

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter

Expressionsanalyse von ALCAM/CD166 im Mammakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von

Maria Tanaz Bari Noubar

Hamburg 2015

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 4.11.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. V. Müller

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

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Das Mammakarzinom	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Ätiologie.....	6
1.1.3 Brustkrebsformen	7
1.1.4 Klassifizierung und Prognosefaktor invasiver Mammakarzinome.....	10
1.1.5 Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms.....	13
1.2 Tumorprogression und Metastasierung im Mammakarzinom	16
1.3 Zelladhäsionsmoleküle.....	17
1.4 Zellkontakte.....	18
1.5 Rolle der Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorprogression	19
1.6 ALCAM.....	20
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Gewebemikroarray-Technologie	23
2.2 Herstellung eines Mikroarrays im Allgemeinen	23
2.3 Mamma-TMA	26
2.4 Immunhistochemie	27
2.5 ALCAM- Antikörper	28
2.6 Durchführung der Immunhistochemie	28
2.7 Auswertung	29
2.8 Statistik	29
3. Ergebnisse	31
3.1 ALCAM- Expression.....	31
3.2 Assoziation zu anderen prognostischen Faktoren im Mammakarzinom	34
3.3 Assoziation zur Zellproliferation	35
3.4 Prognoserelevanz von ALCAM	36
4. Diskussion	40

Zusammenfassung	43
Abkürzungsverzeichnis	45
Literaturverzeichnis	47
Danksagung	59
Lebenslauf.....	60
Publikation	61
Eidesstattliche Versicherung	62

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 70.000 ist das Mammakarzinom in Deutschland der am häufigsten auftretende maligne Tumor der Frau. Jede achte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an dieser Krebsart. Bei der Diagnosestellung ist in Deutschland jede vierte betroffene Frau jünger als 55 Jahre und jede zehnte jünger als 45 Jahre alt. Die Einführung des Mammographie-Screenings hatte einen sprunghaften Anstieg der Erkrankungsrate im Jahre 2005 zur Folge. Die Ursache lag an der vorzeitigen Erkennung von kleineren Tumoren, die ohne Screening unentdeckt geblieben wären. Mit der früheren Krankheitsdetektion haben sich die Überlebensaussichten verbessert. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland betrug für die Jahre 2009-2010 83-86% (RKI und GEKID 2013).

Weltweit wird nach Angaben der IARC (International Association on Research of Cancer) für das Jahr 2013 eine Inzidenz von 1,67 Millionen und eine Mortalitätsrate von 521.817 geschätzt (Ferlay et al. 2013). Das Mammakarzinom ist somit auch weltweit die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau. Diese alarmierenden Zahlen führen dazu, dass ein erhöhter Aufwand betrieben wird, die Krankheit in ihren molekularen Veränderungen zu erforschen, um eine frühzeitige Diagnostik und eine gezielte Therapie zu entwickeln.

1.1.2 Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind vielfältig. Eine positive Familienanamnese, ein frühes Menarchenalter, spätes Menopausenalter, Mastopathie III. Grades, hohes Alter (besonders über 50 Jahre) und Nullparität sind nur einige Faktoren (Kelsey et al. 1993; Singletary

2003; Love und Koroltchouk 1993). Auch übermäßiger Alkoholkonsum (> 20 g/Tag Ethanol) wird als Risikofaktor diskutiert (Smith-Warner et al. 1998; Weyerstahl und Stauber 2013). In einer Studie wurde sogar ein erhöhter Alkoholkonsum in Korrelation mit einem erhöhten BMI-Index belegt (Royo-Bordonada 1997). Für die geographischen Unterschiede in der globalen Inzidenz werden unterschiedliche Lebensgewohnheiten wie z.B. Ernährung und auch genetische Faktoren vermutet. Frauen in Japan erkranken demnach viel seltener als europäische Frauen am Mammakarzinom, das Verhältnis zwischen Europa und Japan liegt bei 6:1 (Weyerstahl und Stauber 2013).

Die postmenopausale Hormonersatztherapie, insbesondere eine Kombinationstherapie mit Progesteron und Östrogen, scheint das Krebsrisiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms zu begünstigen. Hier wurde speziell eine Assoziation zwischen ER (Östrogenrezeptor)-positiven und wenig differenzierten Tumoren gefunden (Narod 2011; Missmer et al. 2004). Neben ethnischen und hormonellen Faktoren spielen auch genetische Faktoren eine entscheidende Rolle. Die Vererbung einer Mutation im BRCA 1 (Breast Cancer Gen) oder BRCA 2 stellt dabei die wichtigste Ursache dar. Sie verursachen etwa die Hälfte der sogenannten hereditären Mammakarzinome. Insgesamt sind etwa 5 % aller Brustkrebspatientinnen von dieser Form betroffen. Die Betroffenen erkranken sehr früh. Es besteht ein lebenslanges Risiko von etwa 50-80% für ein Mammakarzinom und ein Risiko von 15-25%, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Miki et al. 1994; Goldberg und Borgen 2006).

Es gibt noch viele weitere Gene, wie z.B. das TP53-Tumorprogressorgen (Birch et al. 1994), das ATM-Gen (Kobayashi et al. 2013), das PTEN (Ball et al. 2001) oder das STK11-Gen (van Lier et al. 2010), deren Mutationen mit einer familiären Häufung von Brustkrebs einhergehen.

1.1.3 Brustkrebsformen

Man unterscheidet zwischen einem nicht-invasiven und einem invasiven Mammakarzinom. Das nicht-invasive Karzinom, auch Carcinoma in Situ (CIS) genannt, ist durch eine intakte Basalmembran charakterisiert. Das nicht-invasive

Mammakarzinom wird nach seinem Entstehungsort in zwei Typen unterteilt: 1. das duktale (DCIS) und 2. das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS). Ungefähr ein Drittel aller nicht-invasiven Mammakarzinome gehen in ein invasives Karzinom über. Das DCIS stellt somit eine Vorläuferläsion des invasiven Mammakarzinoms dar (Ottesen 2003), wohingegen das LCIS eher ein Indikator für ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko darstellt (Afonso und Bouwman 2008). Das invasive Mammakarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor, der durch sein infiltrativ wachsendes, die Basalmembran überschreitendes Wachstum charakterisiert ist. Die häufigsten Formen sind das duktale und das lobuläre Karzinom. Das duktal-invasive Mammakarzinom (Abb. 1) ist mit ca. 50-80% die häufigste Form aller invasiven Mammakarzinome (Weigelt et al. 2005). Histologisch können diese, insbesondere aufgrund mangelnder Charakteristika, keinem speziellen Typ zugeordnet werden, daher werden sie auch „not otherwise specified“ (NOS) genannt (Sainsbury et al. 2000).

Das invasiv-lobuläre Karzinom (Abb. 2) macht etwa 5-15% der invasiven Mammakarzinome aus (Weigelt et al. 2005). Des Weiteren bestehen seltenere Formen, wie z.B. das tubuläre, papilläre, muzinöse und medulläre Karzinom (Weyerstahl und Stauber 2013).

Das M. Paget und das inflammatorische Karzinom sind Sonderformen des Mammakarzinoms. Mit 1-4 % aller Brustkrebsformen ist das M. Paget eine sehr seltene Krebsform der Brustwarze (Mamille). Diese Tumorform zeichnet sich durch eine verdickte, ekzematöse und manchmal pigmentierte Veränderung der Brustwarzen aus (Karakas 2011). Das inflammatorische Karzinom ist eine seltene lokal fortschreitende Tumorform (2,5% aller Mammakarzinome), die mit Veränderungen der Brusthaut i.S. einer Rötung, Schwellung und Überwärmung einhergeht. Aufgrund ihres raschen Wachstums und ihrer frühen Metastasierung ist diese Tumorform sehr aggressiv und hat eine schlechte Prognose (Robertson et al. 2010). Eine Übersicht über die verschiedenen Tumortypen in der gängigen Einteilung gibt Tabelle 1.

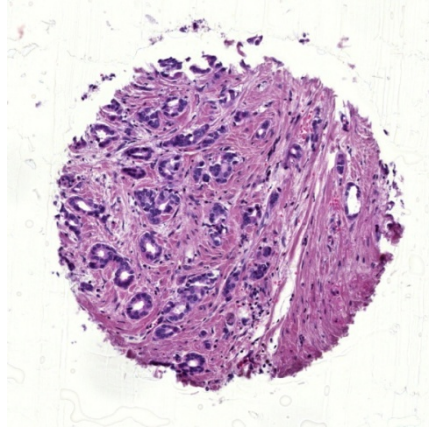


Abb. 1: duktales Mammakarzinom

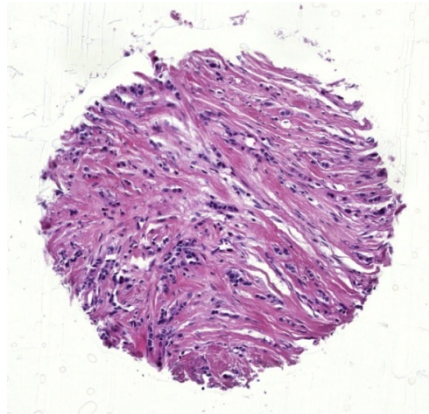


Abb. 2: lobuläres Mammakarzinom

**Tab. 1: Übersicht über die verschiedenen Tumortypen
(in Anlehnung an Weyerstahl und Stauber 2013)**

1. nichtinvasive Formen

- intraduktales Karzinom (DCIS)
- Carcinoma lobulare in situ (CLIS)

2. invasive Formen

- invasives duktales Karzinom (NOS)
- invasives lobuläres Karzinom
- muzinöses Karzinom
- medulläres Karzinom
- papilläres Karzinom
- tubuläres Karzinom
- adenoid-zystisches Karzinom
- sekretorisches Karzinom
- apokrines Karzinom
- Karzinom mit Metaplasie
- squamöser Typ
- Spindelzelltyp
- kartilaginärer und ossärer Typ
- gemischter Typ
- andere

3. Sonderformen

- Morbus Paget (nicht invasiv und invasiv)
- inflammatorisches Mammakarzinom

1.1.4 Klassifizierung und Prognosefaktor invasiver Mammakarzinome

Das Mammakarzinom wird nach der Primärtumorgröße (T), dem Status der regionalen Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose eingeteilt. Diese sogenannte TNM-Klassifizierung

richtet sich nach den Vorgaben der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (De Abreu et al. 2014). Eine Übersicht über die TNM-Klassifizierung des Mammakarzinoms bietet Tabelle 2.

Ein weiterer wichtiger Prognosefaktor ist die Bestimmung des histologischen Differenzierungsgrades (Grading) nach Elston und Ellis (Elston und Ellis 1991; Robbins et al. 1995). Das Grading dient der Beurteilung der Gewebedifferenzierung, berücksichtigt die Tubulusbildung, die Mitoserate sowie die Kernmorphologie und wird in drei Stufen angegeben. G1 bezeichnet ein gut differenziertes, G2 ein mäßig differenziertes und G3 ein schlecht differenziertes Karzinom. Schlecht differenzierte Karzinome (G3) sind mit einer höheren Rezidiv- und Metastasenrate verbunden (Sainsbury et al. 2000).

Auch die Tumorgroße ist ein wichtiger Prognosefaktor. Tumoren mit einem Durchmesser von unter 2 cm haben ein viel niedrigeres Risiko zu metastasieren als Tumoren mit einem Durchmesser von über 5 cm. Der Befall von Lymph- und Blutgefäßen zieht ebenfalls eine schlechte Prognose nach sich. Beim Befall von mehr als vier Lymphknoten beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 20% (Carter et al. 1989).

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von Tumoren ist der immunhistochemische Nachweis von Östrogen (ER) - und Progesteronrezeptoren (PR). Beide Hormone sind bedeutend für das Zellwachstum im gesunden Gewebe und fördern somit auch das Wachstum von Tumoren. Progesteron- und Östrogen-positive Tumoren haben eine bessere Prognose als Hormonrezeptor-negative Tumoren, da eine gezielte Therapie mit Antihormonen erfolgen kann (Dunnwald et al. 2007).

Der Rezeptor HER2-Status ist ein weiterer wichtiger Prognosefaktor. Er gehört zur Gruppe der Epidermal-Growth-Faktoren (EGF) und beeinflusst die Proliferation und Differenzierung der Karzinome. Er wird ebenso wie die Progesteron- und Östrogenrezeptoren immunhistochemisch ermittelt. Dessen Nachweis ist mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf vergesellschaftet. Eine Therapie mit einem monoklonalen Antikörper (Herceptin) ist möglich (De Abreu et al. 2014).

