliche Klassen von Adhäsionsmolekülen Einfluss auf den Metastasierungsort haben. Dies liegt möglicherweise an Bindungsmechanismen basierend auf organotropen Voraussetzungen und gewebespezifischen Charakteristika, dem sogenannten „homing“ (Gout et al., 2008, King, 2004). Die Rolle von ALCAM in der Metastasierung, sowie der Prognose von malignen Tumoren ist zweischneidig. Auf der einen Seite scheint aufgrund der reduzierten Adhäsion die Unterregulierung von ALCAM zur vermehrten Abtrennung von Tumorzellen von der Haupttumormasse beizutragen, um so Zugang zu den Metastasierungswegen zu gewinnen. Auf der anderen Seite haben Untersuchungen in Melanomen, in kolorektalen Tumoren, in Ösophagus Karzinomen und in Pankreaskarzinomen eine Verbindung von einer ALCAM-Überregulierung mit einer schlechten Prognose für die Erkrankten gezeigt. Dies kann möglicherweise damit zusammenhängen, dass eine erhöhte ALCAM-übermittelte Adhäsion von metastatischem Gewebe an die fernen Organe vorherrscht, nachdem sie sich vom Primärtumor abgelöst haben (Kristiansen et al., 2003, Lunter et al., 2005, van Kempen et al., 2000, Verma et al., 2005, Weichert et al., 2004, Burkhardt et al., 2006, Ihnen et al., 2008, King et al., 2004).

Zusammenfassend zeigt die aktuelle Studienlage, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um eine bessere Einsicht in die Funktion von ALCAM und dessen Rolle in den einzelnen Tumoren und deren Metastasierung und der Verwendung als Prognosefaktor zu erlangen oder als Angriffsziel einer Therapie.

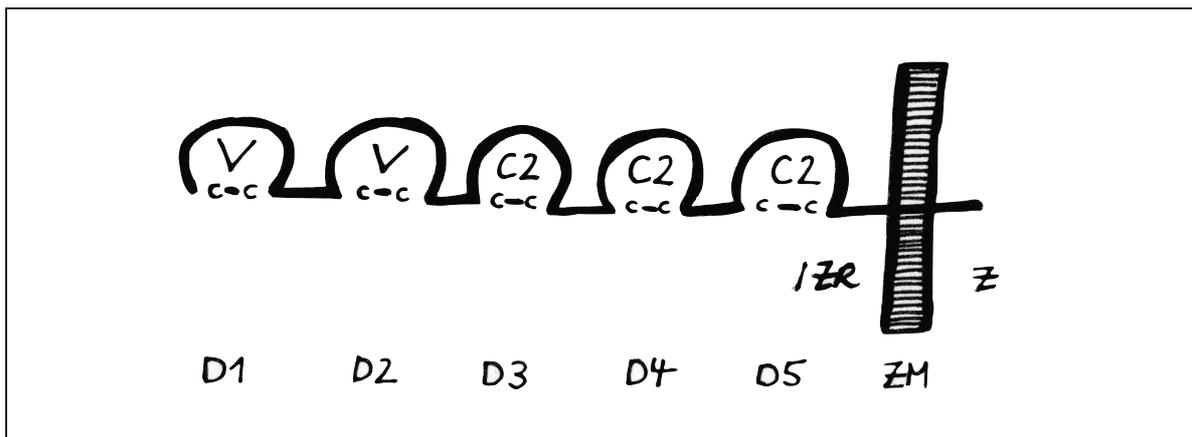


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Immunglobulins ALCAM (Modifiziert nach (Swart, G. W. 2002))

Darstellung der 5 extrazellulären Immunglobulin-Domänen (D1-5) mit: 2 aminoterminalen Immunglobulin-Domänen vom variablen Typ (V) distal der Membran und 3 Immunglobulin-Domänen vom Konstanten (C) Typ proximal der Membran (VVC2C2C2). IZR=Interzellulärraum, ZM=Zellmembran, Z=Zytoplasma.

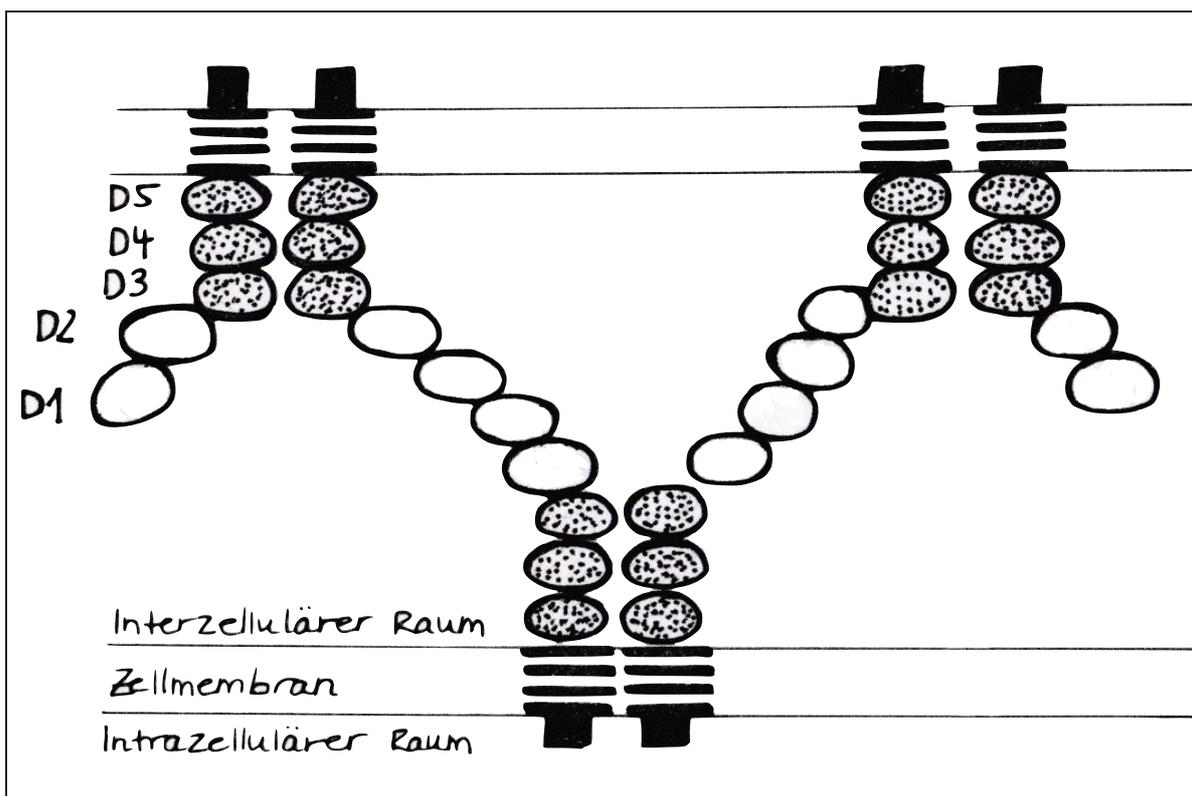


Abbildung 5: ALCAM Clustering und Netzwerk Formation (Modifiziert nach (van Kempen et al., 2004)).

Modell der Zell zu Zell Adhäsion vermittelt durch die homophile Interaktion von ALCAM. Darstellung der 5 extrazellulären Immunglobulin-Domänen (D1-5). D1-D2 Liganden bindende Module. D3-D5 Oligomerisierungs Module, wobei die Interaktionen mit anderen Liganden über die D1-Domäne erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Darstellung des Patientenkollektivs und Untersuchungsgutes

Das gesamte Patientenkollektiv von 557 Personen wurde in drei Gruppen eingeteilt.

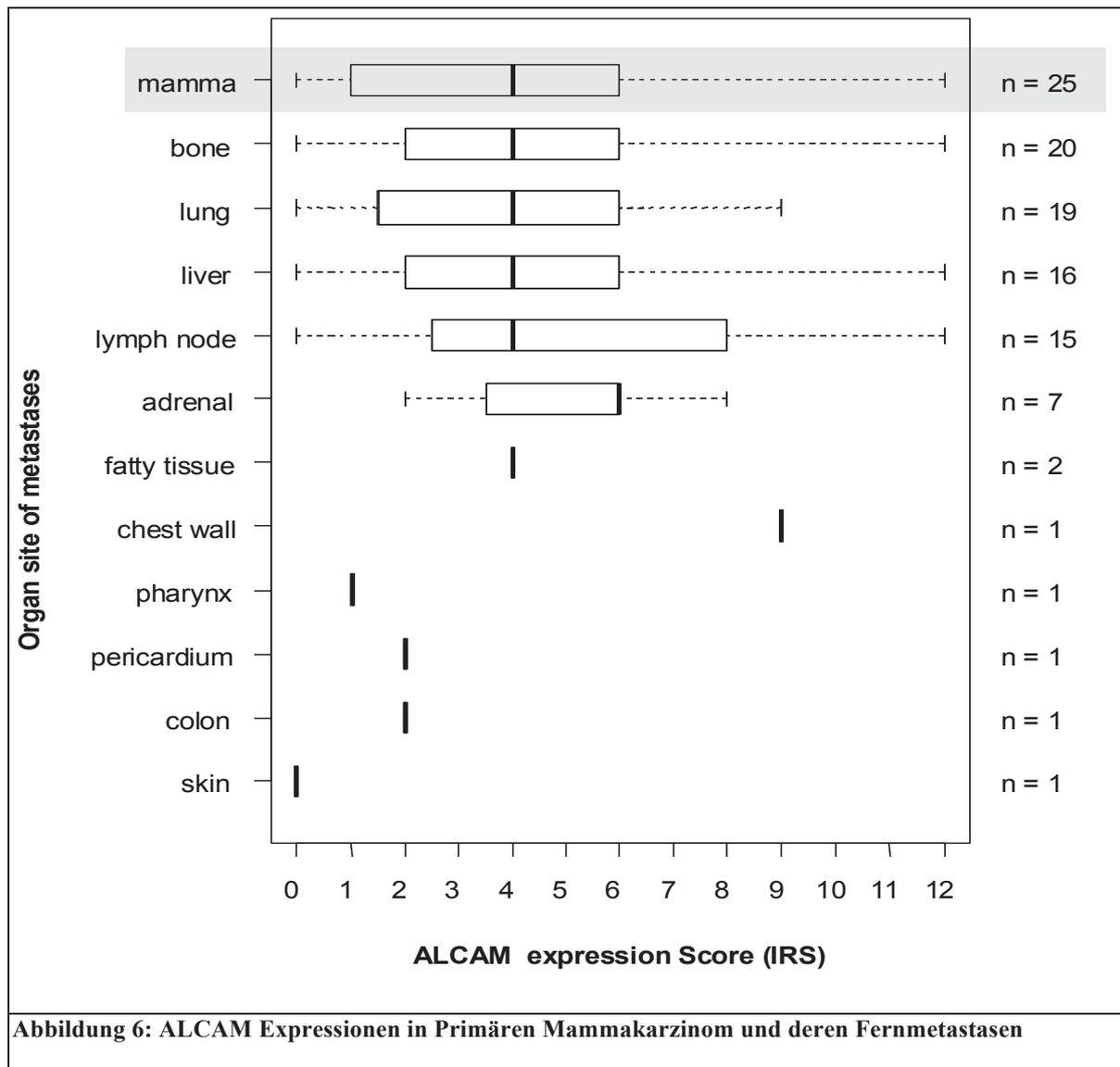
In der ersten Gruppe wurde das Tumorgewebe von 117 Brustkrebsfermetastasen unterschiedlicher Organlokalisationen (Leber (24), Lunge (19), Hirn (21), Knochen (36), Haut (17)) in Form von Paraffinblöcken zusammengestellt. Eine detaillierte Aufstellung des Kollektivs wird in Tabelle 1 dargestellt. Die Metastasen stammten von der ersten Manifestation einer Metastase nach primärer Brustkrebserkrankung. Primarius, Differenzierung, Östrogen- Progesteron- und Her2-Rezeptoren wurden den ursprünglichen pathologischen Befunden entnommen. Bei fehlendem Rezeptorstatus wurde das Gewebe nachuntersucht. Alle Proben wurden chirurgisch per Exzision oder als Biopsie entnommen, um das weitere palliative Vorgehen zu bestimmen. Der Primärtumor war bei 12 von 17 der Hautmetastasen vorhanden und wurde mit untersucht.

Tabelle 1: Klassifikationsmerkmale und Anzahl der in der Studie untersuchten Metastasen sowie Alter der Patienten

	Lokalisation					
	Gesamt	Knochenmark	Leber	Hirn	Lunge	Haut
		36	24	21	19	17
Patienten Alter						
Durchschnittsalter	62,2	61	63	56	67	72
(range)	(37-93)	(38-82)	(47-80)	(40-77)	(37-84)	(37-93)
histologischer Typ						
duktal	58	10	11	8	17	12
lobulär	5	2	0	0	2	1
Nicht klassifiziert	54	24	8	13	5	2
Grading						
G1-2	29	9	2	n.d.	13	5
G3-undifferenziert	39	17	9	n.d.	5	7
Nicht klassifiziert	49	10	8	21	6	0
ER Status						
positiv	51	11	14	6	11	9
negativ	36	7	5	15	4	5
Nicht untersucht	30	18	5	0	4	3
PR Status						
positiv	28	5	6	3	6	8
negativ	58	13	8	18	13	6
Nicht untersucht	31	18	6	0	6	1
HER2 Status						
positiv	17	4	5	n.d.	4	4
negativ	29	8	7	n.d.	4	10
Nicht untersucht	71	25	8	21	16	1

n. d., no data available (keine Daten vorhanden)

In der zweiten Gruppe des untersuchten Materials wurden 29 Sektionsfälle (siehe Abb. 6) untersucht mit Gewebeprobe von 25 Primärtumoren mit insgesamt 84 Metastasen. Durchschnittlich hatte jeder Fall drei Metastasen-Lokalisationen. Die Autopsien wurden im Zeitraum von 1997 bis 2005 von der Abteilung für Pathologie am Universitätsspital Basel durchgeführt. Ein fortgeschrittenes Mammakarzinom war die Todesursache aller hier berücksichtigten Patienten. In fünf Fällen war die Diagnose „Mammakarzinom“ erst zum Zeitpunkt der Autopsie gestellt worden. In vier Fällen war das Primärtumorgewebe nicht vorhanden. Hier wurden jedoch Metastasengewebe aus verschiedenen Lokalisationen gewonnen. Das Durchschnittsalter aller Patienten zum Zeitpunkt des Todes war 65 Jahre (43-93 Jahre). Alle Tumore waren schlecht differenziert (G3).