**Tab. 2: Übersicht über die pTNM-Klassifizierung nach der UICC
(in Anlehnung an Edge et al. 2009)**

pT	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhaltspunkt für einen Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	≤ 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b	≤ 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	≤ 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor ≥ 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor ≥ 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	Mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
pN	Regionäre Lymphknoten
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z.B. vor klinischer Klassifikation bioptisch entfernt)
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten

pN2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert, oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen oder Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
pN2a	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
pN2b	Metastasen in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang an anderen Strukturen fixiert Arteria mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pN3a	Metastasen in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pM	Fernmetastasen
pMX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

1.1.5 Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms

Neben der klinischen Untersuchung (Inspektion, Palpation der Brust und der Lymphabflussgebiete) stellt die Mammographie die wichtigste und zuverlässigste nichtinvasive Methode in der Diagnostik dar. Ab dem 50. bis zum 69. Lebensjahr hat jede Frau Anspruch auf eine Mammographie-Screening-Untersuchung. Bei einem unauffälligen Befund erfolgt eine 2-jährige Wiederholung. Ein auffälliger Mammographie- oder Tastbefund bedarf immer einer weiteren Abklärung. Insbesondere bei klinisch nicht tastbaren, jedoch

mammographisch auffälligen Befunden ist eine ergänzende Ultraschalluntersuchung notwendig (Albert et al. 2009; Nothacker et al. 2009).

Nach histologischer Sicherstellung der Diagnose, z.B. mittels einer Stanzbiopsie, stellt die chirurgische Entfernung des Karzinoms die wichtigste Säule der Therapie dar. Insgesamt gibt es vier Säulen der Therapie: die Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie und Hormontherapie. Die beiden letzteren werden zur systemischen Therapie zusammengefasst. Jede Therapie wird individuell und dem Staging entsprechend entschieden.

Chirurgie

Ziel dieser Therapie ist die vollständige Entfernung des Tumors und der regionalen Lymphknoten, denn die resektionsfreie Entfernung des Karzinoms ist entscheidend für die Lokalrezidivrate (Houssami et al. 2010). Heutzutage wird die brusterhaltende Therapie (BET), wenn möglich, der radikalen Mastektomie vorgezogen. Randomisierte klinische Studien zeigten bei einer BET mit anschließender Strahlentherapie eine gleichwertige Überlebensrate wie bei einer radikalen Mastektomie (van Dongen et al. 2000; Fisher et al. 2002).

Kontraindikationen für eine BET sind:

- ein inflammatorisches Karzinom
- ein multizentrisches Karzinom
- ein ungünstiges Tumor-Größenverhältnis
- wenn eine Nachbestrahlung nicht möglich ist
- wenn trotz Nachresektion eine resektionsfreie Entfernung des Tumors nicht möglich ist
- der Wunsch der Patientin

Strahlentherapie

Eine postoperative Radiotherapie (Strahlentherapie) nach einer BET ist heute Goldstandard in der lokoregionären Therapie. Eine postoperative Radiotherapie der Brustwand nach einer radikalen Mastektomie ist indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie 2012; Truong et al. 2004):

- bei einer Tumorgroße von mehr als 5 cm
- bei einer nicht im Gesunden erfolgten Resektion
- bei einem Befall von mehr als drei Lymphknoten

Bei inoperablen Tumoren kann eine palliative Radiotherapie mit eventueller systemischer Therapie erfolgen. Die Schmerzlinderung steht dabei im Vordergrund.

Systemische Therapie

Wiederholte Metaanalysen der Early Breast Cancer Trialists' Cooperative Group (EBCTCG) zeigten eine Senkung der Mortalitäts- und der Rezidivrate, unabhängig vom Alter des Patienten und dem Lymphknotenstatus, durch eine adjuvante systemische Therapie (EBCTCG 2005).

Ob eine Notwendigkeit für eine adjuvante Therapie besteht und welche Form oder Kombinationstherapie gewählt wird, richtet sich nach folgenden Faktoren: Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, HER2-Status, Menopausenstatus und Alter. Nach den Empfehlungen von St. Gallen teilt man die Patienten in drei Risikogruppen ein, die sich auf die oben genannten Faktoren beziehen. So wird z.B. einer Patientin mit einem niedrigen Risiko eine neoadjuvante endokrine Therapie empfohlen, auf eine Chemotherapie kann verzichtet werden (Glick et al. 1993). Eine hohe Effektivität einer Polychemotherapie hat man insbesondere bei prämenopausalen Tumorpatienten mit einer jährlichen Risikosenkung von 29% (Love und Koroltchouk 1996). Alle Patientinnen mit einem negativen Rezeptorstatus (ER-, PR-) erhalten in der Regel eine adjuvante Chemotherapie. Eine Hormontherapie wird bei Progesteron- und/oder Östrogenrezeptor-positiven Tumoren eingesetzt. Wie bereits erwähnt, beeinflussen beide Hormone das Zellwachstum und somit auch das Zellwachstum von Karzinomzellen. Der Therapieansatz bei prä- und postmenopausalen Patienten mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren ist unterschiedlich. Da bei prämenopausalen Patientinnen das Östrogen vor allem in den Ovarien gebildet wird, profitieren diese von GnRH-Analoga (wie z.B. Leuprorelin bei Eligard®) und/oder einer Ovariectomie. GnRH-Analoga hemmen über die Hypophysen-Hypothalamus-Achse die Synthese von ovariellen Steroiden. Bei post-

menopausalen Patientinnen wird Östrogen in der Peripherie gebildet, hier eignen sich Antiöstrogene. Die Antiöstrogene werden in Östrogenrezeptor-Antagonisten (wie z.B. Tamoxifen®) und Aromatase-Inhibitoren unterteilt. Die Östrogenrezeptor-Antagonisten wirken antiproliferativ, indem sie an den Östrogenrezeptor binden, weiterhin können sie die Apoptose der Zelle induzieren (De Medina et al. 2009). Bei der Tamoxifen®-Therapie konnte nach Angaben der EBCTCG eine Senkung der relativen Rezidivwahrscheinlichkeit (um ca. 40%) und der Sterblichkeit beobachtet werden (EBCTCG 2005). Der Aromatase-Inhibitor bindet an das Enzym Aromatase, welches für die Synthese von Östrogen entscheidend ist. Das Enzym kommt im Ovar, im Fettgewebe, im Muskel und im Tumorgewebe des Mammakarzinoms vor (Schiavon und Smith 2014; Abu Hashim 2014). Die Aromatase-Inhibitoren finden nur bei post-, perimenopausalen oder bei Patientinnen nach durchgeführter Ovariectomie Einsatz (Schiavon und Smith 2014).

Der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) wird bei Patientinnen mit Nachweis eines positiven HER2/neu-Rezeptorstatus eingesetzt. HER2/neu ist ein Wachstumsfaktor-Rezeptor. Auf dem gleichnamigen Gen findet sich bei bis zu 20-25 % aller Mammakarzinome eine Mutation, die zu einer Überexpression des Rezeptors führt. Der Antikörper bindet an den extrazellulären Teil des Rezeptors und hemmt somit das Wachstum (Nahta und Esteva 2006; Viani et al. 2007). Unabhängige Studien bewiesen eine Senkung der Rezidivrate sowie der Mortalitätsrate bei einer Behandlung mit Trastuzumab in Kombination mit einer Standard-Chemotherapie (Dahabreh et al. 2008; Spielmann et al. 2009; Viani et al. 2007; Yin et al. 2011).

Für die Behandlung des Mammakarzinoms gibt es somit insgesamt ein breites Spektrum an therapeutischen Möglichkeiten.

1.2 Tumorprogression und Metastasierung im Mammakarzinom

Die molekularen Mechanismen, die einer Tumorprogression zugrundeliegen, sind äußerst komplex und bisher nur lückenhaft aufgeschlüsselt worden (Cavallaro und Christofori 2004). Das invasiv-duktales Karzinom macht 50-80%

der Brustkrebsfälle aus (Weigelt et al. 2005). Eine Hypothese zur Entstehung des duktales Karzinoms teilt den Ablauf in drei Stadien ein. Zunächst verändere sich die gesunde Zelle in eine atypische duktales Hyperplasie (ADH), die sich dann über Jahre zu einem *in-situ*-Karzinom und letztendlich zu einem invasiven Karzinom entwickle (McSherry et al. 2007). Für diese Schritte muss die Tumorzelle dazu fähig sein, die umgebende Struktur zu durchbrechen. Um zu metastasieren, durchbrechen die Karzinomzellen die Basalmembran, wandern in das umgebende Gewebe und können über das Lymphgefäßsystem (lymphogen) in die regionalen Lymphknoten oder über das Blutgefäß (hämatogen) in das Knochenmark oder entfernte Organe, wie z.B. Lunge, Leber und Gehirn, gelangen (Liotta et al. 1991). Dieser Prozess entsteht erst, wenn die physiologischen Kreisläufe durch z.B. Veränderungen von Genen gestört werden (Hanahan und Weinberg 2000). Dabei spielen Änderungen in den sogenannten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen eine entscheidende Rolle. Onkogene sind für die Weiterleitung von Wachstumssignalen entscheidend. Durch eine Mutation werden sie übermäßig aktiviert. Tumorsuppressorgene, wie z.B. p53, kontrollieren den Ablauf des Zellzyklus oder den programmierten Zelltod (Apoptose). Sie werden durch Mutationen in ihrer Aktivität gehemmt oder vollständig inaktiviert (Lengauer et al. 1998; Hanahan und Weinberg 2000). Hanahan und Weinberg (Hanahan und Weinberg 2000) nennen sechs Eigenschaften, die eine Tumorzelle charakterisieren und bei gesunden Zellen nicht vorliegen: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Entzug der Apoptose, unbegrenztes Replikationspotenzial, Angiogenese, Invasion und Metastasierung. Es wird vermutet, dass alle Tumorzellen diese Eigenschaften besitzen.

1.3 Zelladhäsionsmoleküle

Jede Zelle ist durch Zelladhäsionsmoleküle mit ihrer Umgebung verbunden. Zelladhäsionsmoleküle, auch CAMs genannt (Cell Adhesion Molecule), sind für diese Haftung unentbehrlich. Sie sind außerdem wichtig für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zellen. Die Zelladhäsionsmoleküle sind im engeren Sinne

Transmembranproteine, die eine Verbindung zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix und Zell-Zell-Kontakte vermitteln (Gumbiner 1996). Während Zell-Matrix-Kontakte eine Verankerung und eine Interaktion der Zelle mit der Extrazellulärmatrix (ECM) ermöglichen, erleichtern Zell-Zell-Adhäsions-Komplexe eine Kommunikation zwischen den Zellen (McSherry et al. 2007). Zelladhäsionsmoleküle können in vier Gruppen aufgeteilt werden: Cadherine, Integrine, Immunglobulinen-Superfamilie (Ig-CAM) und Selektine. Die ersten drei Gruppen werden im Nervensystem gebildet (Kiryushko et al. 2007). Cadherine und Selektine sind kalziumabhängige Moleküle. Die meisten Ig-CAMs besitzen ein transmembranes und ein zytoplasmatisches Ende und einige sind sogar mit der Zelloberfläche durch einen Glykophosphatidylinositol-Anker verbunden (Cavallaro und Christofori 2004). Des Weiteren spielen Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion, da sie als Signaltransduktionsrezeptoren fungieren (Cavallaro und Christofori 2004; Kiryushko et al. 2007). Veränderungen in der Expression oder der Funktion von Adhäsionsmolekülen können eine Tumورprogression begünstigen, indem der Adhäsionsstatus sich verändert und die Signaltransduktion beeinflusst wird (Cavallaro und Christofori 2004).

1.4 Zellkontakte

Als Zellkontakte werden die Verbindungen zwischen zwei benachbarten Zellen oder mit den umliegenden Geweben bezeichnet. Sie sind entweder gürtelförmig (Zonulae), punktförmig (Maculae) oder streifenförmig (Fascia) ausgebildet. Es gibt drei große Gruppen von Zellkontakten: 1. Adhärenskontakte, 2. Kommunikationskontakte und 3. Verschlusskontakte (Welsch 2006). Für diese Verbindungen sind, wie bereits erwähnt, Adhäsionsmoleküle notwendig. An einer Zellhaftung sind in der Regel drei Makromoleküle beteiligt: ein Zelladhäsionsrezeptor, ein Plaque-Protein und ein extrazelluläres Matrix-Molekül (Gumbiner 1996). Adhärenskontakte dienen der mechanischen Verbindung oder der Verankerung der Zellen an der extrazellulären Matrix. Sie sind also für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindung zuständig. Desmosomen, Hemidesmosomen und Zonula

adhaerens gehören zu dieser Gruppe. Kommunikationskontakte (Nexus) sind kleine fleckenförmige Kontakte, die v.a. in Herzmuskelzellen und Nervenzellen vorkommen. Durch zahlreiche „Tunnelproteine“ (Connexon) werden die Zellen miteinander direkt verbunden. So können chemische und elektrische Signale weitergegeben werden.

Durch Verschlusskontakte (Barriernkontakte/Tight junction) können größere Moleküle kontrolliert in die Zelle diffundieren. Dieser Kontakttyp, auch Zonula occludens genannt, findet sich meist in den Epithelien (Welsch 2006).

1.5 Rolle der Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorprogression

Da Zellkontakte die erste Barriere darstellen, müssen sie durchbrochen werden, damit eine Tumorerkrankung und eine Metastasierung gelingen kann (Martin und Jiang 2001). Das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, das an homotypischen Zell-Zell-Verbindungen beteiligt ist, wird als wichtiger

Metastasierungssuppressor angesehen. Der Verlust von E-Cadherin in den Tumorzellen wurde in vielen Studien nachgewiesen. Es löst aktive Signale aus, welche die Tumorzellmigration, Invasion und Disseminierung fördern. Veränderungen der Expression von Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression. Ein deutliches Beispiel dafür ist N-CAM (Neuralzelladhäsionsmolekül). So wurde eine Veränderung der Isoform des Zelladhäsionsmoleküls N-CAM nachgewiesen. Bei einigen Tumorzellen, wie z.B. im Neuroblastom und kleinzelligem Lungenkarzinom, durchläuft N-CAM einen Switch, der mit einem Verlust der Zelladhäsionskraft einhergeht. N-CAM interagiert ferner mit dem Wachstumsfaktor FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor). Der Verlust der N-CAM-Funktion beeinträchtigt die Zell-Matrix-Adhäsion, da der Wachstumsfaktor sich nicht mehr verbinden kann und die von FGFR erzeugten Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsionen ausbleiben (Cavallaro und Christofori 2004).

Ein weiterer Parameter für eine Tumorprogression ist die Fähigkeit der Adhäsionsmoleküle, über Tumor-Matrix-Verbindungen und Tumorzell-Endothelzell-Verbindungen extrazelluläre proteolytische Enzyme (Matrix-Metalloproteinase-

MMPs) zu binden. Durch die Aktivierung dieser Enzyme können diese die Basalmembran abbauen und die Migration von Tumorzellen zulassen. MMP ist eine Zink-abhängige Proteinase. Das Enzym ist für physiologische Prozesse, Zellmigration und Gewebsremodellierung von Bedeutung. ALCAM ist ebenfalls eng mit der Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) verbunden. Je nach Tumortyp kann es zu einer Aktivierung oder Deaktivierung der MMP-2 kommen (Lunter et al. 2005).

1.6 ALCAM

ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule) ist ein Oberflächenmolekül und gehört zu der heterogenen Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAM). Es ist auf dem Chromosom 3 (3q13.1-q13.2) kodiert und hat ein Molekulargewicht von 105 kDa (Ofori-Acquah und King 2008; Burkhardt et al. 2006). Es besitzt fünf extrazelluläre Immunglobulindomänen, eine transmembranäre Region und ein kurzes zytoplasmatisches Ende (Swart 2002).

ALCAM, auch bekannt als CD 166 oder „melanoma-metastazing clone D“ (MEMD), wird in unterschiedlichen Organen und Zellen physiologisch gebildet. Anfangs wurde es nur in Thymusepithelzellen und aktivierten Leukozyten gefunden, später aber auch in Fibroblasten, Epithelzellen, Inselzellen, Neuronen, Hepatozyten und im Knochenmark (Burkhardt et al. 2006). ALCAM ist also an der Embryogenese, Angiogenese, Hämatopoese (Ohneda et al. 2001) und an der Immunantwort (Masedunskas et al. 2006) beteiligt.

ALCAM kann Tumorzell-Endothelzell-Verbindungen, Tumorzell-Matrix-Verbindungen (Ofori-Acquah und King 2008) und Zell-Zell-Verbindungen (Lunter et al. 2005) eingehen. Es geht nicht nur homotypische (ALCAM-ALCAM), sondern auch heterotypische Bindungen mit anderen Liganden ein. Die homotypischen Verbindungen werden durch das Zytoskelettsystem reguliert (Lunter et al. 2005). Am besten erforscht sind die Bindungen zwischen ALCAM und der von den T-Zellen exprimierten CD6 (Bowen und Aruffo 1999; Ofori-Acquah und King 2008). Die Rolle von ALCAM wurde erstmals im malignen Melanom geprüft. Hierzu gibt es die meisten Studien. Die Studien zeigen eine

Korrelation zwischen hoher ALCAM-Expression und einer vertikalen Tumor-metastasierung im malignen Melanom (Ofori Aquah und King 2008).

Weiterhin wurde ALCAM in den letzten Jahren in Neuroblastomen (Corrias et al. 2010), Schilddrüsenkarzinomen (Miccichè et al. 2011), oralen Plattenepithelkarzinomen (Sawhney et al. 2009), Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Verma et al. 2005), in Karzinomen der Mamma (King et al. 2004; Burkhardt et al. 2006), des Pankreas (Kahlert et al. 2009), des Ovars (Mezzanzanica et al. 2008), der Prostata (Tomita et al. 2000), der Harnblase (Weidle et al. 2010) und in kolorektalen Karzinomen (Weichert et al. 2004) nachgewiesen.

Die Untersuchungen ergaben, dass ALCAM in einigen Tumorzellen vermehrt und in anderen nur gering vorkommt. Ein Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von ALCAM in den Tumorzellen und einer ungünstigen Prognose wurde im Neuroblastom (Corrias et al. 2010), im malignem Melanom (van Kempen et al. 2000), im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Verma et al. 2005), im Pankreaskarzinom (Kahlert et al. 2009) und kolorektalem Karzinom (Weichert et al. 2004) festgestellt.

Hinsichtlich der Auswirkung von ALCAM auf das Mammakarzinom ist sich die Wissenschaft uneinig. Einige Studien stufen ein erhöhtes Auftreten von ALCAM als schlechte Prognose (Burkhardt et al. 2006) im Sinne einer Lymphknoten-metastasierungen und Lokalrezidive (Piao et al. 2012) ein. Dem stehen Forschungsergebnisse gegenüber, die eine verminderte Expression von ALCAM als ungünstigsten klinischen Verlauf bezeichnen (King et al. 2004; Milde-Langosch et al. 2008; Davies und Jiang 2010).

Da ALCAM ein Membranprotein ist, stellt es einen möglichen Anknüpfungspunkt für die medikamentöse Behandlung dar. Der Nutzen von ALCAM als Zielstruktur für Medikamente kann zudem durch eine ligandengesteuerte Endozytose verstärkt werden (Liu et al. 2007). Darüber hinaus konnte bei einem menschlich rekombinierten Einzellketten-Antikörper gegen ALCAM eine hemmende Wirkung auf Krebszellinvasionen und das Tumorwachstum gezeigt werden (Wiiger et al. 2010).

Ziel dieser Arbeit ist es, gerade vor dem Hintergrund der gegensätzlichen Ansichten, die Rolle von ALCAM für den Brustkrebs bezüglich der Prävalenz und

Prognose an einem besonders großen Tumorkollektiv abzuklären. Hierzu dienen bereits vorhandene Tissue Micro Arrays, bestehend aus mehr als 2000 Gewebeproben vom Mammakarzinom.

Das Datenmaterial zeigt einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von ALCAM und einer nachteiligen Prognose.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebemikroarray-Technologie

Die Grundlage dieser Technik entwickelten Battifora und Team bereits in den 1980er Jahren (Battifora 1986). Erstmals wurden in einem neuen Paraffinblock verschiedene Gewebeproben eingebracht, um einen schnelleren und effizienteren Arbeitsablauf zu ermöglichen und vor allem ein großes Patientenkollektiv im Vergleich zu konventionellen Gewebeaufbereitungen untersuchen zu können. Im Zuge technischer Weiterentwicklung wurde die TMA-Technik (engl. tissue microarray) letztendlich 1998 von Kononen et al. (Kononen et al. 1998) vorgestellt. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, in nur einer Untersuchung eine Vielzahl von histopathologischen Analysen gleichzeitig und parallel durchzuführen. Weiterhin kann eine große Zahl fast identischer Gewebeareale mehrmals mit Antikörpern untersucht werden (Merseburger et al. 2003). Eine Kombination mit anderen molekulargenetischen Verfahren (FISH, PCR, Immunhistochemie etc.) ist möglich (Simon et al. 2004). In der vorliegenden Studie wurden das Gewebemikroarray-System und die Immunhistochemie angewandt.

2.2 Herstellung eines Mikroarrays im Allgemeinen

Zunächst werden die benötigten Hämatoxylin-Eosin(H.E.)-gefärbten Gewebeschnitte und die dazugehörigen Paraffinblöcke aus den Archiven herausgesucht. Die Schnitte werden anschließend vom Pathologen unter dem Lichtmikroskop auf ihre Eignung geprüft. Der Pathologe wählt die Tumorbereiche, die später vom jeweiligen Paraffinblock ausgestanzt werden sollen, aus und markiert diese farbig (Abb. 3). Für die weiteren Schritte wird das Array-Stanzgerät (Abb. 4) benötigt. Mit einem Hohlzylinder (Innendurchmesser von 0,6 mm) wird aus dem Gewebeblock, auch „Donor-Block“ genannt, nach Abgleich des dazugehörigen farbig markierten H.E.-Schnittes das betroffene Areal ausgestanzt. Anschließend wird der entnommene Tumorzylinder in einen leeren Paraffinblock („Rezipienten-Block“) überführt. Vorher wird hierfür mit

einem Bohrer mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm ein Loch vorgefertigt (Simon et al. 2004). Die oben genannten Schritte werden für jeden Tumor wiederholt, so dass am Ende ein TMA-Block entsteht (Abb. 4 E). Ein Koordinatensystem dient als Orientierung für den TMA, um jeden Tumor exakt einordnen zu können. Die Möglichkeit einer genauen Auswertung ist somit gewährleistet (Abb. 5).

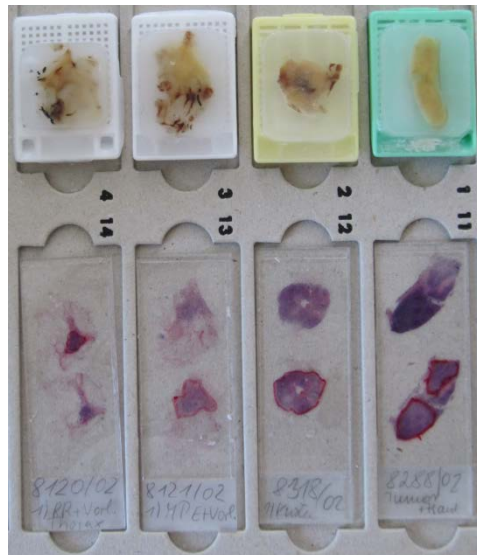


Abb. 3: Obere Reihe: In Paraffin eingebettete Tumorblöcke. Untere Reihe: die dazugehörigen Tumorschnitte (H.E.-gefärbt). Das in Frage kommende Tumorareal wurde vom Pathologen rot eingezeichnet.