In der dritten Gruppe des untersuchten Materials wurde eine retrospektive Untersuchung an einem Tissue Micro Array (TMA) mit ins Knochenmark disseminiertem Tumorgewebe vom Mammakarzinom ausgehend von 411 Patienten untersucht. Follow-up-Daten waren mit einem Durchschnitt von 54,3 Monaten vorhanden. Die Patienten wurden im Zeitraum von 1999 bis 2006 im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt. Der histologische Typ und das Grading wurde pathologisch beurteilt sowie der ER und PR Status erstellt. Für die Erzeugung des TMA's wurden vom Pathologen auserwählte 0,6mm große Kernstücke aus den invasiven Anteilen des Tumors entnommen. Nach der immunhistochemischen

Bearbeitung waren 347 Tumore zur weiteren Auswertung brauchbar. Das durchschnittliche Alter der Patienten war hier 58,1 Jahre (27,5 bis 85 Jahre). Die Patienten hatten eine Chemotherapie oder eine Hormontherapie erhalten, keine neoadjuvante Therapie.

Alle in dieser Studie involvierten Patienten wurden im Albertinen Krankenhaus in Hamburg, im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf oder im Universitätsklinikum Basel in der Schweiz behandelt. Im Vorfeld wurde eine Zustimmung zur wissenschaftlichen Bearbeitung der Proben von den Patienten eingeholt (gemäß der Deklaration von Helsinki). Die Tumorgewebeprobe wurden in den Ursprungslaboren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. In allen beteiligten Laboren war die Verarbeitung der Präparate identisch. Die Knochenpräparate mussten einem Dekalzifizierungsprozess unterzogen werden, wobei es sich in den meisten Fällen um Knochenmark handelte, das wenig Kalzifikation aufwies. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass der Dekalzifizierungsprozess wenig Auswirkung auf das Gewebe hat.

3.1.2 Geräte

Die in der Untersuchung verwendeten technischen Mittel umfassen folgende Geräte:

- Mikrotom- Leica SM 2000R
- Mikrowelle
- Wasserbad (auf 45 Grad erhitzt)- Leica HI 1210
- Feuchtes Filterpapier
- Trockenplatte- Medax Nagel GmbH Kiel
- Inkubator
- Objektträger (Marienfeld-Adhäsions-OT)
- beschichtete Objektträger (Superfrost/Plus, Sondenheim)
- Paraffin-Tape-Transfer-Klebestreifen
- Waage
- Pipetten
- Pipettenspitzen (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Mikroskope
- Deckgläser

3.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Für die Versuchsreihen wurden folgend aufgeführte Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sowie kommerziell erhältliche Fertigkits, Lösungen, Pufferlösungen und Antikörper verwendet:

Kommerziell erhältliche Fertigkits und Antikörper:

- ABC Kit: Vectastatin Elite ABC Mouse Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA): 3 ml normal horse serum/ 1 ml biotinylated horse anti-mouse IgG secondary antibody/ 2 ml each of concentrated A and B reagents
- DAB Peroxidase Kit: DAB-Vector-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA

- CD166 (ALCAM) Mouse Monoclonal Antibody clone MOG/07 (1:400 verdünnt)
Vector Laboratories, Burlingame, California, USA

Die in der Untersuchung verwendeten Reagenzien:

- Alkohol (100%, 96%, 80%)
- BSA
- Zitronensäure
- Hämalun nach Meyer
- Eosin
- Hämatoxylin
- Methanol
- Natrium Chlorid
- tri-Natrium-Dehydrat
- Natriumcitrat
- Natriumdihydrogenphosphat
- Xylol
- Ethanol
- Aqua dest.
- Aqua bidest.
- Entellan
- Perhydrat
- H₂O₂
- TRIS-base
- BSA
- Eisessig

In der Untersuchung verwendete Lösungen und Pufferlösungen:

- 10mM Citratpuffer pH6,0: 5,88g tri-Natrium-Dehydrat auf 2l A.D.
- 0,5% H₂O₂ /Methanol: 5ml 30% Perhydrat auf 200ml Methanol
- TBS-Puffer pH 7,4 (TRIS buffered saline): 60,5g TRIS-base + 87,6g NaCl auf 1l A.D.
- Worksolution: 200ml TBS pH 7,4 auf 2l A.D.
- Blocking Solution: 1ml TBS- worksolution + 20µl Normal Serum (Vectastatin Elite ABC Kit)
- BSA Lösung: 2g BSA auf 100ml A.D.
- Secondary Antibody: 1ml TBS-worksolution + 20µl Normal Serum + 20µl Secondary Antibody
- ABC Reagent: 1ml TBS-worksolution + 20µl A +20µl B Reagenz
- DAB Substrat: 5ml A.D. + 2 Tropfen Buffer + 4 Tropfen DAB+ 2 Tropfen H₂O₂

3.2 Methoden

3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Zunächst wurden an den Präparaten eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt, um die Qualität des Gewebes zu beurteilen und um sicherzustellen, dass im Schnitt des jeweiligen Paraffinblockes auch Tumorgewebe vorhanden ist. Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden mit Hilfe des Mikrotoms, nach Kühlung der Paraffinblöcke auf Eis, Paraffinschnitte von 4-5µm Dicke angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden dann auf Objektträger (Marienfeld-Adhäsions-OT) überführt. Bei Versuchsdurchführung wurden die Gewebeschnitte zum Trocknen in den Wärmeschrank bei 50-60°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die in Färbeschiffchen einsortierten Präparate zweimal für jeweils zehn Minuten in Xylol entparaffiniert. Die Hydropholisierung der Gewebeschnitte erfolgte durch das Einlegen der Schnitte in eine Reihe mit absteigenden Alkoholkonzentrationen 100%, 96%, und 80% für jeweils 2x fünf Minuten mit abschließender fünfminütiger Ausreinigung in Aqua dest.-Lösung. Daraufhin wurden die Schnitte weitere fünf Minuten mit Hämalaun nach Meyer (ein Drittel der Farblösung bestand aus Aqua dest.) gefärbt und anschließend mit heißem Leitungswasser gespült und nach der Spülung in Aqua dest. gelegt. Danach wurden die Präparate für eine Minute in Eosin mit einem Tropfen Eisessig gelegt und kurz mit Aqua dest. ausgewaschen. Schließlich wurden die Schiffchen in eine Reihe mit aufsteigender Alkoholkonzentrationen 80%, 96%, 100% und anschließend für 2x zehn Minuten in Xylol eingelegt. Abschließend wurden die Präparate mit Eukitt und einem Deckgläschen eingedeckt.

3.2.2 Immunhistochemische Analyse

Nachdem in der H.E.-Färbung der Gewebeschnitt mikroskopisch nach Tumorkommen beurteilt und die Qualität des Schnittes für gut befunden wurde, erfolgte die Immunhistochemische Untersuchung. Die Schnitte ohne Tumorkommen wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte in folgenden Schritten:

3.2.2.1 Entparaffinierung und Hydropholisierung

Für die Immunhistochemie wurden mit Hilfe des Mikrotoms, nach Kühlung der Paraffinblöcke auf Eis, Paraffinschnitte von 4-5µm Dicke angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend auf beschichtete Objektträger (Superfrost/Plus, Sondenheim) überführt. Bei Versuchsdurchführung wurden die Gewebeschnitte zum Trocknen in den Wärmeschrank bei 60°C für 60 Minuten inkubiert.

Des Weiteren wurden die in Färbeschiffchen einsortierten Präparate zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Die Hydropholisierung der Gewebeschnitte erfolgte durch das Einlegen der Schnitte in eine Reihe mit absteigenden Alkoholkonzentrationen 100%, 96%, und 80% für jeweils zweimal zehn Minuten mit abschließender Ausreinigung in Aqua dest. Lösung für zehn Minuten.

3.2.2.2 Mikrowellenvorbehandlung/ Demaskierung

Die Citratpufferlösung wurde in mikrowelleneigneten Küvetten für eine Minute in einer Mikrowelle erhitzt, dann kurz bei Raumtemperatur (ca. 20°C) abgekühlt. Anschließend wurden die Präparate in den Citratpuffer eingelegt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wird durch eine Freilegung der Antigene eine höhere Antikörperaffinität

erzielt. Dadurch erhöht sich die Fähigkeit des Primärantikörpers sich mit dem entsprechenden Antigen zu binden. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte dreimalig eine Aqua dest. Spülung für jeweils fünf Minuten.

3.2.2.3 Methanolblockade/ Hemmung endogener Peroxidaseaktivität

Für die Methanolblockade wurden die Präparate in 200ml Methanol versetzt und mit 5ml Perhydrat 30% für 30 Minuten gesetzt. Bei der Methanolblockade werden endogene Peroxidasen (Oxidoreduktasen) gehemmt. Dieses ist unbedingt erforderlich, um eine unspezifische Hintergrundreaktion durch die Peroxidasen zu verhindern. Die Methanolblockade wurde mit einer dreimaligen Spülung der Gewebeschnitte in TBS-Puffer für jeweils 10 Minuten beendet.

3.2.2.4 Absättigung unspezifischer Bindungen

Die Präparate wurden nun in eine Feuchtekkammer gelegt mit einem Gemisch aus 1ml PBS-Puffer und 20µl „normal serum“ (für 20 Präparate gerechnet), und für eine Stunde zum Inkubieren in den Kühlschrank gelegt. Das „normal serum“ wurde aus dem ABC-Peroxidase Mouse Kit entnommen, dieses entstammt eines Pferdes. Bei diesem Vorgang werden unspezifische Bindungen durch das Normalserum abgesättigt und somit für weitere Reaktionen blockiert. Nach der Absättigung wurde das überschüssige Normalserum entfernt. Alle folgenden Inkubationen fanden in der Feuchtekkammer statt, um das Austrocknen der Präparate zu verhindern.

3.2.2.5 Inkubation mit dem Primärtumor

Der ALCAM-spezifische Primärantikörper wurde nun in einer Verdünnung von 1:400 mit einer BSA-Lösung angesetzt. Ca. 16 Stunden wurden die Gewebeschnitte bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Der Kontrollschnitt wurde nicht mit dem Primärantikörper besetzt.

3.2.2.6 Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte am Folgetag und begann mit dem Spülen der Präparate mit PBS-Pufferlösung (dreimal für jeweils 5 Minuten zum Entfernen des überschüssigen Primärantikörpers). Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde ein Gemisch aus biotinyliertem Sekundärantikörper, PBS-Pufferlösung und Normalserum eingesetzt. Bei diesem Vorgang kommt ein Antikörper zum Einsatz der gegen den entsprechenden Primärantikörper, d. h. gegen den Mouse Antikörper, gerichtet ist. Des Weiteren ist der Antikörper ein biotylinierter Antikörper, der durch die Koppelung an Biotin eine große Bindungsfähigkeit für das Protein Avidin erlangt. Er stellt das Bindeglied zwischen spezifischen Primärantikörpern und ABC-Komplex dar, der das Protein Avidin beinhaltet. Dieses Detektionssystem beruht auf der außerordentlich hohen Affinität des Proteins Avidin zum Vitamin Biotin. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Präparate wieder dreimal für je 5 Minuten in einer PBS-Pufferlösung gewaschen.

3.2.2.7 Inkubation mit dem Avidin/Biotin-Komplex (ABC-Komplex)

Hierzu wurden aus dem ABC-Peroxidase-Kit das Reagenz A, die PBS-Pufferlösung und das Reagenz B miteinander versetzt und gemischt. Nach Ablauf der Ruhezeit von 30 Minuten wurden die Präparate für weitere 30 Minuten mit dem Avidin/Biotinkomplex inkubiert. Nach dem Ansetzen und Mischen musste dieses Gemisch erneut für 30 Minuten ruhen. Die Ruhephase ist erforderlich damit die beiden Komponenten Avidin (Reagenz A) und die biotinylierte Meerrettich-Peroxidase (Reagenz B) sich miteinander verbinden können und somit einen Komplex bilden konnten. Es entstand ein Avidin-Biotin-Enzym-Komplex, der sich durch das Avidin an den biotinylierten Sekundärantikörper bindet und wodurch

schließlich eine Signalverstärkung stattfindet. Das Enzym ist in diesem Fall eine Peroxidase, die in der folgenden DAB-Reaktion das Substrat oxidieren läßt. Nach der Inkubation folgten wieder drei Waschvorgänge für je fünf Minuten mit einer PBS-Pufferlösung.