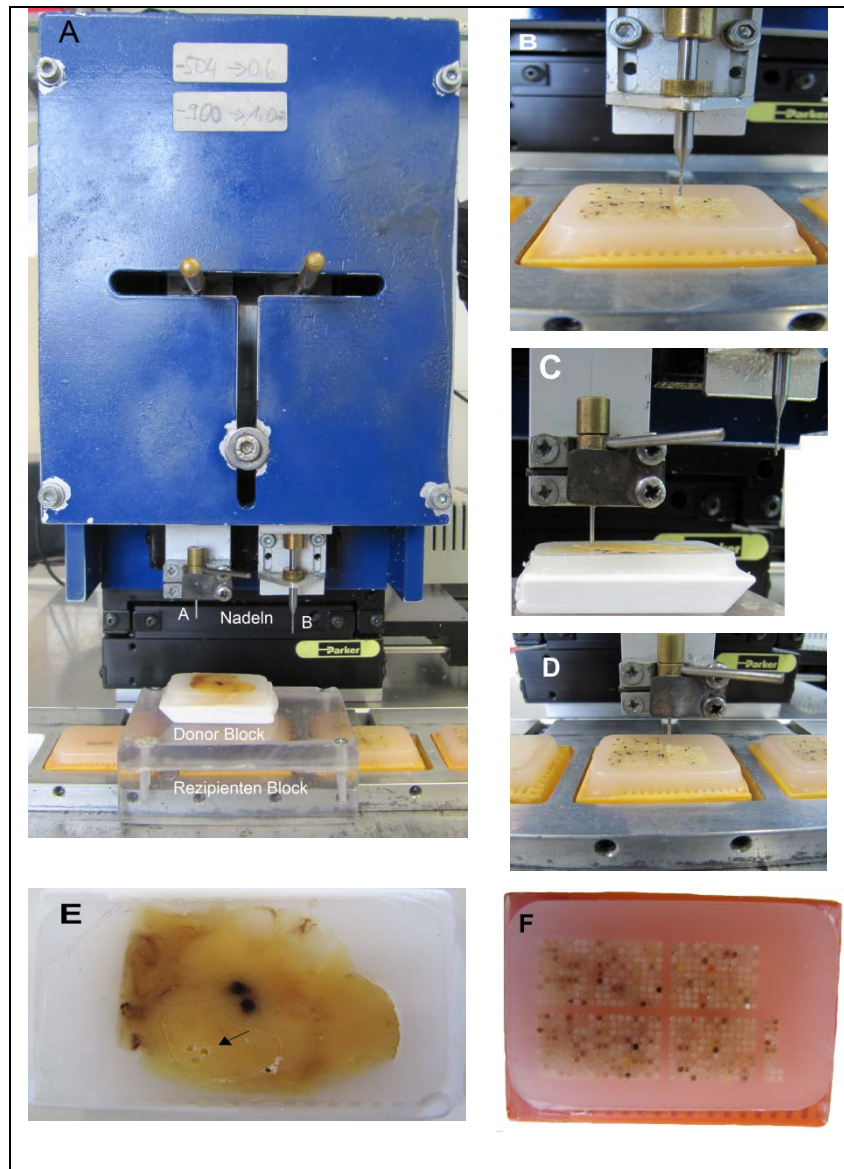


Abb. 4: (A) Array-Stanzgerät; (B) Vorbereitung des Rezipientenblocks durch Nadel B; (C) Entnahme von Tumorgewebe aus dem Donor-Block durch Nadel A; (D) Einsetzen des Tumorgewebes durch Nadel A in den bereits vorbereiteten Rezipientenblock; (E) Donor-Block, hier sind bereits entnommene 0,6 mm große Stanzlöcher zu sehen (s. Pfeil); (F) Rezipientenblock, fertig gestanzter TMA-Block

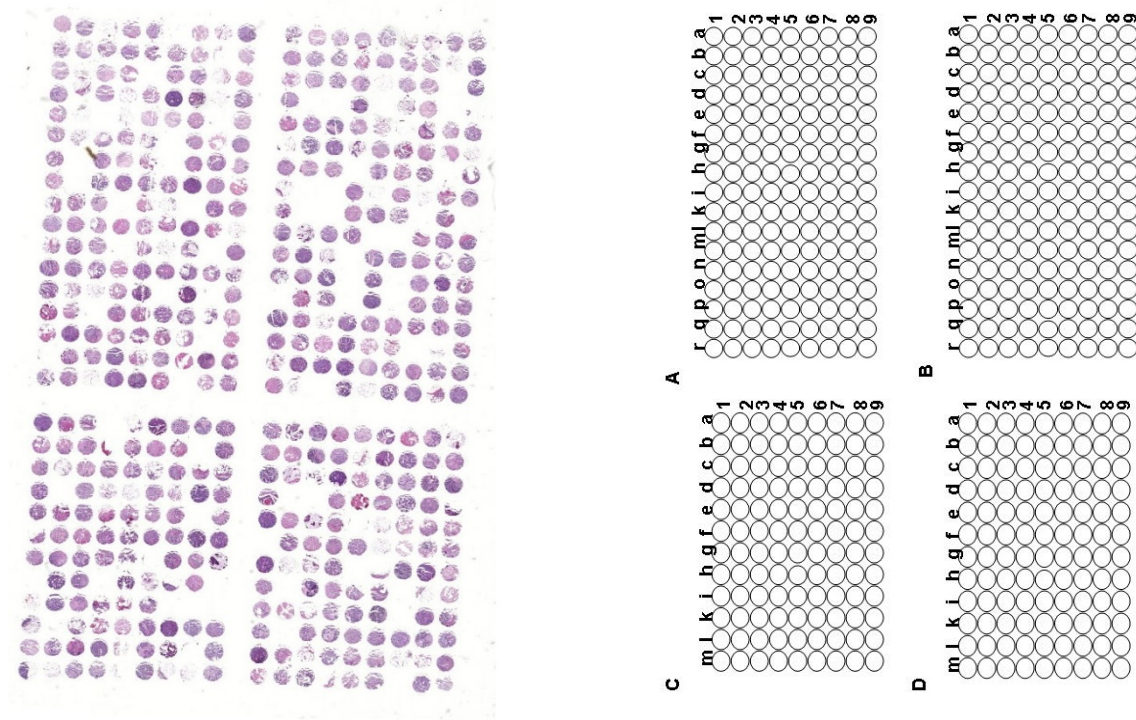


Abb. 5: links: TMA in H.E.-Färbung; rechts: Koordinatensystem, das der exakten Zuordnung der Tumoren auf dem TMA dient

Nach der Herstellung des TMA-Blocks wird auf diesen ein Klebetape geklebt. Anschließend erfolgt ein ca. 4-5 µm dünner Schnitt durch das Mikrotom (Schneidegerät). Dieser Schnitt bleibt an dem Tape haften. Der TMA-Schnitt wird dann auf einen sogenannten Klebe-Slide angebracht. Zum Aushärten wird der Klebe-Slide UV-Licht ausgesetzt. Das Klebetape kann daraufhin entfernt werden, so bleibt nur noch das Gewebe auf dem Objektträger haften. Zuletzt muss der fertige TMA-Objektträger bei Raumtemperatur trocknen (Simon et al. 2005).

2.3 Mamma-TMA

In dieser Studie wurde ein bereits vorhandener TMA-Block, ein sogenannter Prognose-TMA, der aus 2197 Proben von Primärtumoren der Mamma besteht, verwendet (Ruiz et al. 2006). Dieser TMA verteilte sich auf insgesamt sechs Paraffinblöcke. Jeder einzelne von ihnen enthält zwischen 342 und 522 Spots. Die Tumoren stammten

aus den Archiven des Institutes für Pathologie, dem Universitätsspital Basel, dem Institut für klinische Pathologie in Basel und dem Triemli Spital in Zürich. Für die Herstellung der TMA-Blöcke wurden von einem Pathologen zunächst konventionelle H.E.-Färbungen von in Frage kommenden Gewebeproben von Patienten mit diagnostiziertem Mammakarzinom mikroskopisch untersucht. Die geeigneten Areale wurden dann auf den Schnitten markiert, um genau diese repräsentierten Zylinder aus den jeweiligen Paraffinblöcken auszustanzten. Klinische Follow-up-Daten lagen entweder aus dem Krebsregister Basel oder von den behandelnden Ärzten vor. Am Ende der Studie gab es von 2194 Patienten Gesamt-Rohüberlebensdaten und von 943 Patienten tumorspezifische Überlebensdaten.

Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 62 Jahre (26-101 Jahre). Die mittlere Follow-up-Zeit betrug 68 Monate (1 bis 176 Monate). Die Angaben für die Tumorausdehnung, Tumorgroße und den Lymphknotenstatus wurden den Primärbefunden des erstdiagnostizierenden Pathologieinstitutes entnommen. Die Tumorgraduierung erfolgte gemäß der aktuellen Richtlinien der WHO zur Klassifizierung von Tumoren und der histologische Grad gemäß Elston und Ellis (Elston und Ellis 1991).

2.4 Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie (IHC) ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation bestimmter Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper. Bei dieser Methode binden sogenannte Primärantikörper mit ihrem F(ab)-Fragment bestimmte Abschnitte des Proteins, sogenannte Epitope. Der Antikörper kann polyklonal oder monoklonal sein. Ein polyklonaler Antikörper ist im Grunde ein Antikörpergemisch und deswegen in der Lage, mehrere Epitope zu erkennen. Ein monoklonaler Antikörper erkennt nur ein spezifisches Epitop. Der Erfolg der Untersuchung hängt von der richtigen Vorbehandlung ab. Vorab muss eine sogenannte Antigendemaskierung erfolgen, z.B. durch ein Pufferbad. Denn die Proteine werden durch die kovalenten Bindungen im formalinfixiertem Gewebe denaturiert und können deswegen oft keine Verbindung mit dem spezifischen Antikörper eingehen. Eine thermische Vorbehandlung renaturiert in vielen Fällen die Proteine, und die maskierten Proteine werden teilweise freigelegt (Ramos-Vara 2005).

2.5 ALCAM- Antikörper

Für diese Arbeit wurde ein monoklonaler Antikörper, NCL-CD-166, aus dem Klon MOG/07 der Klasse IgG2a kappa der Firma Novocastra, Großbritannien, eingesetzt. Dieser Antikörper stammt aus der Maus und richtet sich gegen einen aus 200 Aminosäuren bestehenden Abschnitt des humanen CD-166-Moleküls.

2.6 Durchführung der Immunhistochemie

Für die IHC wurden von den TMA-Blöcken 4 µm dicke Schnitte auf einem Objektträger (Instrumedics Inc., Hackensack, New Jersey) angefertigt.

Diese Objektträger wurden anschließend mindestens eine Stunde in Xylol und danach in absteigender Ethanolreihe (Isopropylalkohol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%) bis zu destilliertem Wasser entwässert. Daraufhin wurden die TMA-Schnitte für fünf Minuten im TBST-Puffer (Tris gepufferte Kochsalzlösung) abgespült. Anschließend wurden die TMA-Schnitte für fünf Minuten in Citratpuffer (pH 7,8) autoklaviert und erneut für fünf Minuten im TBST-Puffer gespült.

Die endogene Peroxidase wurde mit 3%-igem Wasserstoffperoxid (DAKO S2023) in Methanol blockiert, um falsch positive Ergebnisse zu verhindern. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal im TBST-Puffer gewaschen.

Die Objektträger wurden dann mit dem monoklonalen Antikörper in einer Verdünnung von 1:450 in Citratpuffer (pH 7,8) aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfernung der Antikörper erfolgte in einem zweimaligen je 5-minütigen Waschgang mit TBS-Puffer. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit EnVision rabbit/mouse (Dako K5007) für 30 Minuten bei 37 °C und zweimaligem fünfminütigem Waschen mit TBS-Puffer.

Die spezifischen Antikörper-Antigen-Bindungen wurden mit DAB-Chromogen bei Raumtemperatur für zehn Minuten (DAB-Chromogen K5007) angefärbt. Daran schloss sich ein erneuter Waschgang mit destilliertem Wasser für fünf Minuten an. Zur Darstellung der Zellkerne wurde für eine Minute Haemalaum gegengefärbt, gefolgt von einem fünfminütigen Bläuen mit Leitungswasser. Die Schnitte wurden abschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 100%, 100%) entwäs-

sert. Schließlich wurden die Objektträger für eine längere Aufbewahrung eingedeckelt.

2.7 Auswertung

Die Intensität der immunhistochemischen Färbung wurde anhand einer Skala von 0 (keine Färbung) bis 3 (starke Färbung) bestimmt. Es wurden nur die membranösen Färbungen evaluiert, da die zytoplasmatischen Färbungen stets mit einer hohen membranösen Intensität verbunden waren. Zudem wurde in jedem Fall die Zahl der positiven Tumorzellen registriert. Basierend auf den in Tab. 3 dargestellten Kriterien wurde die Expression von ALCAM in Kategorien eingeteilt.

Tab. 3.: Auswertungskriterien für die IHC

Resultat	Intensität der Farbe	Positive Tumorzellen in %
Negativ	0	0
schwach positiv	1+	>70%
	2+	≤30%
mäßig positiv	1+	>70%
	2+	>30% und ≤70%
	3+	≤30%
stark positiv	2+	>70%
	3+	>30%

Die Daten für die immunhistochemische Expression von Ki67 (Kiel-67), ER und PR waren aus vorhergegangenen Studien ersichtlich (Al-Kuraya et al. 2004; Ruiz et al. 2006). In dieser Studie wurde das Allred Score für die Evaluation von ER/PR-Färbung verwendet.

2.8 Statistik

Mithilfe von Kontingenztabellen und Chi-Quadrat-Tests konnte die Beziehung zwischen der ALCAM-Immunfärbung und den klinischen Variablen berechnet werden.

Für die Überlebensrate wurden Kaplan-Meier-Plots erstellt und signifikante Unterschiede mit dem Log-Rank-Test berechnet. Für multivariante Analysen wurde das COX-Regressionsmodell verwendet. Als statistisch signifikant wurden Werte von $p \leq 0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 ALCAM- Expression

Die immunhistochemische Auswertung war an insgesamt 1778 (80,9%) der 2197 Tumorgewebesots möglich. Bei 419 Spots konnte keine Auswertung erfolgen, weil keine eindeutigen Tumorzellen im Spot waren. Eine membranöse ALCAM-Expression wurde in 1568 (88,2%) Spots festgestellt. Eine schwache Färbung war in 197 (11,1%), eine mäßige in 194 (10,9%) und eine starke ALCAM-Expression in 1177 (66,2%) der Tumoren nachweisbar. In 210 (11,8%) der auswertbaren Spots war im Tumorgewebe keine ALCAM-Expression nachweisbar. Die Abb. 6 bis 10 zeigen typische Beispiele für die unterschiedliche Farbintensität in der Immunhistochemie. Das medulläre Mammakarzinom zeigte mit nur 36,17 % am seltensten eine starke ALCAM-Färbung. Insgesamt gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Tumortypen (siehe Tab. 4).

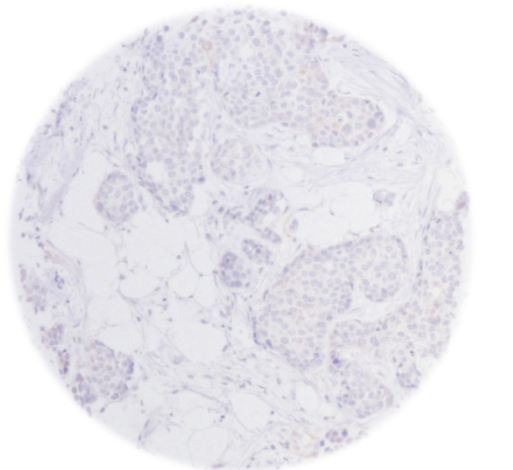


Abb. 6. Keine Anfärbung für ALCAM

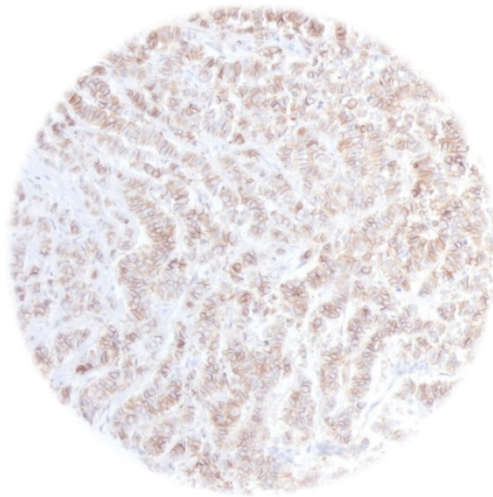


Abb. 7: Schwache ALCAM-Anfärbung

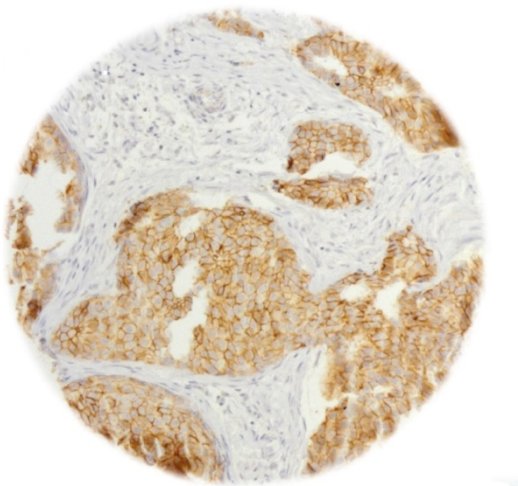


Abb. 8: Mäßig starke ALCAM-Anfärbung

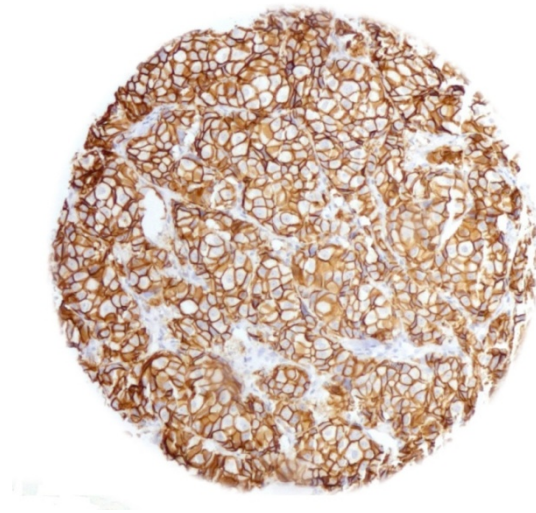


Abb. 9: Starke ALCAM-Anfärbung

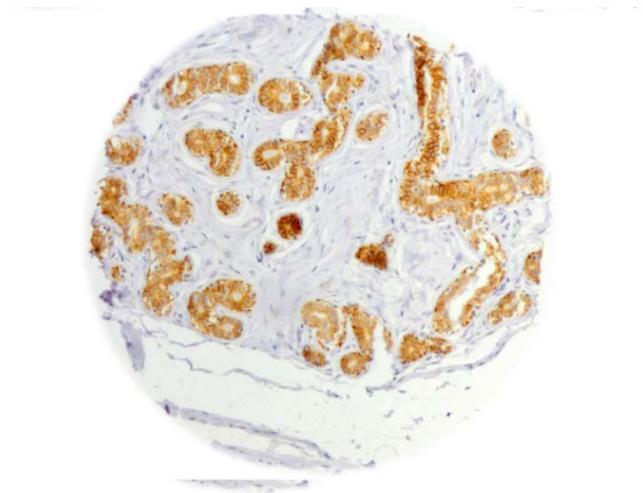


Abb. 10: Normales Brustgewebe mit mäßig gradiger bis starker ALCAM-Expression

Tab. 4: Assoziation zwischen ALCAM-Expression und dem Mammakarzinom-Phänotyp

Histologie	N*	Negative ALCAM-Expression (%)	Schwache ALCAM-Expression (%)	Mäßige ALCAM-Expression (%)	Starke ALCAM-Expression (%)	P-Wert
Alle Karzinome	1778	11,8	11,1	10,9	66,2	
duktales Karzinom	1259	11,76	10,48	11,28	66,48	
lobuläres Karzinom	236	7,2	10,59	12,71	69,49	
medulläres Karzinom	47	40,43	14,89	8,51	36,17	<0,0001**
tubuläres Karzinom	44	4,55	4,55	2,27	88,64	
muzinöses Karzinom	51	7,84	23,53	7,84	60,78	
andere Typen	141	13,48	14,18	9,22	63,12	

* analysierbare n

** für medullär vs. duktal

3.2 Assoziation zu anderen prognostischen Faktoren im Mammakarzinom

Die Studie zeigt eine fehlende ALCAM-Expression bei fortgeschrittener Tumorgroße ($p < 0,0017$) und bei hohem Tumorgrad ($p < 0,0001$).

Weiterhin zeigt sich eine Korrelation zwischen fehlender ALCAM- Expression und negativem ER- und PR- Status ($p < 0,0001$). Eine Korrelation zwischen der ALCAM-Expression und der Lymphknoten-Metastasierung konnte nicht gezeigt werden ($p = 0,098$). Alle Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Assoziation zwischen der ALCAM Expression und der Tumorausdehnung (pT), der Lymphknotenmetastasierung (pN), der Tumorgraduierung (G) und des ER- und PR-Status

	N	Negative ALCAM- Expression (%)	Schwache ALCAM- Expression (%)	Mäßige ALCAM- Expression (%)	Starke ALCAM- Expression (%)	p-Wert
pT1	614	8,63	9,61	9,93	71,82	0,0017
pT2	852	13,38	12,44	10,21	63,97	
pT3	100	13	10	9	68	
pT4	204	13,73	10,78	18,14	57,35	
pN0	744	12,1	12,63	10,35	64,92	0,098
pN1	637	10,83	9,89	11,62	67,66	
pN2	97	19,59	11,34	14,43	54,64	
G1	418	5,98	11	10,77	72,25	0,0001
G2	684	8,04	9,5	10,53	71,93	
G3	553	20,43	13,56	11,03	54,97	
ER negativ	392	26,5	14,5	7,4	51,5	0,0001
ER positiv	1303	7,1	10,1	12	70,8	
PR negativ	1070	14,2	12,6	10,2	63	0,0001
PR positiv	571	6,7	8,6	12,3	71,5	

3.3 Assoziation zur Zellproliferation

Aus einer früheren Studie (Ruiz et al. 2006) lagen Daten über die Zellproliferation gemessen an dem Marker Ki-67 vor. Das nukleäre Protein Ki-67 tritt während der G1-S-G2- und M-Phase des Zellzyklus auf und wird deswegen als Marker für den Zellzyklus verwendet (Gerdes et al. 1983). Der Ki-67 Labeling Index (LI) steht für den prozentualen Anteil der Ki-67-positiven Zellen. Der Vergleich zeigte eine inverse Korrelation zwischen der ALCAM-Expression und der Zellproliferation. Je stärker die

ALCAM-Expression, umso geringer war die mittlere Zellproliferationsaktivität. Die Daten zeigten bei stark ALCAM-positiven Mammakarzinomen im Mittel einen Ki-67-Färbeindex von 26,3%, bei ALCAM-negativen Mammakarzinomen einen Ki-67-LI von 33,1% ($p < 0.0001$; Tab. 6).

Tab. 6: Assoziation zwischen dem Ki-67-Färbeindex (Labeling Index, LI) und der ALCAM-Expression

ALCAM	N	Ki-67-LI	p
Negativ	181	33,1	<0.0001
schwach positiv	170	30,1	
mäßig positiv	160	27,5	
stark positiv	1011	26,3	

3.4 Prognoserelevanz von ALCAM

Die Studie ergab eine signifikante Beziehung zwischen dem Verlust von ALCAM und einer schlechten Überlebensrate ($p = 0,0004$, Abb. 10) sowie einer schlechten tumorspezifischen Überlebensrate ($p = 0.0053$, Abb. 12). Diese Assoziation zeigte sich auch bei separater Untersuchung aller Patienten mit einem positiven Lymphknotenstatus ($p < 0.0001$; Abb. 14). Eine multivariante Analyse ergab in der Untergruppe der duktaalen Karzinome keinen Hinweis darauf, dass ALCAM ein unabhängiger prognostischer Marker ist (Abb. 11, 13 und 15).

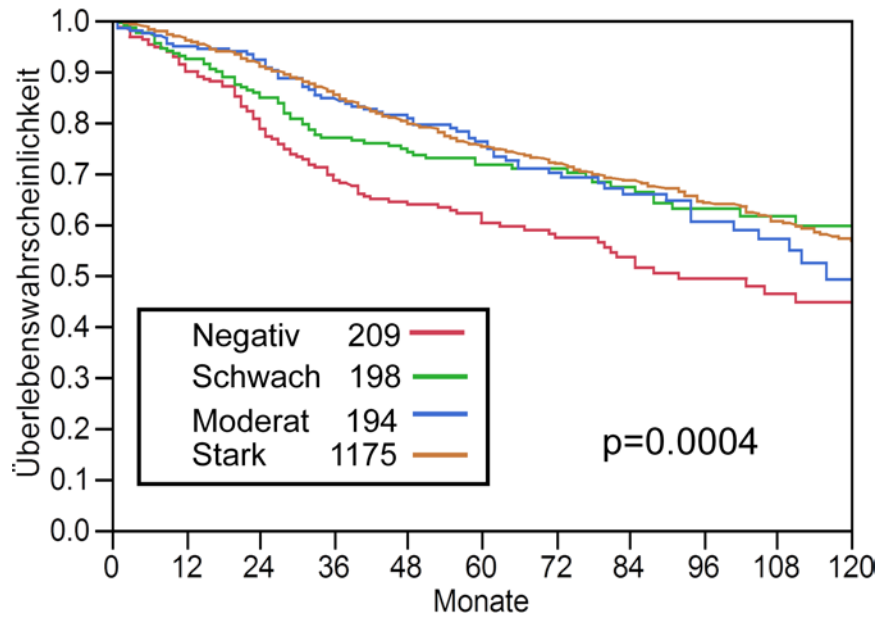


Abb. 10: ALCAM-Expression und Patientenüberleben (aller Tumoren)