3.2.2.8 Gegenfärbung

Die Gegenfärbung wurde mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt und diente der Darstellung der Zellkerne (dunkelblau) und der besseren Differenzierung des Gewebes bei der histologischen Beurteilung. Die Hämatoxylinlösung wurde (in einem 1:3-Verhältnis) mit Aqua dest. verdünnt. Die Präparate wurden direkt im Anschluss an die DAB-Reaktion zweimal in Wasser und einmal in Aqua bidest. gespült. Anschließend wurden sie für 1-2 Sekunden in der gefilterten Hämalaun nach Mayer gefärbten Lösung und schließlich fünf Minuten fließend mit Leitungswasser gewässert. Nun erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 80%, über 96% bis zum absoluten Alkohol. Nach der Inkubation in Xylol (zweimal für jeweils 10 Minuten) wurden die Präparate mit Deckgläschen und dem Eindeckmedium Eukitt eingedeckelt.

3.2.2.9 Immunhistochemische Analyse der Tissue Microarrays

Die Schnitte wurden mittels Verwendung des Tape-Transfer-System (Instrumedics, Hackensack, NJ,USA) auf eine Dicke von 8µm geschnitten. Das „Paraffin-Tape-Transfer-System“ ist ideal für die Verwendung bei anspruchsvollem Gewebe, wie dies bei Tissue-Micro-Arrays der Fall ist. Zunächst wird der TMA-Block geschnitten. Hierfür wird ein Klebefilmfenster auf die Oberfläche des Paraffinblockes geklebt. Der Klebefilm greift den Gewebeschnitt während des Schnittvorganges auf, sodass kein Pinsel zum Auffangen des Gewebes nötig ist. Hiernach erfolgt der Transfer auf einen Objektträger. Es wurden die im Kit enthaltenden speziellen Objektträger (Adhesive Coated Slides), die ebenfalls einen Klebefilm besitzen, verwendet. Der Klebefilm mit dem Gewebeschnitt wird dann auf einem Objektträger aufgetragen und mit einem Handroller darauf laminiert. Im Anschluss wurden die Objektträger unter eine langwellige ultraviolette Lampe gestellt, die zu einer Polymerisation des Klebefilms auf dem Objektträger in ein hartes, lösungsmittelresistentes Kunststoff beiträgt, was zu einer Verankerung des Gewebeschnittes auf den Objektträger führt. Um den Klebefilm zu entfernen, wird der Objektträger in einer im Kit enthaltenden TPC-Lösung eingelegt, wonach sich der Film leicht ablösen lässt. Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte für ca. 16 Stunden in Xylol eingelegt. Die weitere Bearbeitung der Gewebeschnitte entspricht der oben aufgeführten Immunhistochemischen-Analyse der regulären Paraffinschnitte.

3.2.3 Auswertung der Immunhistochemie

Jedes Präparat wurde zunächst in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf das Vorhandensein von Tumorgewebe hin untersucht. Die Präparate ohne Tumornachweis wurden nicht in die statistische Wertung einbezogen. Daraufhin wurden die immunhistochemischen Präparate auf deren Expressionsstärke von ALCAM untersucht. Bei jeder Untersuchung wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt, dabei handelte es sich um Präparate, die bekannterweise stark oder schwach ALCAM- positiv waren.

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurde untersucht, in welchen Gewebsarealen Zelltypen oder subzellulären Arealen die betreffenden Proteine lokalisiert sind. Dadurch wurde auch das Vorkommen der Proteine im Zellkern und in der Zellmembran bestimmt. Des Weiteren wurde die Intensität der Färbung der angefärbten Areale im Gewebe beurteilt.

Die Auswertung erfolgte unabhängig durch drei fachlich geeignete Personen (einer Biologin, einer Gynäkologin und mir) und wurde anhand des Immunoreactive Scores (IRS) als Produkt der Färbungsintensität (Einstufung von 0-3: 0= keine Färbung, 1=wenig Färbung, 2=mittelgradige Färbung und 3=starke Färbung) bewertet und nach der Prozentzahl der positiven Zellen (Einstufung von 0-4: 0 ohne Färbung, 1<20%, 2 21-50%, 3 51-80%, 4> 80% positive Tumorzellen) nach Remmele und Stegner (Remmele and Stegner, 1987). Die membranöse und zytoplasmatische Färbung wurde separat ausgewertet. Für die Gesamtfärbung wurden beide Scores zusammengerechnet (mit IRS Werten von 0-24). Bei Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen wurde eine Einigung durch erneute gemeinsame Bewertung des Präparates erreicht. Hierbei standen ergänzend zwei Pathologen und ein Neuropathologe zur Verfügung die bei Rückfragen hinsichtlich der jeweiligen Qualität der Präparate beratend zur Seite standen.

Die Auswertung der Östrogen- und Progesteronexpression wurde ebenfalls anhand eines Mess-scores durchgeführt. Die Intensität der Färbung und der prozentuale Anteil gefärbter Zellen wurde mikroskopisch nach folgender Einteilung bestimmt. Die Färbeintensität wurde in 0=keine Färbung, 1=wenig Färbung, 2=mittelgradige Färbung und 3=starke Färbung eingeteilt. Der Anteil gefärbter Tumorzellen hingegen wurde von 0=0%, 1= <10%, 2=10-50%, 3=51-80% bis 4=80-100% eingeteilt.

Mittels der Multiplikation dieser beiden Faktoren (Färbungsintensität und Prozentanteil) ergab sich ein Wert zwischen 0 und 12, der eine Aussage über die Menge und die Dichte der Rezeptoren (ER/PR) im Gewebe erlaubte.

Beim Autopsiematerial, welches sich in einem allgemein guten zytologischen Zustand befand, jedoch geringe Anzeichen einer Zytolyse zeigte, wurde nicht zwischen membranösen und zytoplasmatischer Anfärbung unterschieden.

3.2.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „SPSS“ (Statistical Package for Social Sciences, Version 15.0) und der „Statistical Package R“ (Version 2.9.2.). Sämtliche Signifikanzprüfungen wurden mittels des „Chi-Quadrat-Testes“ nach Pearson durchgeführt. Ein p-Wert kleiner gleich 0,05 ist hier nach Pearson als statistisch signifikante Korrelation zu erachten. Die Berechnung der Statistik wurde durch Herrn J. F. Kerstin in dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

In der Gruppe der Metastasen wurde die unterschiedliche Expressionsstärke durch eine Varianzanalyse durchgeführt. Um die „family-wise error rate“ bei 5% zu halten, wurden paarweise Vergleiche mit dem „Tuckey-HSD-Test“ durchgeführt.

In den Sektionsschnitten wurden die Durchschnittswerte und Standardabweichungen des jeweiligen ALCAM-Scores in allen Metastasen-Lokalisationen berechnet. Ebenso wurden „intra-class correlations“ untersucht, um die Beständigkeit des gemessenen ALCAM-Scores in den verschiedenen Metastasen eines Patienten zu messen. Da dieser Wert beträchtlich hoch war und angibt, dass ein hoher Anteil der Varianz durch die Identität des Patienten erklärt wird, wurde das „Hierarchical Regressions Model“ angewendet. Hier wurde in der Metastasen-Lokalisation die gleiche Expressionsstärke von ALCAM entsprechend der Expressionsstärke im Primärtumor erwartet innerhalb eines Patientenfalles.

Für die Korrelation zwischen ALCAM-Expression und den histologischen oder klinischen Tumorcharakteristika in den Tissue-Micro-Arrays wurden „ χ^2 -Tests“ berechnet. Zur Beurteilung der Überlebensrate nach Diagnosestellung bis zum Tod wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt. Diese wurden mit dem „logrank test“ verglichen. Mittels den Cox Regressionen wurden „Hazard ratios“ in der uni- und multivarianten Analyse abgeschätzt.

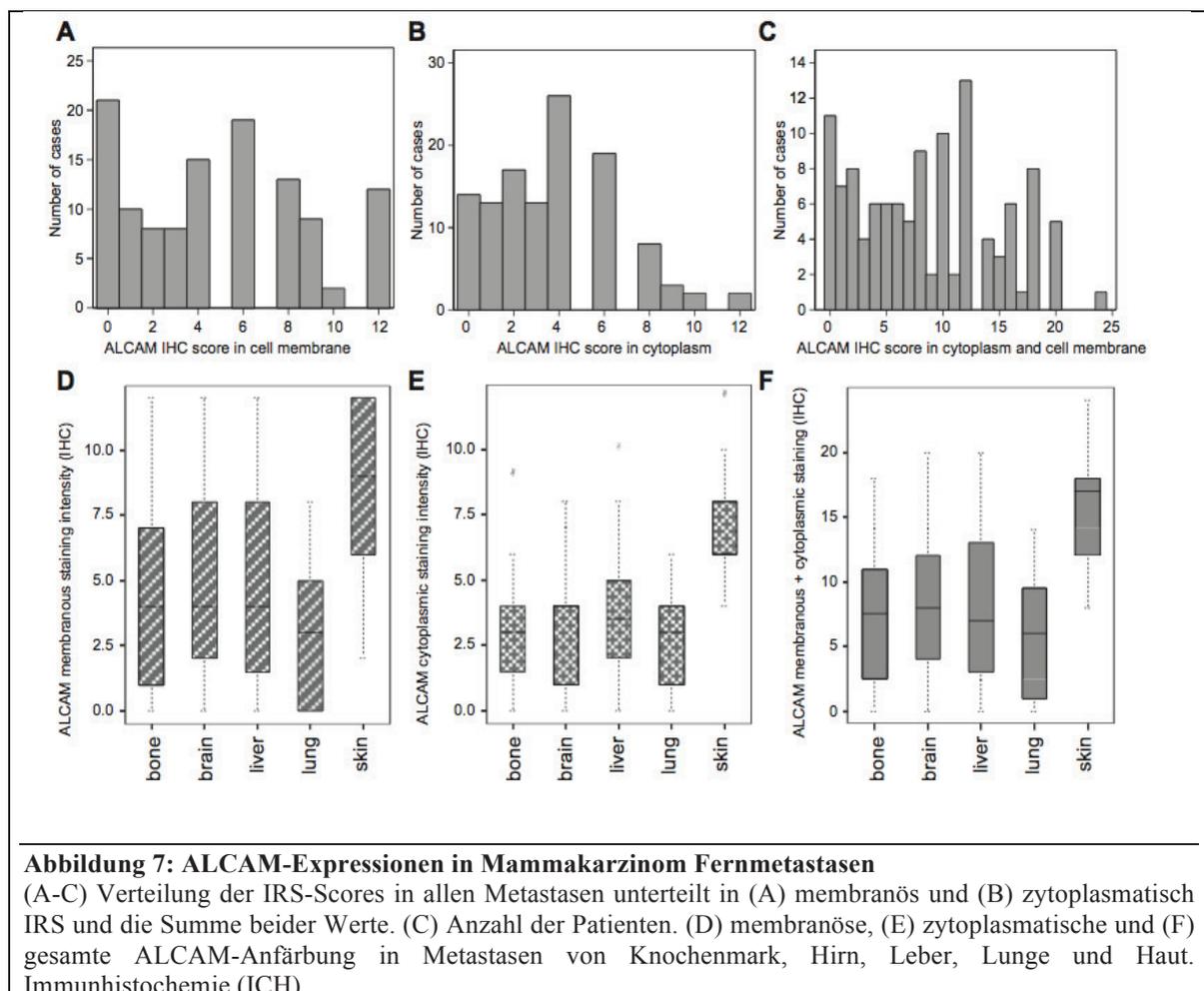
Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Journal of Clinical Pathology, Breast Cancer Research and Treatment und Disease Markers veröffentlicht (Ihnen et al., 2010) (Ihnen et al., 2011) (Hein et al., 2011).

4 Ergebnisse

4.1.1 Ergebnisse in der Gruppe der Metastasen

Die ALCAM-Expressionsstärken in den Metastasen variierten von negativer (IRS 0) bis stark ausgeprägter Expression (IRS 12) und wiesen eine Korrelation zwischen membranöser und zytoplasmatischer Färbung ($r=0,690$, $p<0,001$) auf. Bei 27% der metastasierten Zellen war die ALCAM-Expression negativ oder zeigte nur eine schwache Anfärbung (IRS 0-3). Abgesehen von neoplastischen Zellen wurde eine ALCAM-Immunoreaktivität in neuronalen Zellen (reaktive Astroglia), Leberparenchymzellen und Plattenepithelzellen beobachtet (siehe Abb. 8). Bindegewebszellen zeigten eine negative Expression. Eine positive ALCAM-Expression wurde in kleinen Kapillaren an der Invasionsfront der Tumore nachgewiesen, welches eine wichtige Voraussetzung für die Migration und Progression des Tumors in das umliegende Gewebe sein könnte.

Insgesamt variierte das Expressionsmuster von starker membranöser Anfärbung über geringe zytoplasmatische Färbung zu überwiegender zytoplasmatischer Färbung. Allerdings waren bei starker ALCAM-Expression die Membran und das Zytoplasma zugleich angefärbt. Die quantitative Verteilung der Expressionsstärke von ALCAM in membranösen, zytoplasmatischen und der insgesamten Färbung in den Metastasen wird in Abbildung 7 dargestellt.