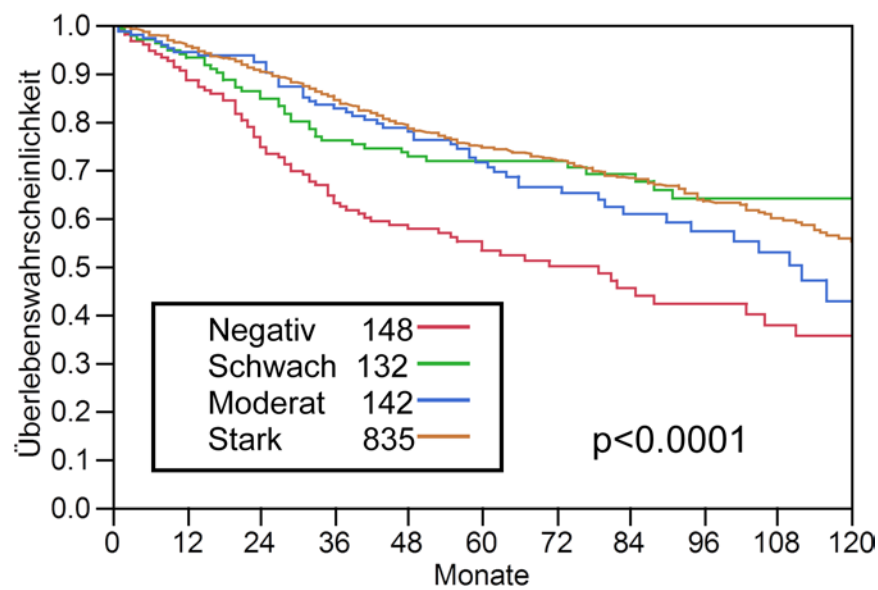


Abb. 11: ALCAM-Expression und Patientenüberleben (duktale Karzinome)

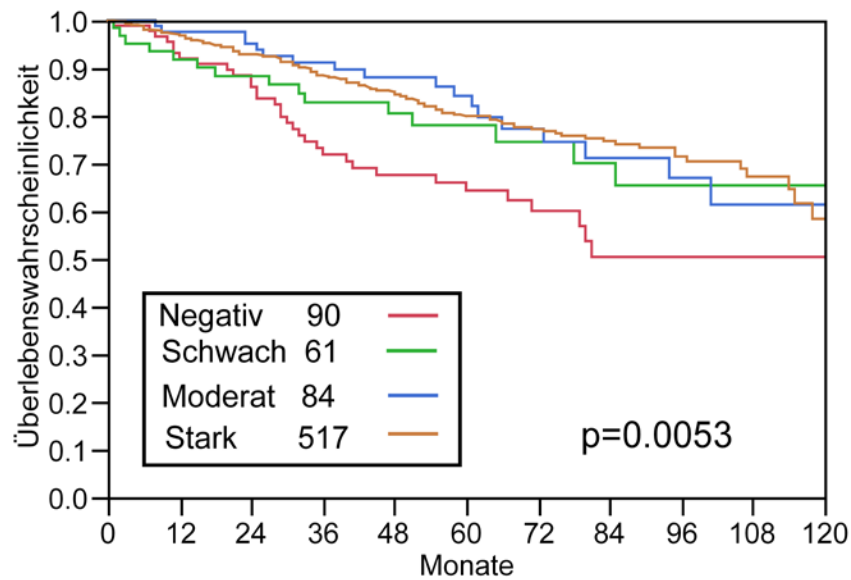


Abb. 12: ALCAM-Expression und tumorspezifisches Patientenüberleben (aller Tumoren)

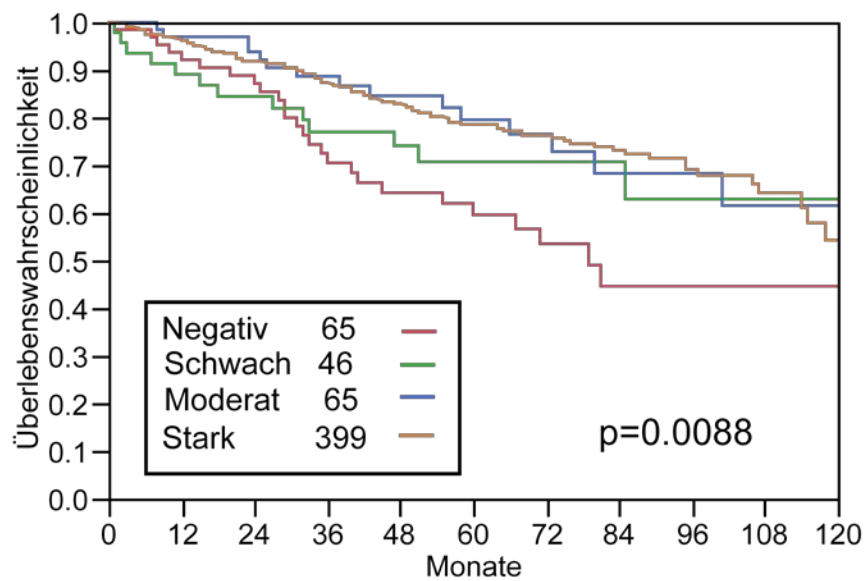


Abb. 13: ALCAM-Expression und tumorspezifisches Patientenüberleben (duktale Karzinome)

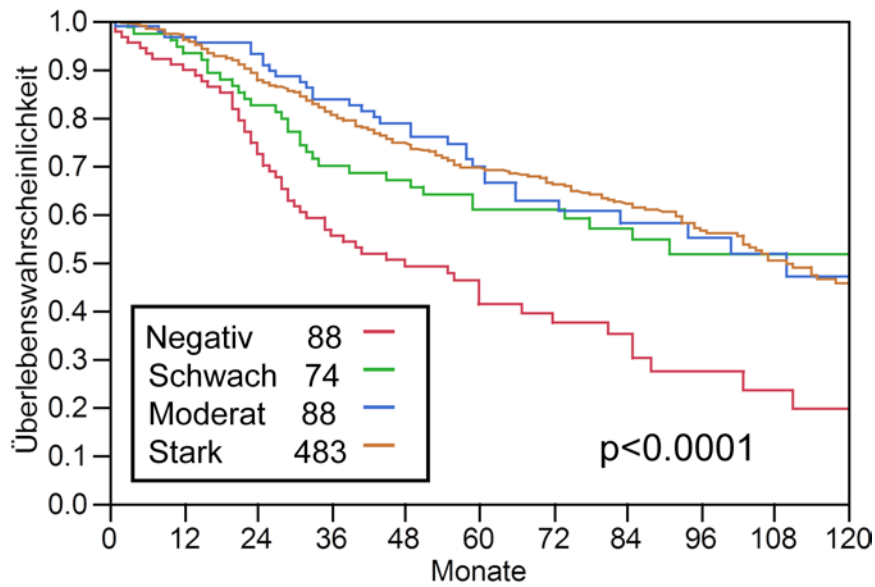


Abb. 14: ALCAM-Expression und Rohüberleben (N1, aller Tumoren)

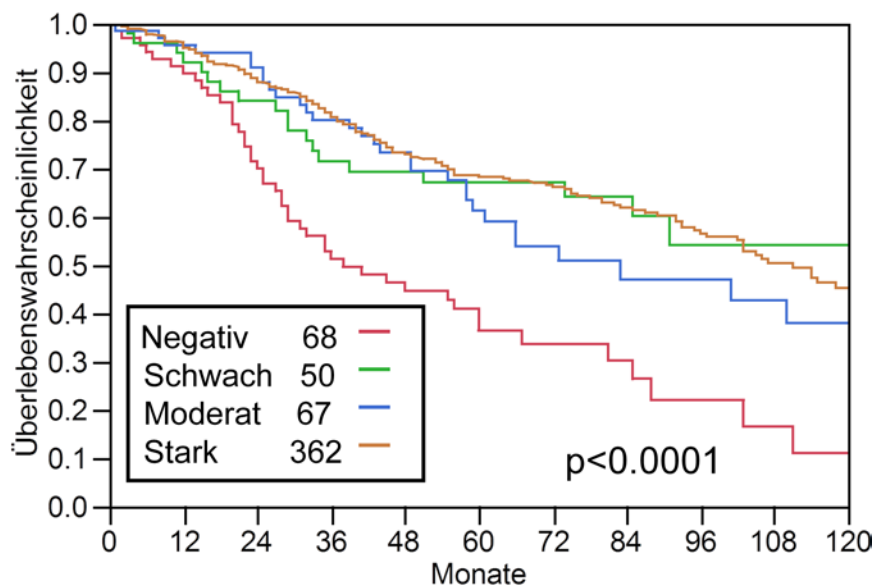


Abb. 15: ALCAM-Expression und Rohüberleben (N1, duktale Karzinome)

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden mehr als 1700 Gewebeproben vom Mammakarzinom mittels der Gewebeprobenmikroarray-Technologie hinsichtlich des Expressionsverhaltens des Oberflächenmoleküls, ALCAM, untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Verlust der ALCAM-Expression mit der Tumorprogression einhergeht und eine schlechtere Prognose nach sich zieht.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass im normalen Brustgewebe eine hohe ALCAM-Expression besteht (King et al. 2004; Kilic et al. 2008). Im Tumorgewebe zeigten sich in den Studien teilweise eine verminderte Expression oder sogar ein Verlust von ALCAM. Eine hohe ALCAM-Expression entspricht demnach dem physiologischen Zustand im normalen Brustgewebe. Auch in der vorliegenden Studie konnte dieses Phänomen bestätigt werden. Insgesamt zeigten 88% der untersuchten Mammagewebe eine ALCAM-Expression, davon 66,2% eine starke Expression. Ein Vergleich mit den Literaturdaten zeigt eine hohe Übereinstimmung mit diesen Befunden. In der Studie von Burkhard et al. (Burkhard et al. 2006) zeigten insgesamt 75% von 160, bei Hein et al. (Hein et al. 2011) 79% von 347 und bei Ihnen et al. (Ihnen et al. 2008) 95% von 162 untersuchten Mammagewebe eine ALCAM-Expression. Eine weitere Studie von Ihnen et al. (Ihnen et al. 2010) wies bei 96% von 84 untersuchten Fällen eine ALCAM-Positivität auf.

Die vorliegende Arbeit macht einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem ALCAM-Verlust und einer schlechten Prognose deutlich. Diese Erkenntnis deckt sich ebenfalls mit verschiedenen anderen Studien (King et al. 2004; Milde-Langosch et al. 2008; Davies und Jiang 2010). Da ALCAM als Zelladhäsionsmolekül eine wichtige Rolle für den Zusammenhalt der Zellen mit der umliegenden Struktur hat, ist es ohne Weiteres denkbar, dass ein ALCAM-Verlust eine gesteigerte Zellmigration bis hin zur Metastasierung begünstigt.

Allerdings finden sich auch einige Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dem Verlust von ALCAM und einer schlechten Prognose erkannten. Piao et al. (Piao et al.

2012) beschrieben einen Zusammenhang zwischen hoher membranöser ALCAM-Expression und einem schlechteren klinischen Verlauf sowie eine Assoziation von hoher zytoplasmatischer Expression mit hoher Rezidivrate. Hein et al. (Hein et al. 2011) fanden einen Zusammenhang zwischen einer hohen ALCAM-Expression und einer niedrigen Überlebensrate verglichen zu den Patientinnen mit einer niedrigen/mäßigen ALCAM-Expression. Burkhard et al. (Burkhard et al. 2006) berichten über einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer starken zytoplasmatischen ALCAM-Expression und einer frühen Tumormetastasierung im Mammakarzinom. Eine Korrelation zwischen der membranösen ALCAM-Expression und klinisch-pathologischen Daten gab es in dieser Studie aber nicht. Ihnen et al. (Ihnen et al. 2008) erkannten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der ALCAM-Expression und dem histologischen Typ, Differenzierungsgrad und dem Tumorstadium. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die in den meisten Studien geringe Zahl der untersuchten Patienten, die zwischen 56 und 347 lag (King et al. 2004; Burkhardt et al. 2006; Jezierska et al. 2006, Milde-Langosch et al. 2008; Piao et al. 2012).

Weiterhin wurden unterschiedliche Untersuchungsmethoden verwendet. Einige Studien benutzen zur Bestimmung von ALCAM die Western-Blot-Methode, Real-Time-PCR (King et al. 2004) oder IHC (Burkhardt et al. 2006; Ihnen et al. 2008; Ihnen et al. 2010; King et al. 2010). Auch dies könnte zu unterschiedlichen Resultaten beigetragen haben. Nur die Immunhistochemie erlaubt die selektive Untersuchung von Tumorzellen. Die IHC ist somit von den genannten Untersuchungen theoretisch die genaueste Methode. Allerdings wurden in den IHC-Studien unterschiedliche Antikörper und Färbeprotokolle verwendet, was die Vergleichbarkeit der Daten kompromittiert.

Um eine genaue Aussage über die Prognose und Ansprache auf Therapie machen zu können, bedarf es zusätzlich prädiktiver und prognostischer Parameter. Es gibt bereits mehrere Multigentests, welche die mögliche Rezidivwahrscheinlichkeit besser abschätzen können als histologische und klinische Parameter alleine. Dazu gehört beispielsweise der sog. OncotypeDX®-Test. Patientinnen mit besonders geringer Rezidivrate sollten durch den Test unnötige weitere Therapien, wie z.B. eine Chemotherapie, erspart werden (Paik et al. 2004; Glas et al. 2006). In diesem Test wird an dem entnommenen Gewebe (z.B. durch Mastektomie oder Stanze) die Expression von insgesamt 21 Genen überprüft. Anhand dieser Daten wird das „Recurrence-

Score®-Ergebnis“ ermittelt und somit das individuelle Risiko eines Rückfalls berechnet. Dieser Wert kann bei der weiteren Therapieentscheidung helfen. Ist der Wert hoch, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu erleiden, und daher eine weitere Therapie eher empfohlen. Studien zeigten, dass 48% von 20.050 getesteten Patientinnen mit niedrigem Recurrence Score nur einen minimalen Prognosevorteil von einer adjuvanten Chemotherapie hatten (Paik et al. 2006; Sparano und Paik 2008).

Andererseits zeigen aktuelle Literaturdaten gar keinen oder nur einen geringen Vorteil bei ungefähr bis zu 77% der Patientinnen mit Mammakarzinom nach einer adjuvanten Chemotherapie, auch wenn sie vorher nicht „Onkotype-getestet“ worden sind (Calson et al. 2013).

Von potentiellem Interesse ist auch die Tatsache, dass ALCAM membranös exprimiert wird und somit als Zielstruktur für eine Antikörper-Therapie dienen könnte. Wiiger et al. (Wiiger et al. 2010) beschrieben einen menschlich rekombinanten Einzel-Ketten-Antikörper gegen ALCAM, der in der Lage war, die Zellinvasion in vitro und das Tumorwachstum in vivo zu inhibieren. Weiterhin berichteten Liu et al. (Liu et al. 2007) von einem Einzel-Ketten Antikörper, der ALCAM im Prostatakarzinom als Zielstruktur benutzt. Mithilfe von Immunliposomen sind die Antikörper in der Lage, durch Medikamente in das Zielgewebe, in diesem Fall in das Prostatakarzinom, zu gelangen (Roth et al. 2007).

Insgesamt zeigen unsere Daten, dass der Verlust von ALCAM in den untersuchten Gewebeproben des Mammakarzinoms einen ungünstigen klinischen Verlauf und somit eine ungünstige Prognose aufweist. Die prognostische Relevanz ist für ALCAM allein nicht sehr groß, die Messung der ALCAM-Expression könnte aber für zukünftige multifaktorielle Mammakarzinom-Tests von Interesse sein. Falls sich ALCAM als Therapieziel durchsetzen sollte, könnten hiervon wahrscheinlich viele Mammakarzinom-Patientinnen profitieren.

Zusammenfassung

Das in dieser Arbeit untersuchte Zelladhäsionsmolekül ALCAM wird nicht nur physiologisch in unterschiedlichen Organen und Zellen gebildet, sondern konnte bereits in vielen Tumoren nachgewiesen werden (Burkhardt et al. 2006). Veränderungen im ALCAM-Expressionsverhalten spielen dabei in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle. Bis jetzt konnte eine Korrelation zwischen einer ungünstigen Prognose und der vermehrten ALCAM-Expression im Neuroblastom (Corrias et al. 2010), im malignem Melanom, im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Verma et al. 2005), im Pankreaskarzinom (Kahlert et al. 2009) und im kolorektalem Karzinom (Weichert et al. 2004) festgestellt werden. Hinsichtlich der Auswirkung der ALCAM-Expression auf das Mammakarzinom ist sich die Wissenschaft noch uneinig. Einige Studien zeigten eine vermehrte Korrelation zwischen einer erhöhten ALCAM-Expression und einer schlechteren Prognose (Burkhardt et al. 2006; Piao et al. 2012), und in anderen Studien wiederum wurden niedrige ALCAM-Expressionen einem klinisch ungünstigen Verlauf zugeordnet (King et al. 2004; Milde-Langosch et al. 2008; Davies und Jiang 2010). Ziel dieser Arbeit war es, vor dem Hintergrund der gegensätzlichen Ansichten die Rolle von ALCAM für das Mammakarzinom bezüglich der Prävalenz und Prognose an einem besonders großen Patientenkollektiv abzuklären. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von ALCAM in über 2000 Gewebeproben von Mammakarzinomen immunhistochemisch untersucht. Eine negative Färbung war in 210 (11,8%), eine schwache Färbung in 197 (11,1%), eine mäßige in 194 (10,9%) und eine starke ALCAM-Färbung in 1177 (66,2%) der insgesamt 1.778 Tumoren nachweisbar. In gesundem Brustgewebe konnte eine moderate bis starke ALCAM-Expression festgestellt werden, so dass gefolgert werden kann, dass in einem Teil der Tumoren ein Expressionsverlust vorliegt. Eine niedrige oder fehlende ALCAM-Expression war mit einer fortgeschrittenen Tumorgroße ($p=0,0017$), einem ungünstigen Tumorgrad ($p<0,0001$), einem negativem ER- und PR-Status ($p<0,0001$) und auch mit einem hohen Ki-67-Labeling Index ($p<0,0001$) assoziiert. Tumoren, die einen Verlust der ALCAM-Expression aufwiesen, zeigten eine schlechtere Gesamtüberlebensrate ($p<0,0001$), eine schlechtere tumorspezifische Überlebensdauer ($p=0,0088$) und einen positiven Lymphknotenstatus.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ALCAM sowohl in gesundem als auch

in kanzerösem Brustgewebe exprimiert wird und der Verlust von ALCAM bzw. eine reduzierte Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht.

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Atypische duktale Hyperplasie
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
ATM	Ataxie-Teleangiektasie-Syndrom
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA	Breast Cancer Gen
CAM	Cell adhesion molecule
CD 166	Cluster of differentiation 166
CIS	Carcinoma in situ
CLIS	Lobuläres Carcinoma in situ
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Cooperative Group
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epidermal Growth Faktoren
ER	Östrogenrezeptor
F(ab)	Fragment antigen binding
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
G	Grading
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsgesellschaft in Deutschland
HE-Färbungen	Hämatoxylin-Färbungen
HER2/neu	Human epidermal growth factor 2
IARC	International Association on Research of Cancer
IHC	Immunhistochemie
Ig-CAM	Immunglobulinen-Superfamilie
Kb	Kilobase
Ki-67	Kiel-67
LI	Labeling Index
MEMD	Melanoma-metastazing clone D
MMP	Matrix-Metalloproteinase

N-CAM	Neuralzelladhäsionsmolekül
NOS	Not Otherwise Specified
PR	Progesteronrezeptor
P53	Protein 53
RKI	Robert Koch-Institut
TBST	Tris Bufferet Saline (gepufferte Kochsalzlösung)
TDLE	Terminale duktulolubuläre Einheit
TMA	Tissue Micro Arrays
UICC	Union International Contre le Cancer

Literaturverzeichnis

Abu Hashim, H. (2014). Potential role of aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis. *Int J Womens Health* 6: 671-680.

Afonso, N. und **Bouwman**, D. (2008). Lobular carcinoma in situ. *Eur J Cancer Prev* 17(4): 312-316.

Albert, U. S., Altland, H., Duda, V., Engel, J., Geraedts, M., Heywang-Kobrunner, S., Holzels, D., Kalbheim, E., Koller, M., König, K., Kreienberg, R., Kuhn, T., Lebeau, A., Nass-Griegoleit, I., Schlake, W., Schmutzler, R., Schreier, I., Schulte, H., Schulz-Wendtland, R., Wagner, U. und Kopp, I. (2009). 2008 update of the guideline: early detection of breast cancer in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(3): 339-354.

Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Kochli, O., Zuber, M., Dieterich, H., Mross, F., Wilber, K., Simon, R. und Sauter, G. (2004). Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res* 64(23): 8534-8540.

Ball, S., Arolker, M. und Purushotham, A. D. (2001). Breast cancer, Cowden disease and PTEN-MATCHS syndrome. *Eur J Surg Oncol* 27(6): 604-606.

Battifora, H. (1986). The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55(2): 244-248.

Birch, J. M., Hartley, A. L., Tricker, K. J., Prosser, J., Condie, A., Kelsey, A. M., Harris, M., Jones, P. H., Binchy, A., Crowther, D. et al. (1994). Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54(5): 1298-1304.

Bowen, M. A. und **Aruffo**, A. (1999). Adhesion molecules, their receptors, and their regulation: analysis of CD6-activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) interactions. *Transplant Proc* 31(1-2): 795-796.

Burkhardt, M., Mayordomo, E., Winzer, K. J., Fritzsche, F., Gansukh, T., Pahl, S., Weichert, W., Denkert, C., Guski, H., Dietel, M. und Kristiansen, G. (2006). Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. *J Clin Pathol* 59(4): 403-409.

Carter, C. L., Allen, C. und Henson, D. E. (1989). Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63(1): 181-187.

Cavallaro, U. und **Christofori**, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4(2): 118-132.

Corrias, M. V., Gambini, C., Gregorio, A., Croce, M., Barisione, G., Cossu, C., Rossello, A., Ferrini S. und Fabbi, M. (2010). Different subcellular localization of ALCAM molecules in neuroblastoma: Association with relapse. *Cell Oncol* 32(1-2): 77-86.

Dahabreh, I. J., Linardou, H., Siannis, F., Fountzilas, G. und Murray, S. (2008). Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist* 13(6): 620-630.

Davies, S. und **Jiang**, W. G. (2010). ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule, influences the aggressive nature of breast cancer cells, a potential connection to bone metastasis. *Anticancer Res* 30(4): 1163-1168.

De Abreu, F. B., Schwartz, G. N., Wells, W. A. und Tsongalis, G. J. (2014). Personalized therapy for breast cancer. *Clin Genet* 86(1): 62-67.

De Medina, P., Silvente-Poirot, S. und Poirot, M. (2009). Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* 5(7): 1066-1067.

Dunnwald, L. K., Rossing, M. A. und Li, C. I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 9(1): R6.

EBCTCG (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365(9472):1687-1717.

Edge, S. B., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F. L., Trotti, A. (Eds.) (2009). *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. Springer, New York, 419-460.

Elston, C. W. und **Ellis**, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19(5): 403-410.

Ferlay J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2013). *GLOBOCAN 2012 v 1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. *Int J Cancer* 132(5): 1133-45.

Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R. G., Deutsch, M., Fisher, E. R., Jeong, J. H. und Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 347(16): 1233-1241.

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. und Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31(1): 13-20.

Glas, A. M., Floore, A., Delahaye, L. J., Witteveen, A. T., Pover, R. C., Bakx, N., Lahiti-Domenici, J. S., Bruinsma, T. J., Warmoes, M. O., Bernards, R., Wessels, L. F., Van't Veer, L. J. (2006). Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC genomics* 7: 278.

Glick, J. H., Gelber, R. D., Goldhirsch, A. und Senn, H. J. (1993). Adjuvant therapy of primary breast cancer: closing summary. *Recent Results Cancer Res* 127: 289-300.

Goldberg, J. I. und **Borgen**, P. I. (2006). Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 6(8): 1205-1214.

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84(3): 345-357.

Hanahan, D. und **Weinberg**, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.

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(2): 347-360.

Houssami, N., Macaskill, P., Marinovich, M., L., Dixon, J. M., Irwig, L., Brennan, M. E. und Solin, L. J. (2010). Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer* 46(18): 3219-3232.

Ihnen, M., Muller, V., Wirtz, R. M., Schroder, C., Krenkel, S., Witzel, I., Lisboa, B. W., Janicke, F. und Milde-Langosch, K. (2008). Predictive impact of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 112(3): 419-427.

Ihnen, M., Kohler, N., Kersten, J. F., Milde-Langosch, K., Beck, K., Holler, S., Muller, V., Witzel, I., Janicke, F. und 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(2): 71-78.

Jezierska, A., Olszewski, W. P., Pietruszkiewicz, J., Olszewski, W., Matysiak, W. und Motyl, T. (2006). Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) is associated with suppression of breast cancer cells invasion. *Med Sci Monit* 12(7): BR245-256.

Kahlert, C., Weber, H., Mogler, C., Bergmann, F., Schirmacher, P., Kenngott, H. G., Mattern, U., Mollberg, N., Rahbari, N. N., Hinz, U., Koch, M., Aigner, M. und Weitz, J. (2009). Increased expression of ALCAM/CD166 in pancreatic cancer is an independent prognostic marker for poor survival and early tumour relapse. *Br J Cancer* 101(3): 457-464.

Karakas, C. (2011). Paget's disease of the breast. *J Carcinog* 10: 31.

Kelsey, J. L., Gammon, M. D. und John, E. M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15(1): 36-47.