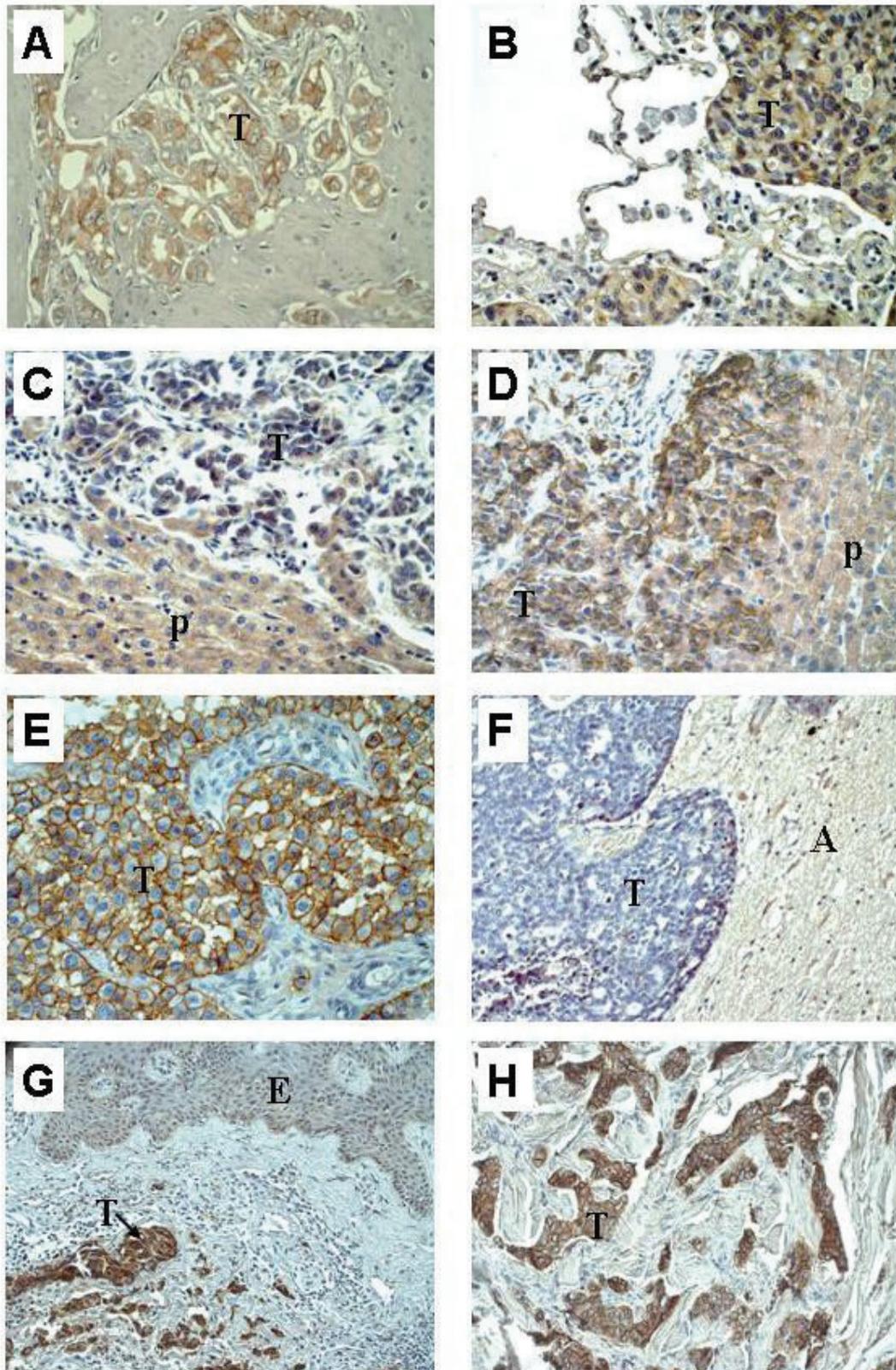


Abbildung 8: ALCAM-Immunreaktivität in Mammakarzinommetastasen

Repräsentative Proben zeigen die ALCAM-Positivität in: (A: Knochen, 400X (fache Vergrößerung), (B: Lunge, 200X), (C+D: Leber, 400X), (E+F: Gehirn, 400X u. 200X), (G +H: Haut, 200 X).

T: Tumor, E: Epithel, P: Leberparenchym, A: Reaktive Astroglia.

In den Fällen, in denen histologische Daten vorhanden waren, zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischer, membranöser oder der gesamten ALCAM-Färbung mit dem Grading, ER-, PR-, HER2- Status oder dem Alter der Patientin. In Bezug auf die anatomische Lokalisation der Metastasen waren die stärksten Anfärbungen in den Hautmetastasen mit einem durchschnittlichen IRS-Score von 8,76 (membranös) und 7,12 (zytoplasmatisch) vertreten. In den übrigen Lokalisationen war der durchschnittliche IRS-Score 2,63 bis 5,10 (membranös) und zwischen 2,79 bis 3,67 (zytoplasmatisch). Mittels der Methode des paarweisen Vergleichs waren signifikante Unterschiede zwischen der ALCAM-Expression in den Hautmetastasen und der ALCAM-Expression in allen weiteren Metastasenlokalisierungen ($p < 0,001$) darzustellen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich von ALCAM-IRS Scores in Metastasen unterschiedlicher Lokalisationen im paarweisen Vergleich

	ALCAM membranös		ALCAM zytoplasmatisch		ALCAM gesamt	
	diff	p-Wert ¹	Diff	p-Wert ¹	diff	p-Wert ¹
Hirn-KM	0.76	0.931	0.36	0.983	0.95	0.930
Leber-KM	0.29	0.998	0.69	0.813	0.96	0.956
Lunge-KM	-1.70	0.423	-0.18	0.999	-1.91	0.724
Haut-KM	4.43	<0.001	4.14	<0.001	8.55	<0.001
Leber-Hirn	-0.47	0.991	0.33	0.991	0.01	1.000
Lunge-Hirn	-2.46	0.174	-0.54	0.954	-2.86	0.373
Haut-Hirn	3.67	0.014	3.78	<0.001	7.60	<0.001
Lunge-Leber	-1.99	0.341	-0.88	0.764	-2.87	0.406
Haut-Leber	4.14	0.003	3.45	<0.001	7.59	<0.001
Haut-Lunge	6.13	<0.001	4.33	<0.001	10.46	<0.001

¹, p-Werte des Tukey-HSD Testes

Um die ALCAM-Expressionsstärke in den Hautmetastasen mit dem zugehörigen Primarius zu vergleichen, wurden zwölf einander zugehörige Paare untersucht, deren IRS-Daten in Primarius und Metastase bekannt waren. In acht von zwölf Paaren war die ALCAM-Expression im Primarius (Durchschnitts IRS-Scores von 11,67 insgesamt) geringer ausgeprägt als in der entsprechenden Metastase (Durchschnitts IRS-Scores von 15,58 insgesamt) wie in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Vergleich von ALCAM-Anfärbung in Paaren von Hautmetastasen mit korrespondierenden Primärtumoren

Fall Nr.	gesamte ALCAM Anfärbung (IRS)-Scores	
	Hautmetastase	Primärtumor
1	12	10
2	20	6
3	14	20
4	18	20
5	10	3
6	12	9
7	18	22
8	18	15
9	12	16
10	18	8
11	15	9
12	20	2
Mittelwert	15,58	11,67

4.1.2 Ergebnisse in der Gruppe der Sektionsschnitte

4.1.2.1 Primärtumor:

In physiologischem Brustgewebe zeigt ALCAM eine fleckige, membranöse und zytoplasmatische Verteilung sowie eine variable Anfärbung der Brustdrüsengänge in der immunhistochemischen Darstellung. Während die Großzahl der luminalen Zellen eine positive Anfärbung für ALCAM aufweist, zeigten sich die Basalzellen größtenteils negativ oder nur schwach angefärbt. In 24 der 25 schlecht differenzierten invasiven Brustkrebsfälle war eine ALCAM-Anfärbung im Tumor erkennbar. Die Verteilung der ALCAM-Expression innerhalb des Tumors und die Färbeintensität zeigten sich variabel und heterogen. In zwei Fällen konnte eine stärkere Anfärbung an der Invasionsfront des Tumors als im Tumorzentrum beobachtet werden, allerdings ohne entsprechende Darstellung in den Metastasen. Exemplarisch zeigten sich zwei repräsentative ALCAM-Anfärbungsmuster (siehe Abb. 9).

4.1.2.2 Metastasen

Aufgrund der heterogenen Anfärbungen von ALCAM in den Primärtumoren wurden neben dem Primärtumor auch die Metastasen des entsprechenden Patienten untersucht, um festzustellen, ob das Expressionsmuster und die Färbeintensität innerhalb eines Patienten ähnlich ist und ob es einen präferierten Metastasierungsort gibt. Nur zwei Fälle zeigten keine Anfärbung. In alle weiteren Fälle waren die Tumorzellen heterogen positiv angefärbt und mit einer ähnlichen Färbeintensität wie der entsprechende Primärtumor ausgeprägt. Die Verteilung der Expression innerhalb des Tumors zeigte keine Ähnlichkeiten im Vergleich zwischen Primärtumor und Metastase. Dies lag an den unterschiedlichen Größen und Verteilungsmustern innerhalb der einzelnen Metastasennestern. Die Auswertung der ALCAM-Anfärbung in den Knochenmetastasen der Sektionspräparate wurde durch die vorangehende Dekalzifizierung behindert, und die Unterteilung zwischen membranöser und zytoplasmatischer Anfärbung war nicht eindeutig zu erkennen.

4.1.2.2 Statistische Analyse

In den metastatischen ALCAM-Expressionen gibt es ein ICC von 80,9%, welches ein starkes „Cluster Effect of Measurement“ im gleichen Patienten anzeigt. Beim Vergleich der ALCAM-Expressions-Scores in den Metastasen mit dem Primärtumor konnte durch „hierarchical regression analysis“ gezeigt werden, dass die Expressionsstärken im Primärtumor prognostisch für die durchschnittliche ALCAM-Expressionsstärke innerhalb eines Patienten in allen Metastasenlokalisationen (slope=0,773, $p < 0,001$, $r^2 = 0,504$) sind. Gemäß diesem Modell kann der Unterschied zwischen der durchschnittlichen Metastasierung der Patientin die ALCAM-Expression in 58,1% der Fälle durch die Unterschiede der ALCAM-Expression im Primärtumor, wie Abb. 9 zeigt, dargestellt werden. Trotz der guten Erklärung zeigte sich im Modell ein ICC von 63,8%, dieses deutet darauf hin, dass es weitere individuelle Patientencharakteristika gibt, welche die ALCAM-Expressionsstärken in den Metastasen beeinflussen.

Die durchschnittlichen ALCAM Expressionsstärken in unterschiedlichen Organlokalisationen wie Mamma (Primärtumor) (N=25), Lymphknoten (N=15), Lunge (N=19), Knochen (N=20), Leber (N=19) und Nebenniere (N=7) sind in Abbildung 10 gezeigt. Die Analyse der Korrelation zwischen den ALCAM-Expressions-Scores im Primärtumor mit dem Alter und der Anzahl oder der Lokalisation der Metastasen ergab keine signifikanten Verbindungen. Eine Abhängigkeit der ALCAM-Expression im Primärtumor und der bevorzugten Metastasen-Lokalisation kann in diesen Fällen

möglicherweise schwer ermittelt werden, da die Erkrankung bei ubiquitärer Metastasierung sehr weit fortgeschritten ist.

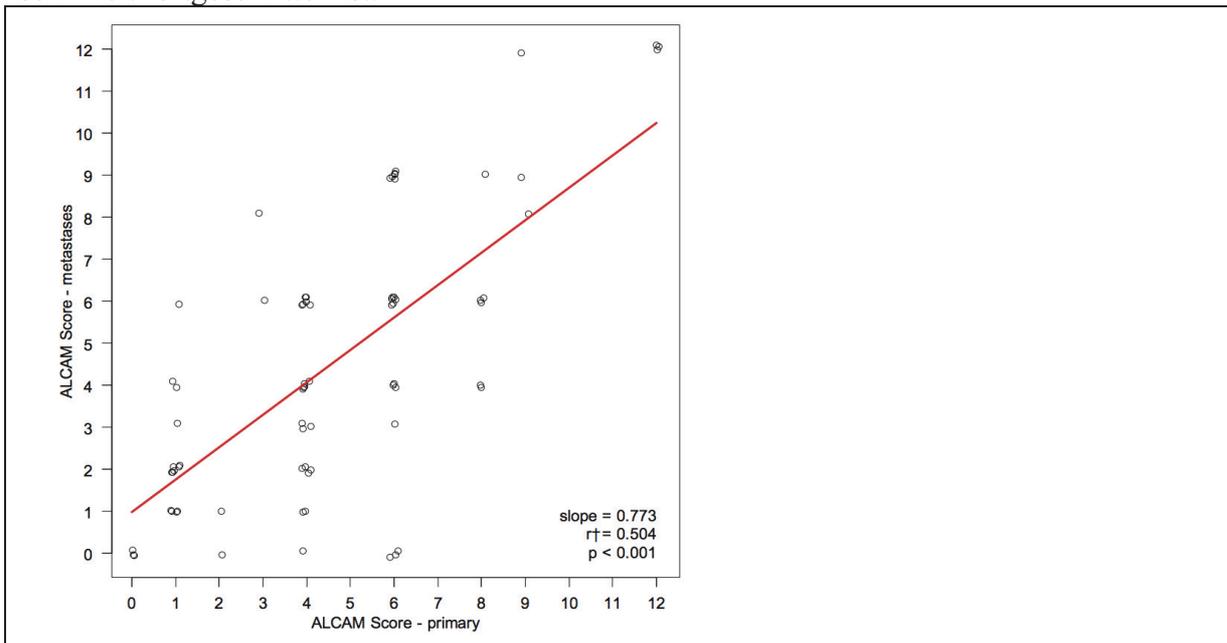


Abbildung 9: Regressionsanalyse der ALCAM-Expressionsstärken in den Metastasen (N=84) und ALCAM Expressionsstärken in deren primären Mammakarzinomen (N=24)

Wie dargestellt, können Differenzen zwischen der durchschnittlichen ALCAM-Expression in der Metastase in 58% der Fälle durch die Differenzen in der ALCAM-Expression im Primärtumor erklärt werden. In den ALCAM-Expressionen der Metastasen wurde ein ICC von 80% erreicht, welches den „cluster of effect measurement“ innerhalb des selben Patienten anzeigt.

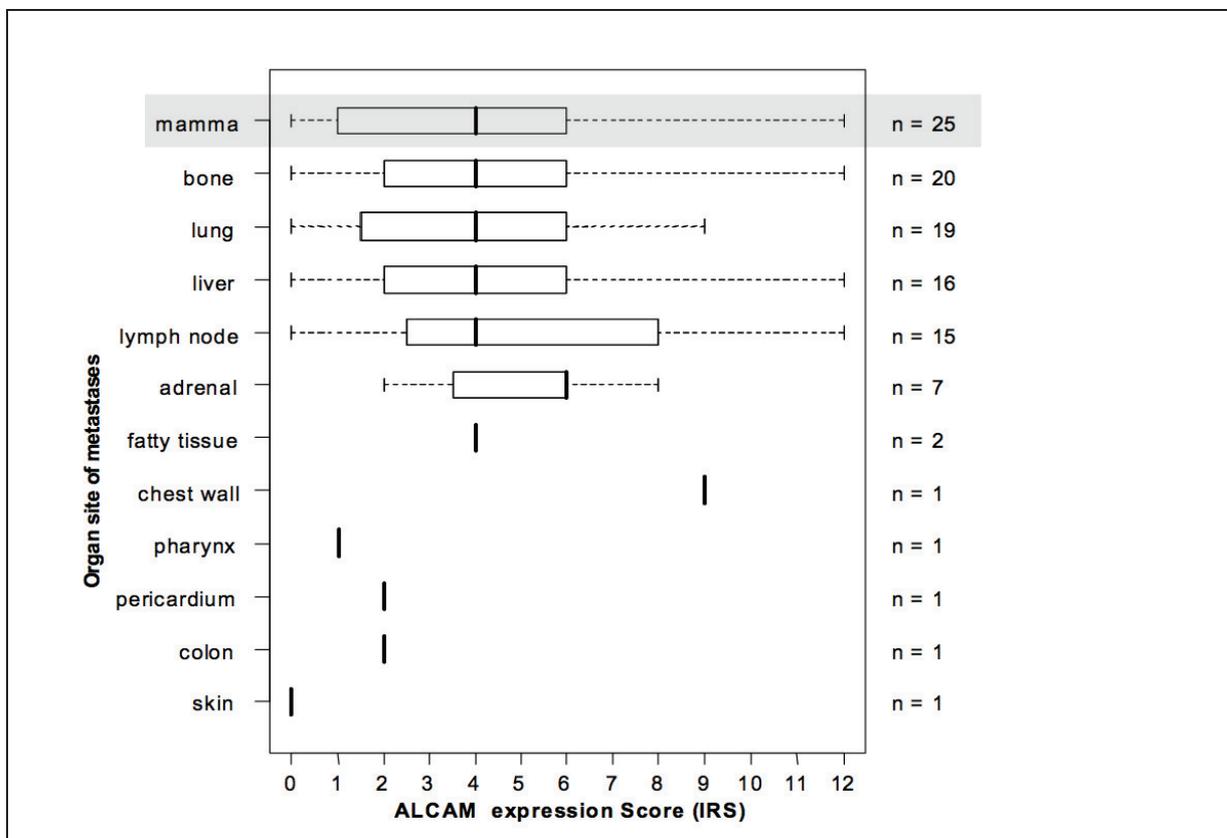


Abbildung 10: Boxplot-Analyse von ALCAM-IRS-Scores in verschiedenen Metastasen und deren Primärtumoren

Der Median, die Standardabweichung, das Minimum und das Maximum sind hier dargestellt.

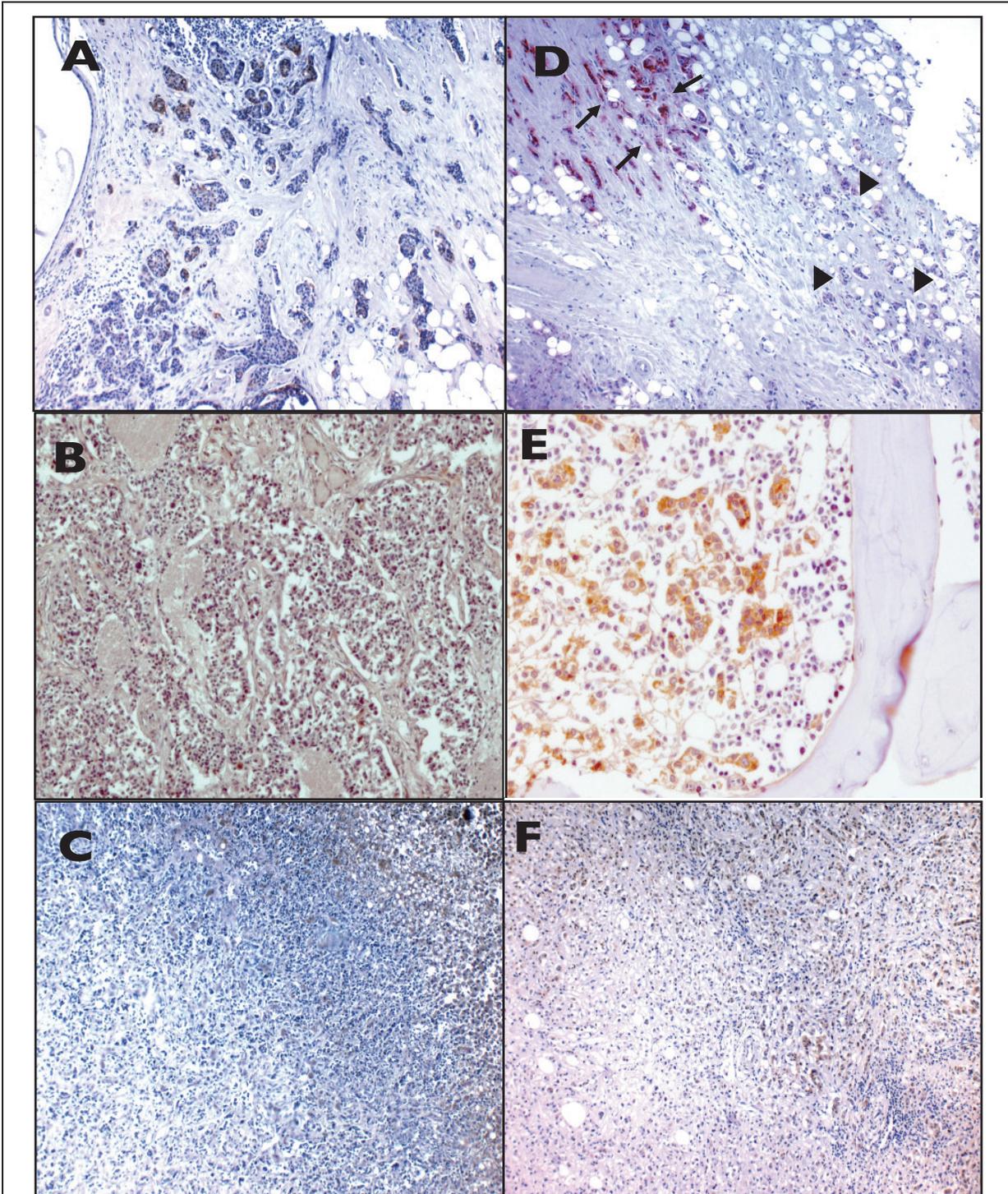


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von ALCAM im primären invasiven Brustkrebs und deren viszeraler Metastase

Fall #1 (A-C): Im Primarius invasives duktales Mammakarzinom mit heterogener ALCAM- Expression und positiven und negativen Tumorzellen (A). Neben schwacher bis moderater zytoplasmatischer Lokalisation eine stark homogene membranöse ALCAM-Färbung. Aus demselben Patienten dargestellte Tumorzellen aus Lungenmetastasen (B) durchgehend ALCAM-negativ sowie Tumorzellen in der Leber (C). Normales Lebergewebe zeigt eine moderate zytoplasmatische Färbung (oben rechts).

Fall #2 (D-F): Ebenso eine heterogene Expression von ALCAM im Primarius eines weiteren invasiven duktales Mammakarzinoms (D) jedoch sind die Tumorzellen eindeutig getrennt in verschiedene Bereiche des Tumors bezüglich der ALCAM-Expression. Starke membranöse Färbung in fast allen Tumorzellen in einem Teil sichtbar (Pfeile), wobei ein weiterer Teil des Tumors ALCAM negativ (Pfeilköpfe) ist. Tumorzellen der Knochenmetastase dieses Tumors (E) und in der Nebenniere (F) zeigen eine deutliche membranöse ALCAM Expression.

4.1.3 Ergebnisse in der Gruppe der Tissue-Micro-Arrays

Da vorherige Ergebnisse bezüglich der prognostischen Auswirkung von der ALCAM-Expression kontrovers waren, wurde entschieden, die ALCAM-Expression in einer größeren, unabhängigen Patientengruppe zu untersuchen (die klinischen und histologischen Charakteristika werden in Tabelle 4 dargestellt).

Da die subzelluläre Lokalisation der Immunoreaktivität in den Knochenstanzen nicht stets eindeutig zu definieren war, wurde in diesen Fällen nicht zwischen membranöser und zytoplasmatischer Anfärbung unterschieden. In 74 Fällen (21%) konnte keine ALCAM-Anfärbung in den Tumorzellen identifiziert werden. Eine schwache Färbung (IRS 1-3) konnte in 136 Fällen (39%), eine moderate Anfärbung (IRS 4-6) in 95 Fällen (27%) und eine starke Anfärbung (IRS 8-12) bei 42 der Patienten (12%) festgestellt werden.

Für die statistische Analyse wurden drei Gruppen erstellt. Eine ALCAM-negative Gruppe, eine Gruppe für die schwach und moderat angefärbten zusammengefasst, da diese Gruppen ein ähnliches Verhalten aufwiesen und die dritte Gruppe bilden die Fälle mit einer starken Expression. Anhand dieser Gruppen wurden Korrelationen mit klinischen und histologischen Angaben evaluiert. Es zeigten sich hoch signifikante positive Assoziationen mit Östrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus (in Tabelle 5 dargestellt).

Im Gegensatz dazu zeigte die Korrelation mit dem histologischen Grading eine bimodale Verteilung mit einer Überrepräsentation von negativer und starker ALCAM-Anfärbung in schlecht differenzierten Tumoren. Es konnten keine signifikanten Assoziationen mit Alter, Tumorstadium und dem histologischen Typ identifiziert werden.

Zusätzlich zur Lymphknotenbeteiligung ist die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ein potentieller Risikofaktor für ein Rezidiv des Brustkrebses (Braun et al., 2005). In unserer Kohorte korrelierte die ALCAM-Expression signifikant mit einer Lymphknotenbeteiligung ($p=0,006$) und es zeigte sich eine Tendenz in Richtung einer höheren Rate an Tumorzellen im Knochenmark in diesen Patienten ($p=0,084$), wie in Tabelle 5 zu sehen ist.

In der Kaplan-Meier-Analyse mit einer durchschnittlichen Follow-up-Zeit von 54,3 Monaten war eine hohe ALCAM-Anfärbung (IRS 8-12) mit einer kürzeren allgemeinen Überlebensrate assoziiert werden im Vergleich zu Patienten mit schwachen bis moderaten ALCAM-Scores ($p=0,021$). ALCAM negative Tumore lagen zwischen diesen Werten. Im Sinne einer rezidivfreien Überlebensrate zeigten Tumore mit negativen oder schwachen Anfärbungen (ALCAM-Score 0-6) im Vergleich zu denen mit einer ALCAM Überexpression eine bessere Prognose, jedoch lag dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ($p=0,279$) vor.

In der Stratifizierung gemäß dem histologischen Tumortyp konnte gezeigt werden, dass die prognostische Auswirkung von einer ALCAM-Überexpression in duktalem Karzinomen deutlicher zu sehen war (OAS: $P=0,003$; RFS: $P=0,048$), wobei in anderen histologischen Typen keine prognostisch signifikanten Werte gefunden werden konnte. In der weiteren Stratifizierung gemäß endokriner Therapie oder Chemotherapie konnten keine prognostisch signifikanten Unterschiede in der allgemeinen Überlebensrate sowie der rezidivfreien Überlebensrate in Bezug auf den ALCAM-Spiegel in den respektiven Subgruppen festgestellt werden.

Tabelle 4: Kohorten-Charakteristika von Brustkrebspatienten mit Knochenmetastasen untersucht auf ALCAM-Expression

	<i>n</i> ^a	%
Histologischer Typ		
Duktal	246	70,9
Lobulär	61	17,6
Duktolobulär	20	5,8
Unbekannt	20	5,8
Stadium		
T1	180	51,9
T2	135	38,9
T3	17	4,9
T4	12	3,5
Lymphknotenstatus		
Negativ	210	60,5
Positiv	136	39,2
Knochenmarkstatus		
keine Tumorzellen	256	73,8
1-2 Tumorzellen	64	18,4
>2 Tumorzellen	21	6,1
Fernmetastasen		
M0	328	94,5
M1	13	3,7
Grading		
G1	23	6,6
G2	187	53,9
G3	130	37,5
ER Status		
Negativ	75	21,6
Positiv	270	77,8
PR Status		
Negativ	116	33,4
Positiv	228	65,7
Chirurgische Therapie		
BET	244	70,3
Mastektomie	97	29,0
Adj. Chemotherapie		
Ja	223	64,3
Nein	117	33,7
Radiatio		
Ja	275	79,3
Nein	64	18,4
Hormontherapie		
Ja	249	71,8
Nein	87	25,1
Rezidiv		
Nein	277	79,8
Ja	55	15,9
Tod durch MaCa		
Nein	308	88,8
Ja	33	9,5

Tabelle 5: ALCAM-Protein-Expression in Brustkrebspatienten: Korrelation zwischen klinischen und histologische Tumorcharakteristika

		<i>n</i> ^a	ALCAM (IRS 0)	ALCAM (IRS 1-6)	ALCAM (IRS 8-12)	P
n (%)			74 (21)	231 (67)	42 (12)	
ER Status	negativ	75	29 (38)	34 (45)	12 (16)	
	positiv	270	45 (17)	196 (73)	29 (11)	<0.001
PR Status	negativ	116	37 (32)	63 (54)	16 (14)	
	positiv	228	37 (16)	166 (73)	25 (11)	0.001
Grading	G1-2	210	37 (18)	151 (72)	22 (10)	
	G3-4	130	35 (27)	78 (60)	17 (13)	0.066
Stadium	T1	180	41 (23)	123 (68)	16 (9)	
	T2	135	25 (19)	91 (67)	19 (14)	
	T3-4	29	8 (28)	15 (52)	6 (21)	0.196
Lymphknoten Status	negativ	210	48 (23)	146 (70)	16 (8)	
	positiv	136	26 (19)	84 (62)	26 (19)	0.006
Knochenmark Status	Keine Tumorzellen	256	60 (23)	170 (66)	26 (10)	
	>/= 1 Tumorzellen	85	13 (15)	57 (67)	15 (18)	0.084

¹, fehlende Patienten zu n= 347: keine Daten. Tumore mit fehlenden Werten wurden aus dieser Analyse herausgenommen.

Für die univariate „Cox-Regressions-Analyse“ wurden Patienten mit negativen und schwach/moderaten ALCAM-Anfärbungen kombiniert und mit Fällen mit starken ALCAM-Expressionen verglichen. Hier zeigte sich ein signifikant prognostischer Effekt einer Überexpression auf das rezidivfreie Überleben (HR= 2,47, 95% CI:1,17-5,22, P=0,018) und auf die allgemeine Überlebensrate in dukalen Karzinomen (HR=4,32, 95% CI:1,61-11,56, P=0,004). In der gesamten Kohorte war der prognostische Effekt auf das rezidivfreie Überleben nicht signifikant oder nur marginal signifikant in der allgemeinen Überlebensrate (HR=2,34, 95% CI: 1,01-5,39, P=0,047). In der multivariaten Analyse einschließlich des Stadiums, des Lymphknotenstatus, des Gradings, des Östrogenrezeptorstatus und des Vorkommens von disseminierten Tumorzellen war der prognostische Effekt von ALCAM im rezidivfreien Überleben in dukalen Karzinomen ohne Signifikanz (P= 0.050) (dargestellt in Tabelle 6).

Wie in den meisten Studien wurde die durchschnittliche Expression als „Cut-off-Value“ verwendet. Die gleiche Analyse wurde mit zwei Gruppen ähnlicher Größe durchgeführt (IRS 0-2: n=174; IRS 3-12: n=173). Eine signifikante Korrelation mit klinischen oder histologischen Parametern sowie zum Ausgang der Erkrankung konnte jedoch nicht ausgemacht werden. Dennoch konnte eine Assoziation von hohen ALCAM-Expressionen mit der Lymphknotenbeteiligung des Tumors (p=0.006) dargestellt werden.

Tabelle 6: „Cox-Regressionsanalyse“ mit konventionellen Prognosefaktoren, disseminierten Tumorzellen ins Knochenmark und ALCAM-Überexpression im duktalem Mammakarzinom

	HR	95% CI	P
OAS			
ALCAM ^a	2,98	0,94-9,53	0,065
Grading	1,72	0,59-5,07	0,322
Stadium	0,79	0,35-1,75	0,556
ER Status	0,45	0,15-1,33	0,149
LN Status	2,62	0,88-7,81	0,084
KM Status	3,68	1,40-9,67	0,008

Rezidivfreies Überleben

ALCAM ^a	2,30	1,00-5,27	0,050
Grading	1,77	0,87-3,59	0,115
Stadium	1,12	0,67-1,87	0,673
ER-Status	1,57	0,68-3,66	0,294
LN-Status	1,99	0,98-4,03	0,057
KM-Status	2,94	1,50-5,77	0,002

^a Es wurden zwei Gruppen korrespondierend mit einem IRS von 0-6 und 8-12 untereinander verglichen.

5 Diskussion

5.1 Diskussion in der Gruppe der Metastasen

In der Vergangenheit wurde ALCAM in verschiedenen Tumorentitäten analysiert, Brustkrebsmetastasen hingegen wurden zum Durchführungszeitpunkt dieser Studie (2007-2008) ausschließlich in dieser Arbeitsgruppe analysiert (Ihnen et al., 2010, Hein et al., 2011, Ihnen et al., 2011). Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, Brustkrebsmetastasen auf ALCAM-Expression zu untersuchen. Die beschriebenen Metastasen waren das erste Rezidiv des Mammakarzinoms. Obwohl die Anfärbung und Intensität mit dem Adhäsionsmolekül nicht die Metastasen-Lokalisation oder den Zeitpunkt der Metastasierung bestimmten, wurde festgestellt, dass die Färbung in den Hautmetastasen deutlich höher war als in allen anderen untersuchten Metastasen. Zudem schienen die ALCAM-Anfärbungen der Primärtumore, die den Ursprung für Hautmetastasen darstellten, ebenfalls eine höhere Intensität zu haben als Primärtumore von Metastasen anderer Lokalisationen. Diese Beobachtung könnte andeuten, dass hohe ALCAM-Spiegel im Primärtumor mit der Metastasierung in die Haut einhergehen (Ihnen et al., 2011).

Dieser Befund ist insofern interessant, da vorangegangene Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass hohe ALCAM-Expressionen im malignen Melanom mit einer Progression und Metastasierung der Erkrankung einhergehen (van Kempen et al., 2000, Degen et al., 1998). In Zelllinien vom malignen Melanom führen intakte ALCAM-Vernetzungen zur Überexpression von membran-gerichteten (MT) Matrix Metalloproteinasen (MMP) MT1-MMP mit anschließender Aktivierung von MMP2, welches mit einer Tumorprogression einhergeht. Dieses könnte die Forschungsergebnisse unterstützen (Lunter et al., 2005). Die Matrix Metalloproteinasen sind zinkionenabhängige Proteinasen, deren Expression in physiologische Zell-Umbau-Prozesse und Zellmigration sowie Gewebeinvasion, Metastasierung und Angiogenese involviert sind (Lunter et al., 2005).

Antikörperuntersuchungen haben mögliches therapeutisches Potenzial in der Behandlung vom Mammakarzinom und Pankreaskarzinom gezeigt (Wiiger et al., 2010). Eine Studie von Wiiger et al. konnte zeigen, dass das invasive Potential von Brustkrebs durch die Gabe von ALCAM-Antikörpern deutlich reduziert werden konnte. Dieses stellt die mögliche pathogene Wirkung von membranösen ALCAM-Molekülen dar und eröffnet neue therapeutische Ansätze, die mit dem ALCAM-Rezeptor interagieren (Wiiger et al., 2010). Eine ALCAM-Expression in Brustkrebs in vivo und in vitro könnte zu einem „homing“ der metastatischen Zellen in spezifische Organe führen, welches weiteres therapeutisches Potential für die Entwicklung von ALCAM basierte Therapieoptionen aufdeckt (King, 2004) (Davies et al., 2008). In Bezug auf Lungenmetastasen zeigte King et al., dass ALCAM auf mikrovaskularisierte Endothelzellen der Lunge exprimiert war und so die Extravasation von ALCAM-positiven Krebszellen primär in die Lunge fördern (2004). Diese Hypothese konnte durch die Untersuchungen von Choi et al. unterstützt werden. Seine Arbeitsgruppe untersuchte ALCAM-Expressionen in Fibrosarkom-Zellen im Mäusemodell und bestätigte einen Zusammenhang zwischen ALCAM-Expressionen und der Entstehung von Lungenmetastasen (Choi et al., 2000). Anhand dieser Arbeit konnte keine erhöhte ALCAM-Expression in Lungenmetastasen bestätigt werden. Allerdings könnte für die Entstehung von Hautmetastasen dieser zugrundeliegende Mechanismus in Erwägung gezogen werden.

Da in dieser Studie die Materialien aus drei verschiedenen Instituten stammen, könnte man annehmen, dass Variationen in der immunhistochemischen Anfärbung durch die

unterschiedliche Gewebeweiterverarbeitung entstanden sein könnten. Dennoch haben alle drei Institute die gleichen standardisierten Fixations- und Aufbereitungsmethoden verwendet. Zudem haben unsere statistische Auswertungen keine Unterschiede in den Ergebnissen aus den verschiedenen Instituten gezeigt, sodass wir überzeugt sind, dass unsere Ergebnisse zulässig sind.

5.2 Diskussion in der Gruppe der Sektionsschnitte

Alle bisherigen Studien von ALCAM-Expressionen in Brustkrebs behandeln die Relevanz für die Prognose und Voraussage basierend auf der ALCAM-Expression im Primärtumor. King et al. zeigten, dass Patienten mit niedrigen ALCAM-Transkripten vermehrt Vorfälle wie Metastasierungen, Rezidiven oder den Tod erlitten (King et al., 2004). Ebenso zeigten Jezierska et al., dass geringe ALCAM-Scores mit einem aggressiven Tumorwachstum und schlechteren Ergebnis korrelieren, mit der Annahme, dass die malignen Zellen leichter aus dem Primärtumor ausbrechen und metastasieren, wenn ALCAM als zusammenhaltendes Adhäsionsmolekül dient (Jezierska et al., 2006). Um ein ähnliches Profil an Krebsart zu untersuchen, wurden nur niedrig differenzierte invasive duktale Tumoren in diese Studie eingebracht. Gemäß King et al. wird vermutet, dass die ALCAM-Expressionen in schlechter differenzierten Tumoren niedriger sein könnten. Da King et al. die ALCAM-Expression mittels PCR auf Genebene untersucht haben, konnten die Ergebnisse zwischen dieser und deren Studie nicht genau miteinander verglichen werden. In dieser Studie sind alle Primärtumore nicht gut differenziert. Die ALCAM-Expression war normal variabel mit einem mathematischen Durchschnitt von 4,32 (IRS) innerhalb dieser Kohorte. Dieses ist ein relativ geringer Wert. In dieser Kohorte erreichte nur ein einziger Tumor und dessen Metastase einen IRS-Score von 12 und 9, wie in Tabelle 7 dargestellt.

Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass schlecht differenzierte Tumore ihre Adhäsionsfunktionen verlieren. Allerdings müsste diese Vermutung noch in verschiedenen Patientenkohorten untersucht und bestätigt werden. Im Gegensatz zu dieser These fand Burkhardt et al. in deren Studie, dass hohe ALCAM-Expressionen im Primärtumor ein Anzeichen für eine schlechtere Prognose darstellt. Zusätzlich weist die hohe zytoplasmatische ALCAM-Expression auf eine abnormale Expression hin, da ALCAM eigentlich auf der Membran exprimiert wird (Burkhardt et al., 2006). Da wir Autopsiematerial untersucht haben, welches allgemein in gutem zytologischen Zustand war, jedoch geringe Anzeichen einer Zytolyse zeigte, haben wir nicht zwischen membranöser und zytoplasmatischer Anfärbung unterschieden.

Betreffend der Vorhersagekraft bei chemotherapeutisch behandelten Brustkrebspatienten haben Ihnen et al. gezeigt, dass hohe Expressionen im Primärtumor einen Marker für ein besseres Ansprechen einer Therapie darstellt (Ihnen et al., 2008). Bis auf Daten, die sich mit der Prognose und Vorhersagekraft beschäftigen, wurde zusätzlich nur eine Studie gefunden, die zeigt, dass Patienten, die Knochenmetastasen entwickeln, die geringsten ALCAM-Expressionen im Primärtumor aufweisen (Davies et al., 2008). Eine der Absichten dieser Studie war zu untersuchen, ob es eine Abhängigkeit zwischen der ALCAM-Expression und der Lokalisation der Metastase gibt. Mittels dieser Studie war es schwierig, diese Frage zu beantworten, da die Erkrankungen der Patientinnen fortgeschritten waren und die Tumore schon in mehrere Organe metastasiert waren, sodass keine Beziehung mehr zwischen ALCAM-Expression und Metastasenlokalisierung erkannt werden konnte. Es gilt Frage in einer zukünftigen Studie, bei nicht so fortgeschrittenem Stadium zu erörtern.

Tabelle 7: Verteilung von ALCAM-IRS-Scores in disseminierten Metastasen aus verschiedenen Organlokalisationen mit deren primärem Mammakarzinom in 29 Fällen

KM=Knochenmark, LN=Lymphknoten, NN=Nebenniere, TW= Thoraxwand, FG= Fettgewebe

Organ	Mamma	KM	Lunge	Leber	LN	NN	Haut	Kolon	Perikard	Pharynx	TW	FG
Anzahl an Fällen	N=25	N=20	N=19	N=16	N=20	N=7	N=1	N=2	N=1	N=1	N=1	N=2
1	6	3	9	6		4						
2			1	2	3							
3	6		6		4							
4		6		6	2							
5	4	1										
6	12	12		12	12							
7	1		4	1								
8	9	12			9	8						
9	4	2	2	4	1							
10	1	1	3	1	3							
11	6	0	0	0								
12	6	9		6								
13	2	1	0									
14	4	6	4									
15			9		8						9	
16	8		9	6		6						
17	4	3	2	3		3						4
18		3	3			3		2				
19	4	6	0		4							
20	4											
21	3				8	6						
22	1		1							1		
23	1		2			2		2	2			
24	1	2			2							
25	6	6	6	6								6
26	8	4			4							
27	1	4	6									
28	0		0		0							
29	6	9	9	9	9							

Des Weiteren stehen nur wenige Artikel zu ALCAM-Expressionen in Metastasen zur Verfügung und noch weniger über Brustkrebsmetastasen. Van Kempen et al. untersuchte Melanome und Melanommetastasen und konnten eine ALCAM-Expression in der Hälfte des metastatischen Gewebes nachweisen (van Kempen et al., 2000). Alle Melanommetastasen befanden sich dort entweder im Lymphknoten oder in der Haut. Hierbei wurden keine viszerale Metastasen untersucht. Der Primärtumor war nur für drei Lymphknotenmetastasen vorliegend. Die Metastase sowie der Primärtumor zeigten eine geringe bis gar keine ALCAM Anfärbung (van Kempen et al., 2000). In der Studie wurde auch eine geringe bis keine Anfärbung für ALCAM in den Metastasen bei geringer bis keiner Anfärbung des Primarius identifiziert (allerdings wurde dies nur in einem Fall beobachtet). Im Allgemeinen zeigten die Melanomzellen eine sehr geringe Anfärbung für ALCAM, welche sich in Proben von Brustkrebsgewebe dieser Studie unterscheidet, weil unsere viszerale und Lymphknotenmetastasen eine deutlich positive Anfärbung für ALCAM zeigten.

Van Kempen et al. stellten die Hypothese auf, dass eine herunterregulierte ALCAM-Expression in Melanometastasen das Ergebnis von tumorbiologischen Interaktionen ist, nachdem die malignen Zellgruppen Zugang zu den Metastasierungswegen gefunden haben (van Kempen et al., 2000). Die Daten dieser Studie deuten an, dass es zumindest in Brustkrebsgewebe keine Runterregulierung von ALCAM-Expressionen im Metastasengewebe gibt. In dieser Kohorte wurde gezeigt, dass maligne Zellgruppen grundsätzlich immer über die Metastasierung hinweg hohe ALCAM-Werte aufwiesen. Weitere Autoren fanden erhöhte ALCAM-Expressionen in Fernmetastasen von kolorektalen und Appendix-Tumoren, wobei diese in einer kleinen Studie mit Gefrierschnitten aus Leber und peritonealen Metastasen mittels Oligonucleotid Microarrays untersucht wurden (Varghese et al., 2007). Es gab keinen Vergleich bezüglich der ALCAM-Expressionsstärke zwischen den Genprofilen der Primärtumore und der Metastasen (Varghese et al., 2007). Eine weitere Studie zeigt, dass ALCAM eine Rolle im sogenannten „homing“ der Metastasierung spielt (beispielsweise in die Lunge) (King, 2004). Dieses wurde aufgrund einer Detektion von ALCAM in Zellkulturen von pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen sowie in Brustkrebsgewebe bestätigt und ist bekannterweise in homophile Adhäsion involviert, welches dazu führen könnte, dass sich eine einzelne Zelle im Blutkreislauf in die Lunge zirkuliert und zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung führt (King, 2004). Hierauf basierend könnte man annehmen, dass die örtliche ALCAM-Expression in einem einzelnen Organ ein bevorzugtes Muster für Metastasen Lokalisationen bildet. Dieses konnte hier in dieser Studie nicht eindeutig gezeigt werden und bedarf ebenso einer weiteren Form von Untersuchung.

ALCAM wird in einer Vielzahl von unterschiedlichem embryonalen und adulten humanen sowie tierischen Gewebe exprimiert. Es wurde im Gehirn, im Knochenmark, im lymphatischen Gewebe, in der Lunge und in der Leber lokalisiert (Swart, 2002). Alle diese Organe sind bekanntlich prädestinierte Orte für die Metastasierung des Mammakarzinoms. Leider wurden in dieser Studie zwar ALCAM-Expressionen beschrieben, jedoch ist kein Modell vorhanden, welches Rückschlüsse auf das Gewebe, welche hohe ALCAM-Expressionen aufweist, eine erhöhte homophile ALCAM-Bindung mit einer bevorzugten Zelladhäsion schließen lässt.

5.3 Diskussion in der Gruppe Tissue-Micro-Arrays

Untersuchungen über die Rolle von ALCAM in Brustkrebs ergaben bisher widersprüchliche Ergebnisse, die eine Assoziation mit einer guten (King et al., 2004) (Jeziarska et al., 2006) sowie auch schlechten (Burkhardt et al., 2006) (Ihnen et al., 2008) Prognose anzeigten. Aus diesem Grund untersuchten wir eine größere Kohorte von ins Knochenmark disseminierten Mammakarzinomen und fanden, dass eine Mögliche Ursache der diskrepanten Ergebnisse sich zum Teil mit den unterschiedlichen statistischen Herangehensweisen begründen lassen. In der immunhistochemischen Untersuchung der Tissue-Micro-Arrays wurde zwischen negativ, schwach-moderater, und starker ALCAM-Expression differenziert. Hierbei wurde das schlechteste Ergebnis in Fällen mit starker ALCAM-Anfärbung gefunden. Wenn nur zwei Gruppen mit der medianen ALCAM-Expression als „cut-off-Wert“ analysiert wurden, wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden, welches bedeuten kann, dass die Ergebnisse von ALCAM-Studien sehr stark durch den gewählten „cut-off-Wert“ für die statistische Analyse beeinflusst werden könnten.

Mit der oben aufgeführten Vorgehensweise konnten die vorher beschriebene Korrelation von ALCAM-Expression mit ER-/PR-positiven Phänotyp angezeigt werden, welches eine Assoziation mit einem weiter differenzierten Phänotyp andeutet. Andererseits wurde eine

starke ALCAM-Expression mit einer Lymphknotenbeteiligung assoziiert und eine kürzere rezidivfreie Überlebensrate sowie eine allgemeine Überlebensrate prognostiziert, besonders in duktalem Karzinomen. Das Vorkommen von disseminierten Tumorzellen ist ein Ersatzparameter für die hämatogene Tumorzellenwanderung (Pantel et al., 2009). In dieser Studie wurde eine Assoziation bei einem Vorkommen von disseminierten Tumorzellen mit ALCAM-Expression, welche nicht signifikant war, festgestellt. Dies beruht auf dem geringen Auftreten von disseminierten Tumorzellen im primärem Mammakarzinom bei der Anwendung von restriktiven Evaluationskriterien. Eine potentielle Einschränkung in dieser Studie ist die Tatsache, dass die Patienten unterschiedlich therapiert wurden und es keine unbehandelte Kohorte zum Vergleich gab. Daher konnte in dieser Studie nicht zwischen prognostischen Effekten und prädiktiven Effekten der ALCAM-Expression unterschieden werden.

Die Ergebnisse zeigen an, dass die biologische Rolle von ALCAM in Brustkrebszellen komplex ist und zum Teil von dem Tumorzelltyp abhängig ist. Die Effekte einer starken ALCAM-Expression auf die biologischen Vorgänge von Brustkrebszellen könnten eine verringerte Motilität, ein gesteigertes invasives Potential und eine verstärkte Apoptose bedeuten. Dies könnte zum Teil die widersprüchlichen Ergebnisse vorangegangener Studien begründen, in denen ALCAM mit positiver und negativer Prognose assoziiert wurde (King et al., 2004, Burkhardt et al., 2006, Ihnen et al., 2008, Jezierska et al., 2006). Im Sinne einer möglichen Bedeutung von ALCAM im Rahmen einer Therapie geben diese Untersuchungen einen weiteren Einblick in die biologischen Vorgänge von ALCAM im Mammakarzinom.

6 Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, Brustkrebsmetastasen und zum Teil die korrespondierenden Primärtumore auf ALCAM-Expressionen zu untersuchen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression von ALCAM die Disseminierung von Tumorzellen ins Knochenmark beeinflusst. Die Absicht war zu evaluieren, ob die ALCAM-Expressionen sich in verschiedenen Metastasenlokalisationen unterscheiden, um so mögliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen des Organotropismus von Brustkrebsmetastasen zu ermitteln. Das Untersuchungsgut wurde in drei Gruppen unterteilt.

In der Gruppe der Metastasen zeigte sich eine übermäßige Expression in Hautmetastasen, die deutlich höher war als in allen anderen untersuchten Metastasen, welches im Einklang mit vorangegangenen Forschungsergebnissen über das maligne Melanom steht und einen möglichen zugrundeliegenden „homing“-Mechanismus für die Entstehung von Hautmetastasen oder Hautneoplasien anzeigt. Zudem schienen die ALCAM-Anfärbungen der Primärtumore, die den Ursprung für Hautmetastasen darstellen, ebenfalls eine höhere Intensität zu haben als Primärtumore von Metastasen anderer Lokalisationen. Diese Beobachtung könnte andeuten, dass hohe ALCAM-Spiegel im Primärtumor mit einer Metastasierung in die Haut einhergehen. In allen untersuchten Metastasen sahen wir keine signifikante Korrelation der ALCAM-Anfärbung mit dem Grading, den Hormonrezeptoren, dem HER2-neu oder dem Alter der Patientinnen.

In den Primärtumoren der Sektionsschnitte zeigten sich in allen Fällen (bis auf einen Fall) ALCAM-positive-Zellen mit einer heterogenen Verteilung der Anfärbung innerhalb des Tumors. In zwei Fällen zeigte sich eine stärkere Anfärbung an der Invasionsfront als im Tumorzentrum. Eine Abhängigkeit der ALCAM-Expression im Primärtumor mit der bevorzugten Metastasenlokalisation konnte in unserer Studie nicht signifikant nachgewiesen werden, welches möglicherweise daran liegt, dass die vorliegende Erkrankung bei einer ubiquitärer Metastasierung bereits weit fortgeschritten ist.

Innerhalb der untersuchten Knochenstanzen in den Tissue-Micro-Arrays waren alle Färbeintensitäten von negativ bis stark positiv vertreten. In der statistischen Auswertung zeigten sich hoch signifikant positive Assoziationen mit Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-Status und keine signifikanten Assoziationen mit Alter, dem Tumorstadium und dem histologischen Typ. In unserer Kohorte korrelierte die ALCAM-Expression signifikant mit der Lymphknotenbeteiligung und es zeigte sich tendenziell eine höhere Rate an Tumorzellen im Knochenmark an diesen Patienten. Hohe ALCAM-Anfärbungen sind im Allgemeinen mit einer kürzeren allgemeinen Überlebensrate assoziiert worden im Vergleich zu Patienten mit schwach bis moderaten ALCAM-Scores. In der weiteren Stratifizierung gemäß endokriner Therapie oder Chemotherapie konnten keine prognostisch signifikanten Unterschiede in der allgemeinen Überlebensrate sowie der rezidivfreien Überlebensrate in Bezug auf den ALCAM-Spiegel in den entsprechenden Subgruppen festgestellt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über Adhäsionsmoleküle und deren Funktion bezüglich der Entstehung von Brustkrebsmetastasen noch wenig bekannt ist. Dennoch gibt es Hinweise, dass Adhäsionsmoleküle wie ALCAM in diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen und einen möglichen Ansatz für Antikörpertherapien in der Behandlung von Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung bieten könnten.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Enzym-Komplex
Adj.	Adjuvant
ALCAM	Activated Leucocyte Cell Adhesion Molecule
Aqua dest.	Aqua destillata
Art.	Arteria
BET	Brust Erhaltende Therapie
BSA	Bovine Serum Albumin
Bzw.	Beziehungsweise
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ER	Estrogen Receptor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
ICC	Intra Class Correlation Rate
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immuno Reactive Score
KM	Knochenmark
Korr.	Korrelation
l	Liter
Lig.	Ligamentum
LN	Lymphknoten
M	Molar
MaCa	Mammakarzinom
µg	Mikrogramm
min.	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
Ndd.	Noddi
Neg.	Negativ
PBS	Phosphate Buffered Saline
PR	Progesteronrezeptor
Syn.	Synonym
TMA	Tissue Micro Array
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifikationsmerkmale und Anzahlen der in der Studie untersuchten Metastasen sowie Alter der Patienten.....	10
Tabelle 2:	Vergleich von ALCAM IRS Scores in Metastasen unterschiedlicher Lokalisationen im paarweisen Vergleich.....	21
Tabelle 3:	Vergleich von ALCAM-Anfärbung in Paaren von Hautmetastasen mit korrespondierenden Primärtumoren.....	21
Tabelle 4:	Kohorten-Charakteristika von Brustkrebspatienten mit Knochenmetastasen untersucht auf ALCAM-Expression.....	26
Tabelle 5:	ALCAM-Protein-Expression in Brustkrebspatienten: Korrelation zwischen klinischen und histologische Tumorcharakteristika.....	27
Tabelle 6:	„Cox-Regressionsanalyse“ mit konventionellen Prognosefaktoren, disseminierte Tumorzellen Knochenmark und ALCAM-Überexpression im duktalem Mammakarzinom.....	28
Tabelle 7:	Verteilung von ALCAM-IRS-Scores in disseminierten Metastasen aus verschiedenen Organlokalisationen mit deren primärem Mammakarzinom in 29 Fällen.....	31

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anatomie der weiblichen Brust.....	3
Abbildung 2:	Darstellung der Lymphabflußwege der Mamma.....	3
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Tumorzell- Metastasierungs Kaskade.....	6
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Immunglogulins ALCAM.....	9
Abbildung 5:	ALCAM Clustering und Netzwerk Formation.....	9
Abbildung 6:	ALCAM Expressionen in Primärem Mammakarzinom und deren Fernmetastasen.....	11
Abbildung 7:	ALCAM Expressionen in Mammakarzinom Fernmetastasen.....	19
Abbildung 8:	ALCAM-Immunreaktivität in Mammakarzinometastasen.....	20
Abbildung 9:	Regressionsanalyse der ALCAM-Expressionsstärken in den Metastasen (N=84) und ALCAM Expressionsstärken in deren primären Mammakarzinomen (N=24).....	23
Abbildung 10:	Boxplot-Analyse von ALCAM-IRS in verschiedenen Metastasen und deren Primärtumoren.....	23
Abbildung 11:	Immunhistochemische Färbung von ALCAM im primären invasiven Brustkrebs und deren viszeraler Metastase.....	24

10 Literaturverzeichnis

- BRAUN, S., VOGL, F. D., NAUME, B., JANNI, W., OSBORNE, M. P., COOMBES, R. C., SCHLIMOK, G., DIEL, I. J., GERBER, B., GEBAUER, G., PIERGA, J. Y., MARTH, C., ORUZIO, D., WIEDSWANG, G., SOLOMAYER, E. F., KUNDT, G., STROBL, B., FEHM, T., WONG, G. Y., BLISS, J., VINCENT-SALOMON, A. & PANTEL, K. 2005. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*, 353, 793-802.
- BURKHARDT, M., MAYORDOMO, E., WINZER, K. J., FRITZSCHE, F., GANSUKH, T., PAHL, S., WEICHERT, W., DENKERT, C., GUSKI, H., DIETEL, M. & KRISTIANSEN, G. 2006. Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. *J Clin Pathol*, 59, 403-9.
- CHOI, S., KOBAYASHI, M., WANG, J., HABELHAH, H., OKADA, F., HAMADA, J., MORIUCHI, T., TOTSUKA, Y. & HOSOKAWA, M. 2000. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and annexin II are involved in the metastatic progression of tumor cells after chemotherapy with Adriamycin. *Clin Exp Metastasis*, 18, 45-50.
- DAVIES, S. R., DENT, C., WATKINS, G., KING, J. A., MOKBEL, K. & JIANG, W. G. 2008. Expression of the cell to cell adhesion molecule, ALCAM, in breast cancer patients and the potential link with skeletal metastasis. *Oncol Rep*, 19, 555-61.
- DEGEN, W. G., VAN KEMPEN, L. C., GIJZEN, E. G., VAN GRONINGEN, J. J., VAN KOOYK, Y., BLOEMERS, H. P. & SWART, G. W. 1998. MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am J Pathol*, 152, 805-13.
- FIDLER, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-8.
- FITZGIBBONS, P. L., PAGE, D. L., WEAVER, D., THOR, A. D., ALLRED, D. C., CLARK, G. M., RUBY, S. G., O'MALLEY, F., SIMPSON, J. F., CONNOLLY, J. L., HAYES, D. F., EDGE, S. B., LICHTER, A. & SCHNITT, S. J. 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 966-78.
- GOLDHIRSCH, A., GLICK, J. H., GELBER, R. D., COATES, A. S., THURLIMANN, B. & SENN, H. J. 2005. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*, 16, 1569-83.
- GOUT, S., TREMBLAY, P. L. & HUOT, J. 2008. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 25, 335-44.
- HEIN, S., MULLER, V., KOHLER, N., WIKMAN, H., KRENKEL, S., STREICHERT, T., SCHWEIZER, M., RIETHDORF, S., ASSMANN, V., IHNEN, M., BECK, K., ISSA, R., JANICKE, F., PANTEL, K. & MILDE-LANGOSCH, K. 2011. Biologic role of activated leukocyte cell adhesion molecule overexpression in breast cancer cell lines and clinical tumor tissue. *Breast Cancer Res Treat*, 129, 347-60.

- HENNINGSSEN, M. 2012. *Prognostische und prädiktive Relevanz von Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) im Mammakarzinom*. Forschungsbericht zur kumulativen Habilitation für das Fach Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- IHNEN, M., KILIC, E., KOHLER, N., LONING, T., WITZEL, I., HAGEL, C., HOLLER, S., KERSTEN, J. F., MULLER, V., JANICKE, F. & MILDE-LANGOSCH, K. 2011. Protein expression analysis of ALCAM and CEACAM6 in breast cancer metastases reveals significantly increased ALCAM expression in metastases of the skin. *J Clin Pathol*, 64, 146-52.
- IHNEN, M., KOHLER, N., KERSTEN, J. F., MILDE-LANGOSCH, K., BECK, K., HOLLER, S., MULLER, V., WITZEL, I., JANICKE, F. & KILIC, E. 2010. Expression levels of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM/CD166) in primary breast carcinoma and distant breast cancer metastases. *Dis Markers*, 28, 71-8.
- IHNEN, M., MULLER, V., WIRTZ, R. M., SCHRODER, C., KRENKEL, S., WITZEL, I., LISBOA, B. W., JANICKE, F. & MILDE-LANGOSCH, K. 2008. Predictive impact of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 112, 419-27.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
- JEZIEWSKA, A., OLSZEWSKI, W. P., PIETRUSZKIEWICZ, J., OLSZEWSKI, W., MATYSIAK, W. & MOTYL, T. 2006. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion. *Med Sci Monit*, 12, BR245-56.
- JIANG, W. G., PUNTIS, M. C. & HALLETT, M. B. 1994. Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *Br J Surg*, 81, 1576-90.
- KANG, Y., SIEGEL, P. M., SHU, W., DROBNJAK, M., KAKONEN, S. M., CORDON-CARDO, C., GUISE, T. A. & MASSAGUE, J. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*, 3, 537-49.
- KING, J. 2004. Potential Role for Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and Neural Cadherin in Metastasis to the Lung Microcirculation. *Chest*, 125, 150S-151S.
- KING, J. A., OFORI-ACQUAH, S. F., STEVENS, T., AL-MEHDI, A. B., FODSTAD, O. & JIANG, W. G. 2004. Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res*, 6, R478-87.
- KRISTIANSEN, G., PILARSKY, C., WISSMANN, C., STEPHAN, C., WEISSBACH, L., LOY, V., LOENING, S., DIETEL, M. & ROSENTHAL, A. 2003. ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions. *Prostate*, 54, 34-43.

- LANDEMAINE, T., JACKSON, A., BELLAHCENE, A., RUCCI, N., SIN, S., ABAD, B. M., SIERRA, A., BOUDINET, A., GUINEBRETIERE, J. M., RICEVUTO, E., NOGUES, C., BRIFFOD, M., BIECHE, I., CHEREL, P., GARCIA, T., CASTRONOVO, V., TETI, A., LIDEREAU, R. & DRIOUCH, K. 2008. A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis. *Cancer Res*, 68, 6092-9.
- LUNTER, P. C., VAN KILSDONK, J. W., VAN BEEK, H., CORNELISSEN, I. M., BERGERS, M., WILLEMS, P. H., VAN MUIJEN, G. N. & SWART, G. W. 2005. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity. *Cancer Res*, 65, 8801-8.
- MINN, A. J., GUPTA, G. P., SIEGEL, P. M., BOS, P. D., SHU, W., GIRI, D. D., VIALE, A., OLSHEN, A. B., GERALD, W. L. & MASSAGUE, J. 2005a. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436, 518-24.
- MINN, A. J., KANG, Y., SERGANOVA, I., GUPTA, G. P., GIRI, D. D., DOUBROVIN, M., PONOMAREV, V., GERALD, W. L., BLASBERG, R. & MASSAGUE, J. 2005b. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest*, 115, 44-55.
- PANTEL, K., ALIX-PANABIÈRES, C. & RIETHDORF, S. 2009. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*, 6, 339-51.
- PASCHOS, K. A., CANOVAS, D. & BIRD, N. C. 2009. The role of cell adhesion molecules in the progression of colorectal cancer and the development of liver metastasis. *Cell Signal*, 21, 665-74.
- POSTE, G. & FIDLER, I. J. 1980. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283, 139-46.
- REMMELE, W. & STEGNER, H. E. 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8, 138-40.
- RKI 2007/2008. Krebs in Deutschland/ Brustdrüse In: INSTITUT, R. K. (ed.).
- SCHIEBLER, T. H. & KORF, H.-W. 2007. *Anatomie-Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, Steinkopff.
- SCHMIDMAIER, R. & BAUMANN, P. 2008. ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in oncology. *Curr Med Chem*, 15, 978-90.
- SMID, M., WANG, Y., ZHANG, Y., SIEUWERTS, A. M., YU, J., KLIJN, J. G., FOEKENS, J. A. & MARTENS, J. W. 2008. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*, 68, 3108-14.
- SWART, G. W. 2002. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol*, 81, 313-21.

- VAN KEMPEN, L. C., MEIER, F., EGEBLAD, M., KERSTEN-NIESSEN, M. J., GARBE, C., WEIDLE, U. H., VAN MUIJEN, G. N., HERLYN, M., BLOEMERS, H. P. & SWART, G. W. 2004. Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. *J Invest Dermatol*, 122, 1293-301.
- VAN KEMPEN, L. C., NELISSEN, J. M., DEGEN, W. G., TORENSMA, R., WEIDLE, U. H., BLOEMERS, H. P., FIGDOR, C. G. & SWART, G. W. 2001. Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J Biol Chem*, 276, 25783-90.
- VAN KEMPEN, L. C., VAN DEN OORD, J. J., VAN MUIJEN, G. N., WEIDLE, U. H., BLOEMERS, H. P. & SWART, G. W. 2000. Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol*, 156, 769-74.
- VARGHESE, S., BURNES, M., XU, H., BERESNEV, T., PINGPANK, J. & ALEXANDER, H. R. 2007. Site-specific gene expression profiles and novel molecular prognostic factors in patients with lower gastrointestinal adenocarcinoma diffusely metastatic to liver or peritoneum. *Ann Surg Oncol*, 14, 3460-71.
- VERMA, A., SHUKLA, N. K., DEO, S. V., GUPTA, S. D. & RALHAN, R. 2005. MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology*, 68, 462-70.
- WEICHERT, W., KNOSEL, T., BELLACH, J., DIETEL, M. & KRISTIENSEN, G. 2004. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol*, 57, 1160-4.
- WIIGER, M. T., GEHRKEN, H. B., FODSTAD, O., MAELANDSMO, G. M. & ANDERSSON, Y. 2010. A novel human recombinant single-chain antibody targeting CD166/ALCAM inhibits cancer cell invasion in vitro and in vivo tumour growth. *Cancer Immunol Immunother*, 59, 1665-74.

11 Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Fritz Jänicke, dem Institutsdirektor der Frauenklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen und für sein Interesse meine Arbeit vorbehaltlos zu unterstützen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch für die Betreuung meiner Arbeit. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Dankbar anerkennen will ich auch ihre immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft mir bei allen Fragen ihr Wissen weiterzugeben und darüber hinaus für die Hilfe bei der mikroskopischen Auswertung der Präparate.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Maike Henningsen danke ich für die zielführenden Diskussionen und ebenso für die Unterstützung beim Auswertung der mikroskopischen Präparate. Ihr fundiertes Fachwissen und viele Anregungen waren für meine wissenschaftliche Arbeit unabdinglich. Besonders danke ich für die Leidenschaft und Überzeugung die sie zum Thema hat und mit ihrem Elan die Arbeit immer vorantrieb.

Frau Kati Beck danke ich für die praktische Einführung in die Immunhistochemie. Ich verdanke ihr darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr professionell und warmherzig begleitet und wäre ohne sie unvorstellbar.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Löning, Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagel, Herrn Dr. med. Ergin Kilic und Frau Dr. habil., Dipl.-Biologin Harriet Wikmann danke ich für die Bereitstellung von Material, ohne dessen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem danke ich für die Hilfe und Beratung bei der Auswertung der Präparate, sowie für Ihre Ideen, Diskussion und konstruktive Gespräche.

Herrn Jan Felix Kersten danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung und Datenverarbeitung und ebenso beim erstellen der Abbildungen und Tabellen.

Im Rahmen meiner Dissertationsarbeit hatte ich nicht nur die Gelegenheit, in einem sehr kollegialen Team sehr gut und fachlich in die Forschungsarbeit eingearbeitet zu werden, sondern auch in freundschaftlicher Atmosphäre zu arbeiten und zähle diese Zeit als eine der besten meines ganzen Studiums.

12 Lebenslauf

Name: Nadine Elisabeth Köhler
Geburtsdatum: 1. Februar 1981
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

August 1987- Juli 1993: Internationale Schule Moshi, Tansania
August 1993 - Mai 2000: Deutsche Schule Nairobi, Kenia
Hochschulzugangsberechtigung: Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr

August 2000-April 2001 Herzchirurgie: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Studium

ab April 2001 Medizinstudium an der Universität Hamburg
2006: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2011: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufserfahrung

-Seit Juni 2011 Assistenzärztin in der Viszeralmedizin, Asklepios Klinik Wandsbek
-Studentischer Bereitschaftsdienst in der Chirurgie, Asklepios Klinik Wandsbek
-Studentische Hilfskraft in der Herzchirurgie an der Universitätsklinik Eppendorf

Dissertation

2007: Experimentelle Durchführung der Arbeit in der Abteilung für Gynäkologische Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Fritz Jänicke.
2014: Abschluss des theoretischen Teils der Doktorarbeit und Anerkennung des Manuskripts für eine Publikation.

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Nadine Elisabeth Köhler

Hamburg, Juli 2014