Kilic, E., Milde-Langosch, K., Muller, V., Wirtz, R. und Ihnen, M. (2008). Expression of activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer. Predictability of the response to taxane-free chemotherapy. *Pathologe* 29 (2): 347-352.

King, J. A., Ofori-Acquah, S. F., Stevens, T., Al-Mehdi, A. B., Fodstad, O. und Jiang, W. G. (2004). Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res Treat* 6(5): R478-487.

King, J. A., Tan, F., Mbeunkui, F., Chambers, Z., Cantrell, S., Chen, H., Alvarez, D., Shevde, L. A. und Ofori-Acquah, S. F. (2010). Mechanisms of transcriptional regulation and prognostic significance of activated leukocyte cell adhesion molecule in cancer. *Mol Cancer* 9: 266.

Kiryushko, D., Bock, E. und Berezin, V. (2007). Pharmacology of cell adhesion molecules of the nervous system. *Curr Neuropharmacol* 5(4): 253-267.

Kobayashi, H., Ohno, S., Sasaki, Y. und Matsuura, M. (2013). Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). *OncolRep* 30(3): 1019-1029.

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M. J., Sauter, G. und Kallioniemi, O. P. (1998). Tissue micro-

arrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4(7): 844-847.

Leitlinienprogramm Onkologie (Hrsg.) (2012). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie, Berlin

Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396(6712): 643-649.

Liotta, L. A., Stetler-Stevenson, W. G. und Steeg, P. S. (1991). Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest* 9(5): 543-551.

Liu, B., Conrad, F., Roth, A., Drummond, D. C., Simko, J. P. und Marks, J. D. (2007). Recombinant full-length human IgG1s targeting hormone-refractory prostate cancer. *J Mol Med* 85(10): 1113-1123.

Love, R. R. und Koroltchouk, V. (1993). Tamoxifen therapy in breast cancer control worldwide. *Bull World Health Organ* 71(6): 795-803.

Lunter, P. C., van Kilsdonk, J. W., van Beek, H., Cornelissen, I. M., Bergers, M., Willems, P. H., van Muijen, G. N. und 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(19): 8801-8808.

Martin, T. A. und Jiang, W. G. (2001). Tight junctions and their role in cancer metastasis. *Histol Histopathol* 16(4): 1183-1195.

Masedunskas, A., King, J. A., Tan, F., Cochran, R., Stevens, T., Sviridov, D. und Ofori-Acquah, S. F. (2006). Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett* 580(11): 2637-2645.

McSherry, E. A., Donatello, S., Hopkins, A. M. und McDonnell, S. (2007). Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 64(24): 3201-3218.

Merseburger, A. S., Horstmann, M., Hennenlotter, J., Stenzl, A. und Kuczyk, M. (2003). Die Tissue-Microarray-Technik als neues „high throughput-tool“ für den Nachweis differentieller Proteinexpression. *J Urol Urogynaekol* 10(3):5-8.

Mezzanzanica, D., Fabbi, M., Bagnoli, M., Staurengo, S., Losa, M., Balladore, E., Alberti, P., Lusa, L., Ditto, A., Ferrini, S., Pierotti, M. A., Barbareschi, M., Pilotti, S. und Canevari, S. (2008). Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 14(6): 1726-1733.

Miccichè, F., Da Riva, L., Fabbi, M., Pilotti, S., Mondellini, P., Ferrini, S., Canevari, S., Pierotti, M. A. und Bongarzone, I. (2011). Activated leukocyte cell adhesion molecule expression and shedding in thyroid tumors. *PLoS One* 6(2): e17141.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266(5182): 66-71.

Milde-Langosch, K., Janke, S., Wagner, I., Schroder, C., Streichert, T., Bamberger, A. M., Janicke, F. und Loning, T. (2008). Role of Fra-2 in breast cancer: influence on tumor cell invasion and motility. *Breast Cancer Res Treat* 107(3): 337-347.

Missmer, S. A., Eliassen, A. H., Barbieri, R. L. und Hankinson, S. E. (2004). Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 96(24): 1856-1865.

Nahta, R. und **Esteve**, F. J. (2006). Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 232(2): 123-138.

Narod, S. A. (2011). Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8(11): 669-676.

Nothacker, M., Duda, V., Hahn, M., Warm, M., Degenhardt, F., Madjar, S., Weinbrenner, S. und Albert, U. S. (2009). Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. A systematic review. *BMC Cancer* 9: 335.

Ofori-Acquah, S. F. und King, J. A. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res* 151(3): 122-128.

Ohneda, O., Ohneda, K., Arai, F., Lee, J., Miyamoto, T., Fukushima, Y., Dowbenko, D., Lasky, L. A. und Suda, T. (2001). ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 98(7): 2134-2142.

Ottesen, G. L. (2003). Carcinoma in situ of the female breast. A clinico-pathological, immunohistological, and DNA ploidy study. *APMIS Suppl* 108 1-67.

Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., Baehner, F. L., Walker, M. G., Watson, D., Park, T., Hiller, W., Fisher, E. R., Wickerham, D. L., Bryant, D., und Wolmark, N. (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351(27): 2817-2826.

Paik, S., Tang, G., Shak, S., Kim, C., Baker, J., Kim, W., Cronin, M., Baehner, F. L., Watson, D., Bryant, J., Costantino, J. P., Geyer, C. E. Jr., Wickerham, D. L. und Wolmark, N. (2006). Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24(23): 3726-3734.

Piao, D., Jiang, T., Liu, G., Wang, B., Xu, J. und Zhu, A. (2012). Clinical implications of activated leukocyte cell adhesion molecule expression in breast cancer. *Mol Biol Rep* 39(1): 661-668.

Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42(4): 405-426.

RKI und GEKID (Hrsg.) (2013). *Krebs in Deutschland*. 9.Aufl. rucksaldruck, Berlin

Robbins, P., Pinder, S., de Klerk, N., Dawkins, H., Harvey, J., Sterrett, G., Ellis, I. und Elston, C. (1995). Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 26(8): 873-879.

Robertson, F. M., Bondy, M., Yang, W., Yamauchi, H., Wiggins, S., Kamrudin, S., Krishnamurthy, S., Le-Petross, H., Bidaut, L., Player, A. N., Barsky, S. H., Woodward, W. A., Buchholz, T., Lucci, A., Ueno, N. T. und Cristofanilli, M. (2010). Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin* 60(6): 351-375.

Roth, A., Drummond, D. C., Conrad, F., Hayes, M. E., Kirpotin, D. B., Benz, C. C., Marks, J. D., und Liu, B. (2007). Anti-CD166 single chain antibody-mediated intracellular delivery of liposomal drugs to prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6(10): 2737-2746.

Royo-Bordonada, M. A., Martin-Moreno, J. M., Guallar, E., Gorgojo, L., van't Veer, P., Mendez, M., Huttunen, J. K., Martin, B. C., Kardinaal, A. F., Fernandez-Crehuet, J., Thamm, M., Strain, J. J., Kok, F. J. und Kohlmeier, L. (1997). Alcohol intake and risk of breast cancer: the euramic study. *Neoplasma* 44(3): 150-156.

Ruiz, C., Seibt, S., Al Kuraya, K., Siraj, A. K., Mirlacher, M., Schraml, P., Maurer, R., Spichtin, H., Torhorst, J., Popovska, S., Simon, R. und Sauter, G. (2006). Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 118(9): 2190-2194.

Sainsbury, J. R., Anderson, T. J. und Morgan, D. A. (2000). ABC of breast diseases: breast cancer. *BMJ* 321(7263): 745-750.

Sawhney, M., Matta, A., Macha, M. A., Kaur, J., DattaGupta, S., Shukla, N. K. und Ralhan, R. (2009). Cytoplasmic accumulation of activated leukocyte cell adhesion molecule is a predictor of disease progression and reduced survival in oral cancer patients. *Int J Cancer* 124(9): 2098-2105.

Schiavon, G. und **Smith**, I. E. (2014). Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res* 16(2): 206.

Simon, R., Mirlacher, M., Sauter, G. (2004). Tissue microarrays. *Biotechniques* 36(1): 98-105.

Simon, R., Mirlacher, M., Sauter, G. (2005). Tissue microarrays. *Methods Mol Med* 114: 257-268.

Singletary, S. E. (2003). Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg* 237(4): 474-482.

Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Yaun, S. S., van den Brandt, P. A., Folsom, A. R., Goldbohm, R. A., Graham, S., Holmberg, L., Howe, G. R., Marshall, J. R., Miller, A. B., Potter, J. D., Speizer, F. E., Willett, W. C., Wolk, A. und Hunter, D. J. (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 279(7): 535-540.

Sparano, J. A. und **Paik**, S. (2008). Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 26(5): 721-728.

Spielmann, M., Roche, H., Delozier, T., Canon, J. L., Romieu, G., Bourgeois, H., Extra, J. M., Serin, D., Kerbrat, P., Machiels, J. P., Lortholary, A., Orfeuvre, H., Campone, M., Hardy-Bessard, A. C., Coudert, B., Maerevoet, M., Piot, G., Kramar, A., Martin, A. L. und Penault-Llorca, F. (2009). Trastuzumab for patients with axillary-node-positive breast cancer: results of the FNCLCC-PACS 04 trial. *J Clin Oncol* 27(36): 6129-6134

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(6): 313-321.

Tomita, K., van Bokhoven, A., Jansen, C. F., Bussemakers, M. J. und Schalken, J. A. (2000). Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 267(3): 870-874.

Truong, P. T., Olivotto, I. A., Whelan, T. J., Levine, M., Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast (2004). Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 16. Locoregional post-mastectomy radiotherapy. *CMAJ* 170(8): 1263-1273.

Van Dongen, J. A., Voogd, A. C., Fentiman, I. S., Legrand, C., Sylvester, R. J., Tong, D., van der Schueren, E., Helle, P. A., van Zijl, K. und Bartelink, H. (2000). Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial. *J Natl Cancer Inst* 92(14): 1143-1150.

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(3): 769-774.

Van Lier, M. G., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E. M., Kuipers, E. J., Steyerberg, E. W. und van Leerdam, M. E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol* 105(6): 1258-1264, author reply 1265.

Verma, A., Shukla, N. K., Deo, S. V., Gupta, S. D. und Ralhan, R. (2005). MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 68(4-6): 462-470.

Viani, G. A., Afonso, S. L., Stefano, E. J., De Fendi, L. I. und Soares, F. V. (2007). Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. BMC Cancer 7: 153.

Weichert, W., Knosel, T., Bellach, J., Dietel, M. und Kristiansen, G. (2004). ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. J Clin Pathol 57(11): 1160-1164.

Weidle, U. H., Eggle, D., Klostermann, S. und Swart, G. W. (2010). ALCAM/CD166: cancer-related issues. Cancer Genomics Proteomics 7(5): 231-243.

Weigelt, B., Peterse, J. L. und van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. Nat Rev Cancer 5(8): 591-602.

Welsch, U. (Hrsg.) (2006). Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. überarb. Aufl. Urban&Fischer, München

Weyerstahl, T. und **Stauber**, M. (2013). Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. vollständ. überarb. Aufl. Thieme, Stuttgart

Wiiger, M. T., Gehrken, H. B., Fodstad, O., Maelandsmo, G. M. und 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(11): 1665-1674.

Yin, W., Jiang, Y., Shen, Z., Shao, Z. und Lu, J. (2011). Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. PLoS One 6(6): e21030.

Danksagung

Herrn **Professor Dr. G. Sauter**, Direktor des Instituts für Pathologie Hamburg-Eppendorf, danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die umsichtige wissenschaftliche Unterstützung.

Besonders danke ich Herrn **Dr. E.-C. Burandt** für die sehr gute Betreuung, die unermüdliche Hilfsbereitschaft und die Beurteilung der Tumoren.

Außerdem danke ich Frau **Christina Koop** für die stets liebevolle und freundliche Hilfe und Unterstützung.

Weiterhin danke ich Herrn **Dr. R. Simon** für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie bedanke ich mich für die kollegiale Atmosphäre und die nette Aufnahme.

Meiner Familie danke ich aufrichtig und aus tiefstem Herzen für die Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir täglich geben. Und natürlich danke ich meinem Ehemann für seine bedingungslose Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Publikation

Eike Burandt, **Tanaz Bari Noubar**, Annette Lebeau, Sarah Minner, Christoph Burdelski, Fritz Jänicke, Vollkmar Müller, Ronald Simon, Guido Sauter, Waldemar Wilczak, Alexander Quaas (2014): Loss of ALCAM-expression is linked to adverse phenotype and poor prognosis in breast cancer. A TMA-based immunohistochemical study on 2197 breast cancer patients. *Oncol Rep* 32(6): 2628-2634.

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 einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes 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.

Unterschrift: