

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München**

Klinikum rechts der Isar

und

Institut für Pathologie des GSF-Forschungszentrums München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

Etablierung der PLA-Technik an Paraffingewebe von

Mammakarzinomen:

Identifizierung von PTK6 co-exprimierten

Proteinen und ihre medizinische Relevanz

Katharina Stering

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. M. M. Aubele

2. Univ.- Prof. Dr. H. K. Höfler

Die Dissertation wurde am 26.09.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	7
1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms	7
1.2 Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs.....	8
1.2.1 Familienanamnese.....	9
1.2.2 Schwangerschaft.....	9
1.2.3 Menarche und Menopause	10
1.2.4 Östrogentherapie	10
1.2.5 Lifestyle.....	11
1.3 Prognosefaktoren.....	12
1.3.1 pTNM- Status.....	12
1.3.2 Steroidhormonrezeptorstatus.....	13
1.3.3 Histopathologie.....	15
1.4 Her2/neu (Erb-B2).....	15
1.4.1 Bestimmung des Her2/neu- Rezeptorstatus.....	16
1.4.2 Therapie mit Her2/neu- Antagonisten.....	17
1.5 PTK 6 (Breast Tumour Kinase; brk).....	18
2 ZIELSETZUNG.....	19
3 MATERIAL.....	21
3.1 Klinische Daten zu den Fällen.....	21
3.2 Paraffinschnitte.....	21
3.3 Zelllinie.....	22
3.4 Antikörper.....	22
3.5 Duolink in situ PLA.....	22
4 METHODE.....	23
4.1 Tissue Microarrays.....	23
4.2 IHC + Ventana.....	24
4.3 PLA (Proximity Ligation Assay).....	25
4.3.1 Ablauf der PLA.....	25
4.4 Methodische Herausforderungen	28
4.5 Zelllinie.....	29

4.6 Axio Imager	29
4.7 Definiens- Software.....	30
4.8 Methodische Herausforderungen	30
4.8.1 Variable Schnittdicken	31
4.8.2 Lichtempfindlichkeit der Präparate.....	31
5 STATISTIK.....	33
5.1 Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient.....	33
5.2 Kaplan- Meier- Methode.....	33
5.3 Log-Rang- χ^2 -Test.....	34
5.4 Multivariate Analyse/ Cox Proportional Hazards.....	34
5.5 Ergebnisse an Tumorgeweiben	34
5.5.1 Korrelation der PLA- Ergebnisse.....	35
5.5.2 Korrelation der PLA mit IHC.....	35
5.5.3 Korrelation der PLA mit klinisch- histologischen Parametern.....	36
5.6 Korrelation der Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen.....	36
5.6.1 Univariate Analyse.....	36
5.6.2 Multivariate Analyse.....	38
6 ERGEBNISSE.....	41
6.1 Methodische Ergebnisse.....	41
6.1.1 Aufbringung der Schnitte auf die Objektträger.....	41
6.1.2 Begrenzung des Reaktionsvolumens.....	41
6.1.3 Vorbehandlung in der Mikrowelle.....	42
6.1.4 Variation der Inkubationszeit beim Blocken.....	43
6.1.5 Variation der Inkubationszeit bei der Amplifikation.....	45
6.1.6 Vergleich unterschiedlicher Detection Kits.....	49
6.1.7 Verifizierung der Methode	50
6.2 Ergebnisse an Tumorgeweiben	51
6.2.1 Korrelation der PLA- Ergebnisse.....	52
6.2.2 Korrelation der PLA mit IHC.....	52
6.2.3 Korrelation der PLA mit klinisch- histologischen Parametern.....	52
6.3 Korrelation der Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen.....	53
6.3.1 Univariate Analyse.....	53

6.3.2 Multivariate Analyse.....	62
7 DISKUSSION.....	63
8 ZUSAMMENFASSUNG.....	72
9 LITERATURVERZEICHNIS.....	75
10 ANHANG.....	83
10.1 Klinische Daten zu den Patientinnen.....	83
10.2 pTNM- Klassifikation	83
10.2.1 WHO- Klassifikation invasiver Mammakarzinome (WHO 2003).....	84
10.3 Reagenzien.....	86
10.4 Protokoll IHC (Ventana Medical Systems Inc., USA).....	87
10.5 Protokoll PLA.....	88
11 DANKSAGUNG.....	91
12 LEBENSLAUF.....	93

1 EINLEITUNG

1.1 *Epidemiologie des Mammakarzinoms*

Das Mammakarzinom stellt weltweit mit 26% aller weiblichen malignen Tumore die häufigste Krebserkrankung der Frau dar. Sehr selten, in ca. 1% der Fälle, kommt es zur malignen Entartung der Brustdrüse beim Mann. In Deutschland liegt der Anteil der jährlichen Neuerkrankungen an Brustkrebs bei 32,1 % aller Krebserkrankungen. Beim Mann steht das Prostatakarzinom an der Spitze aller Krebserkrankungen mit einem Anteil von 25,7 % (Robert Koch- Institut, 2012).

Im Durchschnitt erkrankt jede 8. bis 10. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, Tendenz steigend. 2008 traten in Deutschland 71 660 Neuerkrankungen auf, für 2012 geht die Prognose von 74 000 neuen Fällen aus. 17 209 Frauen starben 2008 in Folge ihrer Brustkrebserkrankung. Die 5- Jahres- Überlebens- Rate liegt bei rund 86 % (Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut, www.krebsdaten.de).

Der Erkrankungsgipfel des Mammakarzinoms liegt zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr, Erkrankungen vor dem 30. Lebensjahr sind selten und haben meist hereditäre Ursachen (www.onkodin.de, Epidemiologie des Mammakarzinoms, Regierer, Possinger). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren (Janni 2008). Allerdings muss festgehalten werden, dass jede vierte Betroffene bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre ist, jede zehnte sogar jünger als 45 (Krebs in Deutschland 2007/08, eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch- Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 8. Ausgabe, 2012). Weltweit ist eine Abnahme der Mortalität festzustellen, was vermutlich auf eine starke Zunahme von Vorsorgeuntersuchungen sowie die verbesserte adjuvante systemische Therapie zurückzuführen ist (Bauernfeind 2011).

1.2 Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs

Der Großteil aller Mammakarzinome tritt sporadisch auf, nur bei wenigen (um die 5 %) finden sich familiär vererbte, genetische Ursachen. Zu den häufigsten dieser genetischen Ursachen zählen Mutationen im BRCA 1- und BRCA 2- Gen, den sogenannten breast cancer- genes, welche generell für eine familiäre Häufung gynäkologischer Tumore verantwortlich gemacht werden können. BRCA 1 und BRCA 2 sind als Tumorsuppressorgene an der DNA- Reparatur beteiligt (Bauernfeind 2011). 1994 konnte BRCA 1 von Miki et al. auf Chromosom 17q21 lokalisiert werden. Patientinnen mit Mutation in BRCA 1 haben ein Lebenszeitrisiko von 60 bis 85 %, an Brustkrebs zu erkranken. Das Erkrankungsrisiko für Ovarialkarzinome liegt bei 40 bis 60 %. (Lalloo et al. 2012). Trägerinnen einer BRCA 1- Mutation erkranken zudem früher, das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in der 4. Dekade (Bauernfeind 2011). Mammakarzinome, die auf eine Mutation im BRCA 1- Gen zurückzuführen sind, sind meist triple- negativ, d.h. sie weisen einen negativen Hormonrezeptorstatus und eine fehlende Überexpression von Her2/neu auf, außerdem sind sie häufig schlecht differenziert (histologischer Grad G 3) (Bauernfeind 2011).

BRCA 2 wurde 1995 erstmals von Wooster et al. geklont. Es liegt auf Chromosom 13q13 und ist an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA beteiligt (Bauernfeind 2011). Trägerinnen einer BRCA 2- Mutation weisen ein Lebenszeitrisiko von 70 bis 80 % für Mammakarzinome und 25 % für Ovarialkarzinome auf (Bauernfeind 2011). Bei Ausbruch der Erkrankung sind sie in der Regel älter als Trägerinnen einer BRCA 1- Mutation. Die auftretenden Karzinome ähneln meist den sporadischen Mammakarzinomen. Sie weisen häufig einen positiven Hormonrezeptorstatus und ein höheres Grading auf (Lalloo et al. 2012). Prognostisch sind BRCA 2- Mutationen günstiger als BRCA 1- Mutationen.

Seltene Mutationen wie das Li- Fraumeni- Syndrom, bei dem eine Mutation des Tumorsuppressorgens p 53 vorliegt, führen ebenfalls zu einem gehäuften Auftreten von Brustkrebs.

Bei den sporadisch auftretenden Mammakarzinomen fallen neben der positiven Familienanamnese, also bei erkrankten Verwandten, und Ernährung und Lebensstil noch weitere endogene und exogene hormonelle Einflussfaktoren ins Gewicht. Zu den endogenen Risikofaktoren zählen neben der positiven Familienanamnese die frühe Menarche und die späte Menopause, zu den exogenen die Einnahme östrogenhaltiger oraler Kontrazeptiva sowie die Hormonersatztherapie mit Östrogenen (Kiechle 2007).

1.2.1 Familienanamnese

Bei ca. 5 bis 10 % aller Mammakarzinome liegt eine genetische Veranlagung vor. Das Erkrankungsrisiko ist für Patientinnen mit Familienangehörigen ersten Grades mit Mammakarzinom signifikant erhöht. Das Risiko steigt mit der Anzahl an erkrankten Verwandten ersten Grades. Das höchste Risiko besteht für Patientinnen mit Angehörigen ersten Grades, welche bei Erkrankungsbeginn unter 40 Jahre alt waren (Nelson et al. 2012).

1.2.2 Schwangerschaft

Frauen mit mehr als 3 ausgetragenen Schwangerschaften zeigen im Vergleich mit Nullipara ein niedrigeres Risiko für die Entstehung von Brustkrebs. Auch das Alter bei der Geburt des ersten Kindes scheint einen Einfluss auf die Entstehung von Brustkrebs zu haben. In 5 Studien konnte ein erhöhtes Risiko für Erstgebärende über 30 Jahre festgestellt werden (Nelson et al. 2012). 2011 wiesen Newcomb et al. in einer Fall- Kontroll- Studie ein 2,4- fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von lobulären Mammakarzinomen bei Erstgebärenden ≥ 30 Jahre im Vergleich zu Erstgebärenden ≤ 20 Jahren (Newcomb et al. 2011).

Verantwortlich für die Abhängigkeit des Krebsrisikos vom Alter bei der ersten Geburt sind vermutlich 2 verschiedene Typen von Stammzellen, welche in der weiblichen Brustdrüse vorhanden sind. Bei Eintreten einer Schwangerschaft leiten Stammzellen Typ 2 eine weitere Differenzierung des Brustdrüsengewebes ein (Russo et al 2005). Diese weitere Differenzierung hat möglicherweise eine Schutzfunktion gegenüber kanzerogenen Prozessen. Bei Schwangerschaften in jungem Alter tritt diese

Differenzierung früher ein, was das verminderte Risiko für die Entstehung von Brustkrebs bei Schwangerschaft in jungen Jahren erklären kann (Russo et al. 2005).

1.2.3 Menarche und Menopause

Ebenso kommen dem Alter bei Eintritt von Menarche und Menopause eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs zu. Ein Alter von über 15 Jahren bei Eintritt der Menarche geht mit einem reduzierten Risiko zur Entstehung von Brustkrebs einher (Nelson et al. 2012). Dasselbe gilt für ein frühes Eintreten der Menopause. Der Zusammenhang zwischen früher Menarche und später Menopause und dem Auftreten von Brustkrebs konnten Kvåle et al. in einer prospektiven Studie, in der rund 62 000 norwegische Frauen über einen Zeitraum von 20 Jahren hinweg beobachtet wurden, bereits 1988 nachweisen (Kvåle et al. 1988). Bei einem frühen Eintritt der Menarche sind Frauen erhöhten Östrogenspiegeln länger ausgesetzt, während die Östrogenkonzentrationen bei Frauen, bei denen später die Menarche einsetzt, im Vergleich dazu niedriger sind. Diese hohen Östrogenspiegel und die zeitlich längere Dauer spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs (MacMahon et al. 1982).

1.2.4 Östrogentherapie

Ein wesentlicher Faktor in der Entstehung von Mammakarzinomen ist die Behandlung menopausaler Beschwerden mit Östrogenen. 2002 konnte im Rahmen der Women's Health Initiative durch Roussow et al. ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von Östrogenen und Progesteron postmenopausal und der Entstehung invasiver Mammakarzinome nachgewiesen werden. In der Gruppe, in der 1 mal täglich Östrogen und Progesterin verabreicht wurde, traten im Vergleich zur Placebogruppe 26 % mehr Fälle an Brustkrebs auf (Roussow et al. 2002). In der Gruppe, in der nur Östrogenpräparate gegeben wurden, kam es zu keinem vermehrten Auftreten von Mammakarzinomen. Die Hormontherapie menopausaler Beschwerden ist trotz einer vorübergehenden Abnahme nach Veröffentlichung der Ergebnisse der Women's Health Initiative 2002 nach wie vor weit verbreitet. Hinsichtlich der unterschiedlichen Risikoerhöhung bei Gabe von

Kombinationspräparaten im Vergleich zu reinen Östrogenpräparaten ist noch die Frage des Benefits einer langjährigen Behandlung mit Östrogenen zu klären. Bei der Behandlung mit reinen Östrogenpräparaten konnte eine vermehrte Zunahme der Dichte in der Mammographie beobachtet werden (Chen et al. 2011).

1.2.5 Lifestyle

Auch der Lifestyle hat einen bedeutenden Einfluss auf das Entstehen von Brustkrebs.

In mehreren Studien konnte Übergewicht als Risikofaktor zur Entstehung von Brustkrebs sowie einer schlechteren Prognose nachgewiesen werden (Lahman et al. 2002).

Der genaue Mechanismus, der bei Übergewicht für die Entstehung zu Krebs verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt. Es ist aber davon auszugehen, dass die erhöhten Serumkonzentrationen an Östrogen und Estradiol eine bedeutende Rolle in dem Prozess spielen. Übergewichtige Patientinnen weisen im Vergleich zu normalgewichtigen eine deutlich erhöhte Serumkonzentration von Östrogen und Estradiol und abhängig von BMI und Körper- Fett- Anteil ein erhöhtes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, auf (Key et al. 2003). In der Malmö Diet and Cancer Study wurde ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhtem BMI und erhöhtem Risiko für Brustkrebs nachgewiesen. In dieser Studie zeigte sich, dass Patientinnen mit einem BMI $\geq 28,5$ kg/m² ein um 54 % höheres Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, aufweisen (Lahman et al. 2002). Die Prognose dieser Patientinnen ist häufig schlechter als die von Patientinnen mit einem BMI $\leq 22,5$ (Key et al. 2003). Bei Diagnosestellung liegen oft Tumore in einem höheren Tumorgroße (T) - Stadium und mit bereits begonnener Metastasierung vor, was ein möglicher Faktor für die schlechte Prognose sein kann (Carmichael 2006). Die Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasierung bei übergewichtigen Brustkrebspatientinnen ist doppelt so hoch wie bei normalgewichtigen Patientinnen (Carmichael 2006).

Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen Nikotinabusus und Übergewicht und der Entstehung von Brustkrebs nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen,

die hierbei zur Entstehung von Brustkrebs führen, sind allerdings noch unklar (Luo et al. 2011).

Zusätzlich zum Gewicht kommen auch Ernährung und sportlicher Aktivität eine Rolle zu. Regelmäßige sportliche Betätigung und Einhaltung einer fettarmen Diät kann eine positive Auswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit zugeschrieben werden (Carmichael 2006, Bauernfeind et al. 2011).

Der regelmäßige Konsum von Alkohol begünstigt durch erhöhte Konzentrationen von Östrogenen und Androgenen sowie Förderung der Karzinogenese ebenfalls die Entstehung von Brustkrebs. Testino nennt eine Risikoerhöhung von 10 % pro alkoholischem Getränk pro Tag (Testino 2011).

1.3 Prognosefaktoren

1.3.1 pTNM- Status

Die Prognose des Mammakarzinoms ist im Wesentlichen von der Tumorgroße und seiner Ausbreitung abhängig. Dies wird postoperativ mithilfe der pTNM-Klassifikation beschrieben (siehe auch Anhang S. 82).

Tumore mit einem Durchmesser unter 1 cm gehen meist mit einer günstigen Prognose einher, während Durchmesser von über 4 cm häufig auf eine schlechtere Prognose hindeuten (Boecker, Denk, Heitz 2004). Für eine ungünstige Prognose sprechen auch die Tumorausdehnung auf Mamille und Haut (Boecker, Denk, Heitz 2004).

Den entscheidendsten Faktor für die Prognose stellt der Einbruch ins Lymphsystem dar. Die lymphogene Metastasierung beim Mammakarzinom erfolgt bevorzugt in die axillären Lymphknoten. Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem Sentinel-Lymphknoten, dem ersten im Abflussgebiet befindlichen Lymphknoten, zu, der bei Streuung zuerst befallen wird. (Boecker, Denk, Heitz 2004) Die Prognose hängt von der Anzahl der befallenen Lymphknoten ab (Bauernfeind et al. 2011).

Histomorphologisch werden 3 Malignitätsgrade nach Elston und Ellis unterschieden. In diesem Score werden Drüsenbildung, Kernatypien und Anzahl der Mitosen berücksichtigt. Abhängig von der Ausprägung der genannten Parameter kann eine

Einteilung in 3 Grade (gut, mäßig und schlecht differenziert) erfolgen. Der histologische Grad steht in direktem Zusammenhang mit Lymphknotenstatus, Rezidivrate, Mortalitätsrate und Rezeptorstatus (Bauernfeind et al. 2011).

1.3.2 Steroidhormonrezeptorstatus

Wegen der wachstumsfördernden Wirkung von Östrogen und Progesteron über Hormonrezeptoren in Drüsenepithelien der Brust wird beim Mammakarzinom routinemäßig der Rezeptorstatus bestimmt (Boecker, Denk, Heitz 2004). Die Bestimmung erfolgt mittels Immunhistochemie (IHC), Fluoreszenz- In- situ- Hybridisierung (FISH), Chromogen- In- situ- Hybridisierung (CISH) oder Silber- In- situ- Hybridisierung (SISH). Erfasst wird jeweils die Anzahl der positiv gefärbten Zellkerne getrennt für Östrogen- und Progesteronrezeptor in Prozent. Als hormonrezeptorpositiv gilt bereits die Anfärbung von 1 % der Zellkerne (Bauernfeind et al, Manual Mammakarzinome).

2005 wurden in der St. Gallen- Konsensuskonferenz 3 Risikogruppen unter Berücksichtigung von Lymphknotenstatus, Tumorgröße, Steroidhormonrezeptorstatus, Expression von Her2/neu, Gefäßinvasion und Lebensalter erstellt (Goldhirsch et al. 2007) (Tab. 1). Diese Risikogruppen können zur Wahl der weiteren systemischen Therapie herangezogen werden.

Risikogruppe	
Niedriges Risiko	LN0 und alle folgenden Parameter: pT ≤ 2 cm UND histolog. Grad 1 UND keine peritumorale Gefäßinvasion UND ER u./o. PgR pos. UND Her2/neu neg. UND Alter ≥ 35 Jahre
Mittleres Risiko	LN0 und min. 1 der folgenden Parameter: pT > 2 cm ODER HG 2 – 3 ODER peritumorale Gefäßinvasion ODER ER u. PgR neg. ODER Her2/neu pos. ODER Alter < 35 Jahre LN1 (1 – 3 LN) UND ER u./o. PgR pos. UND Her2/neu neg.
Hohes Risiko	LN1 (1 – 3 LN) UND ER u./o. PgR neg. ODER Her2/neu pos. LN1 (≥ 4 LN)

Tab. 1: Definition der Risikogruppen bei Patientinnen mit operablem Mammakarzinom nach der St- Gallen- Konsensuskonferenz 2007 (Quelle: Goldhirsch et al. 2007)

1.3.3 Histopathologie

Auch der histologische Typ hat einen Einfluss auf die Prognose. So liegt die 10-Jahres-Überlebensrate bei papillären und tubulären Karzinomen bei 65%, während invasive duktale und lobuläre Karzinome lediglich eine 10-Jahres-Überlebensrate von 30-35% aufweisen (Böcker, Denk, Heitz 2004). Am häufigsten sind invasive duktale Mammakarzinome.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gewebe invasiver duktaler Mammakarzinome untersucht.

1.4 *Her2/neu (Erb-B2)*

Her2/neu zählt zur Familie der Wachstumsfaktoren/ Rezeptoren vom Tyrosinkinasetyp. Die Her-Familie umfasst Her1 (auch EGFR oder erb-B1), Her2 (auch Her2/neu oder erb-B2), Her3 (auch erb-B3) und Her4 (auch erb-B4) (Casalini et al. 2004). Die Rezeptoren dieser Familie bestehen aus einer intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase, einer transmembranen Domäne sowie einer glykosilierten extrazellulär gelegenen Ligandenbindungsstelle (Hsieh, Moasser 2007). Bei Bindung von Liganden vermitteln die Her-Rezeptoren diverse Signalwege besonders im Hinblick auf „Proliferation, Differenzierung und Migration“ der Zellen. Bindet ein Ligand an einen Rezeptor der Her-Familie kommt es zur Ausbildung von Dimeren und damit zur Aktivierung der Rezeptoren. Je nach Art der Rezeptoren unterscheidet man Homo- und Heterodimerisierung. Von Homodimerisierung spricht man beim Vorliegen zweier identischer Rezeptoren, bei unterschiedlichen Rezeptoren von Heterodimerisierung (Mendelsohn et al. 2000). Die Ausbildung von Dimeren dient u. a. der Stabilisierung der Rezeptoren. Desweiteren kommt es dabei zur räumlichen Nähe der Tyrosinkinasen und dadurch zur Autophosphorylierung der Kinaseanteile, was eine Aktivierung der Signalkaskade auslöst. Zwei bedeutsame Signalkaskaden sind der Ras- Raf- MAP- Kinase- Signalweg und PI-3-Kinase und Akt. Alle diese Signalwege spielen eine große Rolle in Zellproliferation, Genexpression und Apoptose (Mendelsohn 2000).

Innerhalb der Her- Familie kommt Her2/neu eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung der Dimere zu. Her2/neu wird besonders bei der Ausbildung von Heterodimeren bevorzugt. Man führt dies darauf zurück, dass Her2/neu- Dimere durch eine besonders lang anhaltende Aktivität der nachfolgenden Signalkaskaden ausgezeichnet werden, was Her2/neu als Bindungspartner besonders attraktiv macht. Diese lang anhaltende Aktivierung wird vor allem dadurch erreicht, dass Her2/neu die Dissoziation der Liganden verlangsamt. Dies führt zu einer Verstärkung der Signalkaskaden und zu einer vermehrten Proliferation, Differenzierung und Genexpression (Casalini et al. 2004).

Her2/neu wird vor allem in malignem Gewebe verstärkt exprimiert. So weisen rund 25% aller Mammakarzinome eine vermehrte Expression von Her2/neu auf (Hsieh, Moasser 2007). Zahlreiche Studien haben mittlerweile belegt, dass die Überexpression von Her2/neu mit der Prognose korreliert. Gerade in höheren Stadien spielt die Expression von Her2/neu hinsichtlich Tumorwachstum und Metastasierung eine entscheidende Rolle (Hsieh, Moasser 2007).

1.4.1 Bestimmung des Her2/neu- Rezeptorstatus

Bei der Primärdiagnostik von Mammakarzinomen erfolgt standardmäßig die Bestimmung des Her2/neu- Rezeptorstatus. Die Bestimmung der Her2/neu- Expression ist prinzipiell mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung (FISH) möglich. In der Praxis erfolgt dies meist mittels des Herceptest (Dako, Glostrup, Dänemark) oder CB11 (Pathway, Ventana Medical Systems). Beide Tests sind immunhistochemische Verfahren (Carney et al. 2007). Eine Anfärbung von > 30 % der Tumorzellen (3+) repräsentiert eine starke Überexpression von Her2/neu. Eine Anfärbung von ≤ 10 % (0) oder > 10 % (1+) der Tumorzellen spricht für eine fehlende oder geringe Her2/neu- Expression und wird als Her2/neu- negativ gewertet (Bauernfeind 2011). Die genaue Bestimmung des Her2/neu- Rezeptorstatus ist für die adjuvante Therapie essenziell, da eine adjuvante systemische Therapie mit Her2/neu- Antagonisten (Trastuzumab) nur für Patientinnen mit positiven Her2/neu- Rezeptorstatus einen Vorteil bringt.

Bei Her2/neu 2+ liegt ein schwach positives Ergebnis vor und es sollte eine genauere Untersuchung mittels FISH zur Bestimmung der Genamplifikation erfolgen (Bennett et al. 2007)

1.4.2 Therapie mit Her2/neu- Antagonisten

Mit Trastuzumab (Herceptin ®, Genentech, South San Francisco, USA) steht ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen das Her2/neu- Onkogen für die Behandlung von metastasierenden, Her2/neu- überexprimierenden Mammakarzinomen zur Verfügung. Die Erstzulassung für Trastuzumab als Monotherapie erfolgte 1998 durch die US Food and Drug Administration, seit 2006 ist Trastuzumab auch zur adjuvanten Therapie des metastasierten Her2/neu-positiven Mammakarzinoms zugelassen (Tsang et al. 2012, Nahta 2012).

Der Vorteil einer Behandlung mit Trastuzumab hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens ist klinisch bewiesen (Piccart- Gebhart et al. 2005, Slamon et al. 2011). Allerdings wird immer wieder ein geringes Ansprechen oder eine Resistenzentwicklung beobachtet. Die genauen Ursachen dafür sind noch unklar. Man geht davon aus, dass dabei Veränderungen von Her2/neu, Aktivierung von gegenläufigen Signalwegen (z.B. Aktivierung des PI3K- Signalweges durch fehlende Inhibition durch PTEN), Expression anderer Liganden sowie Bildung von Her2/neu-Her3- Heterodimeren infolge einer gesteigerten Her3- Expression mit nachfolgender Aktivierung von Signalwegen eine Rolle bei dem Therapieversagen von Trastuzumab spielen (Gajria et al. 2011, Rexer et al. 2012).

Ein Nachteil der Therapie mit Trastuzumab ist seine nachgewiesene Kardiotoxizität, insbesondere in Kombination mit Anthrazyklinen. Bei einer Kombinationstherapie von Anthrazyklinen und Trastuzumab trat in 27 % der Fälle eine Herzinsuffizienz auf, bei der Kombination von Paclitaxel und Trastuzumab waren es 13 %. Bei der alleinigen Therapie mit Trastuzumab sank die Rate an kardiotoxischen Effekten auf 3 % (Seidman et al. 2002). Aus diesem Grund soll eine Therapie mit Trastuzumab und Anthrazyklinen nur unter strengem kardialen Monitoring, welches auch nach Beendigung der Therapie fortgesetzt wird, erfolgen (Rayson et al. 2008). Kommt es zum Auftreten einer Herzinsuffizienz, so kann diese gut nach den gängigen Leitlinien

oder mit Absetzen von Trastuzumab therapiert werden (Keefe 2002). In den meisten Fällen ist die auftretende Herzinsuffizienz reversibel, sodass nach kardiologischer Abklärung und Verbesserung der kardialen Parameter die Therapie mit Trastuzumab fortgeführt werden kann (Keefe 2002).

1.5 PTK 6 (Breast Tumour Kinase; brk)

1994 gelang es Mitchell et al. das breast tumour kinase- Gen (brk- Gen) aus dem Gewebe metastasierender Mammakarzinome zu klonen. Sein Genprodukt ist eine rezeptorlose Tyrosinkinase, die Protein- Tyrosin- Kinase 6 (PTK6), auch bekannt unter dem Namen Breast Tumour Kinase (brk) (Mitchell et al. 2000).

Physiologisch kommt PTK6 in gesundem Gewebe von Prostata, Haut und im Gastrointestinaltrakt vor. Im gesunden Gewebe von Mamma und Ovar ist sie nicht oder nur wenig exprimiert. (Ostrander et al. 2011), während sie bei rund 86 % aller malignen Mammatumore überexprimiert vorliegt (Lofgren et al. 2011). PTK6 führt zu einer Stimulation der Her- Rezeptoren und interagiert mit diesen (Kamalati et al. 1996).

Über die Funktion von PTK6 in gesundem Gewebe war bis vor kurzem noch wenig bekannt. Ostrander et al. konnten 2011 nachweisen, dass PTK6 einen wesentlichen Einfluss auf Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellmigration und nach neusten Erkenntnissen auch auf die Wundheilung im gesunden Gewebe ausübt (Ostrander et al. 2011).

Im Gewebe von Mammakarzinomen führt PTK6 zu einer erhöhten Aktivität von EGF und somit zur gesteigerten Proliferation der Krebszellen. Weiters beeinflusst PTK6 das Überleben und die Migration der Krebszellen positiv (Ostrander 2011).

Die gesteigerte Proliferation von Krebszellen im Hinblick auf PTK6 ist demnach einerseits auf den direkten Einfluss der Tyrosinkinase auf die Proliferation, andererseits auf die Interaktion zwischen PTK6 und Her- Rezeptoren und die Stimulation von EGF zurückzuführen. Angesichts dessen kommt der PTK6 eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese von malignen Mammatumoren und deren Prognose zu.

2 ZIELSETZUNG

Die Überexpression von Her2/neu und PTK6 im Gewebe von Mammakarzinomen wurde in den vergangenen Jahren bereits mehrmals beschrieben (Aubele et al 2008, 2010).

In dieser Arbeit wurde mittels der PLA- (Proximity Ligation Assay) Markierung die Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden dann auf einen Zusammenhang mit Daten aus früheren Studien (IHC) und Verlaufsdaten von mehr als 20 Jahren untersucht.

3 MATERIAL

3.1 *Klinische Daten zu den Fällen*

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 80 Fälle untersucht. Davon konnten 76 in die Auswertung übernommen werden.

Bei den untersuchten Tumoren handelte es sich ausschließlich um invasive Mammakarzinome vom duktalem Typ.

Die klinisch-histologischen sowie die experimentell erhobenen Parameter wurden auf ihre Bedeutung für das metastasenfrem Überleben untersucht. Insgesamt wurden in 24 Fällen das Auftreten einer Fernmetastasierung beobachtet. Die gesamte Verlaufskontrolle betrug 240 Monaten (20 Jahre). Das früheste beobachtete Auftreten von Fernmetastasen fand nach 5 Monaten statt, das späteste nach 240 Monaten. Der Median der Verlaufskontrolle lag bei 139 Monaten.

Von den untersuchten 76 Tumoren maßen 56 eine Tumorgöße von ≤ 2 cm (T1), 20 eine Tumorgöße > 2 cm (T2).

In 49 Fällen waren die Lymphknoten metastasenfrem (LN 0), bei 27 wurde ein Befall der Lymphknoten nachgewiesen (LN 1).

59 Tumore waren Her2/neu- Rezeptor negativ, 17 positiv. In 26 der Tumore wurde eine hohe Expression von PTK6 gefunden, in 28 war diese Expression gering. (siehe auch Anhang)

3.2 *Paraffinschnitte*

Für die vorliegende Arbeit wurde das Gewebe von 80 in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten invasiven duktalem Mammakarzinomen untersucht. Bei den untersuchten Tumoren handelte es sich ausschließlich um Primärtumore. Die verwendeten Fälle für die Gewebe- Arrays C1 und C2 stammen vom Karolinska Institut in Stockholm, Schweden. Die Patientinnen wurden chirurgisch therapiert und präoperativ nicht vorbehandelt. Von diesen untersuchten 80 Gewebeproben konnten 76 in die Auswertung übernommen werden. Alle Tumore wurden histologisch aufgearbeitet und nach HE- Färbung vom Pathologen klassifiziert. (siehe Anhang)

3.3 Zelllinie

Untersucht wurde auch die Mammakarzinom-Zelllinie T47D, wo Her2/neu und PTK6 hoch exprimiert vorliegen. Die T47D- Zelllinie wurde als Kontrolle benutzt und die Ergebnisse verglichen mit Zellen der T47D- Zelllinie, in der entweder Her2/neu oder PTK6 herunterreguliert waren. In diesen Zellen wurde der Her2/neu Rezeptor herunterreguliert und ebenso wie die unbehandelte Zelllinie mittels PLA- Technik untersucht.

3.4 Antikörper

Als Primärantikörper wurden anti- Her2/neu- Antikörper der Spezies Maus mit Spezifität humanes c- erbB2- Onkoprotein in der Verdünnung 1:7 (Novocastra Laboratories Ltd., UK) und anti- PTK6- Antikörper der Spezies Kaninchen mit Spezifität humane Brk (C. 18, entspricht PTK6) in der Verdünnung 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt.

Die Sekundärantikörper waren Bestandteil des PLA- Kits der Firma Olink Bioscience (Uppsala, Schweden). Sie lagen als PLA- probe anti- rabbit PLUS und PLA- probe anti- mouse MINUS vor.

3.5 Duolink in situ PLA

Für die PLA wurden Duolink in situ PLA- Reagenzien verwendet, bestehend aus den Sekundärantikörpern PLA- probe anti- mouse MINUS und PLA probe anti- rabbit PLUS sowie dem Detection kit 563 (Olink Bioscience, Uppsala, Schweden). In dem Detection kit sind Fluoreszenz- markierte Oligonukleotide zur Markierung der Proteinkomplexe enthalten.

4 METHODE

4.1 *Tissue Microarrays*

Die Herstellung der Tissue Micro Arrays erfolgte im Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München.

Array C- I bestand aus insgesamt 47 Tumorstanzen in 11 Reihen. Reihe 1 bis 7 umfasste jeweils 5 Stanzen, Reihe 8 bis 11 3 Stanzen nebeneinander. Array C- II umfasste insgesamt 45 Tumorstanzen, die ebenfalls auf 11 Reihen verteilt waren. Bei C II umfassten die Reihen 1 bis 6 jeweils 5 Stanzen und Reihen 7 bis 11 jeweils 3.

Eine Stanze maß im Durchmesser 1 mm. Aus den Paraffinblöcken der Primärtumore wurden jeweils repräsentative Stanzen mithilfe des „Tissue Arrayers“ (Beecher Instruments, USA) ausgestanzt und in einen leeren Empfänger- Paraffinblock übertragen. Die fertigen Empfängerblöcke wurden im Anschluss noch für 3 h bei 37°C im Brutschrank „gebacken“, damit sich die verschiedenen Paraffinanteile (Stanze und Empfängerblock) gut verbinden konnten.

Von diesen Blöcken, oder auch Tissue Micro Arrays (TMA) wurden histologische Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die TMA- Blöcke wurden dabei in das Mikrotom eingespannt und Schnitte von 5 µm Dicke angefertigt. Da sich die Schnitte beim Schneiden einrollen, werden sie anschließend zur Glättung ins Wasserbad gelegt und mit dem Pinsel dann auf die Objektträger aufgezogen und getrocknet. Danach können sie gefärbt werden.

Zusätzlich zu den Schnitten für die hier beschriebenen Experimente wurde von jedem TMA im Anschluss ein Schnitt HE- gefärbt und hinsichtlich repräsentativem Tumorgewebes histopathologisch beurteilt, sowie der histologische Typ und Differenzierungsgrad nochmals verifiziert.

4.2 IHC + Ventana

Die Immunhistochemie dient dem spezifischen Nachweis und der genauen Lokalisation von „Epitopen gesuchter Antigene“ zur genauen Phänotypisierung der Gewebe (Böcker, Denk, Heitz 2004). Bei den immunhistochemischen Verfahren werden direkte und indirekte unterschieden. Bei der direkten Methode wird der Primärantikörper, der das Antigen bindet, mit einem Markermolekül markiert, bei der indirekten Methode wird der Primärantikörper von einem markierten Sekundärantikörper gebunden. Die Markermoleküle können dann im Gewebe nachgewiesen werden.

Die immunhistochemischen Markierungen, die in diese Arbeit miteinbezogen wurden, lagen bereits im Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München vor.

Die Färbungen wurden mithilfe der IHC staining platform (Ventana Medical Systems Inc., USA) durchgeführt.

Die Vorbehandlung der Schnitte (Entparaffinierung, Hitzevorbehandlung mit Cell Conditioning 1- Pufferlösung (Ventana Medical Systems Inc., USA) zur Lösung der Formalinkomplexe im Gewebe erfolgt ebenfalls maschinell. Nach der abgeschlossenen Vorbehandlung wird jeweils einer der Primärantikörper (entweder Her2/ neu: ErbB2, rabbit, 1:300, A0485, DAKO, Glostrup, Dänemark; oder PTK6: brk, rabbit, 1: 50, c-17, sc 1188, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) händisch aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe des Sekundärantikörpers (goat anti- rabbit, 1:750) ebenfalls händisch. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgt für 32 min bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wird für die Detektion DAB (3,3'-Diaminobenzidin) maschinell zugegeben. DAB wird überall dort, wo Sekundär-Antikörper gekoppelt an Peroxidase vorliegt, von der Peroxidase in ein braunes Präzipitat umgewandelt. Für die Gegenfärbung wird Hämatoxylin verwendet. Damit wird eine blaue Anfärbung aller übrigen Strukturen erreicht. Nach abgeschlossener Gegenfärbung werden die Objektträger gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt. Zum Abschluss wird in Xylol entwässert. Im letzten Schritt

werden die Präparate mit Deckgläschen eingedeckt und über Nacht zum Aushärten in den Brutschrank gelegt (Protokoll Ventana).

4.3 PLA (*Proximity Ligation Assay*)

Für die Analyse von Proteinen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Der Proximity Ligation Assay ermöglicht jedoch nicht nur den spezifischen Nachweis einzelner Proteine, sondern vor allem auch von Proteinkomplexen sowie der Interaktion zwischen Proteinen oder zwischen Proteinen und ihrem Liganden (Gustafsdottir et al. 2005; Söderberg et al. 2008). Mit dieser Methode lassen sich auch geringe Mengen an Protein nachweisen. Außerdem weist sie durch den Einsatz zweier Antikörper eine geringere Kreuzaktivität im Vergleich zu anderen gängigen Methoden auf. Mittels PLA können Proteine in Gewebeschnitten, Serum, Plasma, Liquor und Zellkulturen nachgewiesen werden (Gustafsdottir et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wird die Interaktion von PTK6 und Her2/neu anhand dieser Methode untersucht und dargestellt.

4.3.1 Ablauf der PLA

Die Primärantikörper binden an die Zielproteine, sie müssen aus unterschiedlichen Spezies stammen (z.B. Maus und Kaninchen), um die Spezifität der Methode gewährleisten zu können. An die Primärantikörper binden nun die PLA- Sonden, diese bestehen aus Sekundärantikörpern mit gebundenen Oligonukleotiden. Im nächsten Schritt wird die Hybridisierungslösung zugegeben, die weitere Oligonukleotide enthält. Diese Oligonukleotide lagern sich an die bereits vorhandenen an und verlängern diese. Diese verlängerten Oligonukleotide werden nun durch die als nächstes zugefügte Ligase verknüpft, es entsteht eine Ringstruktur. Entscheidend für diesen Schritt ist die räumliche Lage der Oligonukleotide der Sekundärantikörper zueinander. Der Abstand zwischen den beiden sollte nicht mehr als 30 nm betragen, da es der Ligase sonst nicht gelingt, die Oligonukleotide zum Ring zu schließen. Dieser Abstand wurde von Söderberg et al. in Abhängigkeit von der Größe der beiden Antikörper und der angehängten Oligonukleotide berechnet (Söderberg et al. 2006). Als nächstes erfolgt die Zugabe

der Nukleotide und DNA- Polymerase für die DNA- Amplifikation. In diesem Schritt werden die verknüpften Oligonukleotide im Rahmen einer Rolling- circle- Amplifikation vervielfältigt. Dabei dienen die Oligonukleotide einer PLA- Sonde als Primer und die zuvor entstandene Ringstruktur als Matrize für die Amplifikation. (Olink Manual). Im letzten Schritt werden Fluoreszenz markierte Oligonukleotide zugegeben, welche in das Rolling- circle- Produkt (RCP) eingebaut werden. Jedes interagierende Proteinpaar resultiert in einem unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Signal.

Die hohe Spezifität der PLA kommt durch die Verwendung zweiter Antikörper zustande, die aus unterschiedlichen Spezies (z.B. Maus und Kaninchen) stammen müssen. Die Anlagerung der Sekundärantikörper erfolgt spezifisch (anti- rabbit, anti- mouse) und stellt den entscheidenden Schritt dar. Erst durch spezifische Anlagerung der Sekundärantikörper kann im weiteren die Ligation, Amplifikation und Hybridisierung der an die Sekundärantikörper angehängten Oligonukleotide erfolgen. Bei der Amplifikation kommt es zu einer sehr starken Vermehrung der DNA- Sequenzen, wodurch die Signale verstärkt werden und somit auch geringe Mengen an vorhandenen Proteinen nachweisbar sind (Gustafsdottir et al. 2005, Söderberg et al. 2006).

Die Sensitivität hängt im Wesentlichen von der Affinität der Antikörper ab. Bei einer hohen Affinität der Antikörper steigt auch die Anzahl an Signalen an (Gustafsdottir et al. 2005).

Für den Erfolg der PLA- Färbung sind somit mehrere Faktoren ausschlaggebend: die spezifische Bindung der primären Antikörper an das Antigen, die spezifische Bindung des sekundären an den primären Antikörper, was durch die Herkunft der Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies gewährleistet ist, die enge räumliche Nähe zwischen den beiden Proteinen, also zwischen den Oligonukleotiden an den Sekundärantikörpern, damit die Ligation der Oligonukleotide zum Ring ablaufen kann.

Mit der PLA steht somit eine sehr effektive Methode zum Nachweis von Proteinen und ihren Interaktionen zur Verfügung, die sich durch ihre hohe Spezifität und Sensitivität auszeichnet und vor allem am fixierten, histologischen Schnitt ablaufen kann.

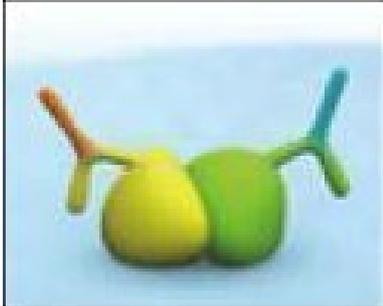
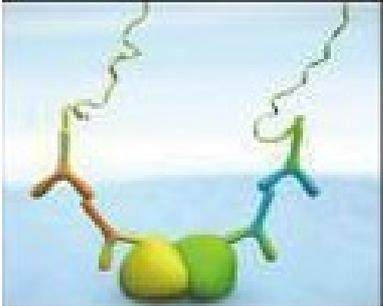
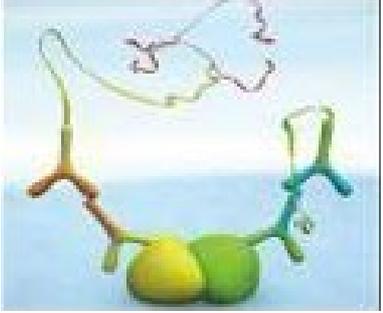
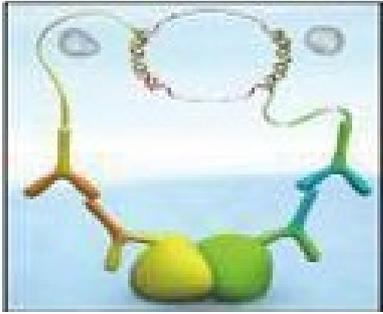
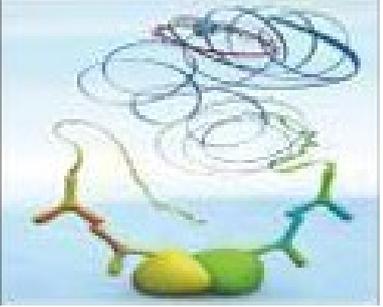
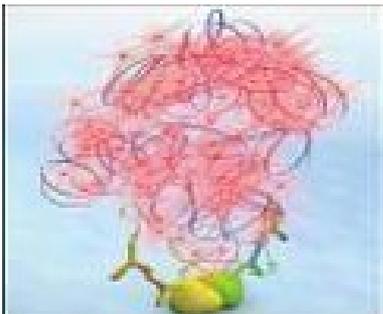
	
<p>Binden der Primärantikörper an die Antigene im Gewebe (hier Her2/neu und PTK6)</p>	<p>Binden der Sekundärantikörper an die Primärantikörper</p>
	
<p>Hybridisierung der Oligonukleotide</p>	<p>Zugabe der Ligase und Ringschluss der an die Sekundärantikörper angehängten Oligonukleotide</p>
	
<p>Rolling- circle- Amplifikation nach Zugabe der DNA- Polymerase</p>	<p>Einlagerung der Fluoreszenz- markierten Oligonukleotide in das RCA- Produkt (rolling circle- amplification)</p>

Abb. 1 Schematische Darstellung des Ablaufs der PLA (<http://www.olink.com/>)

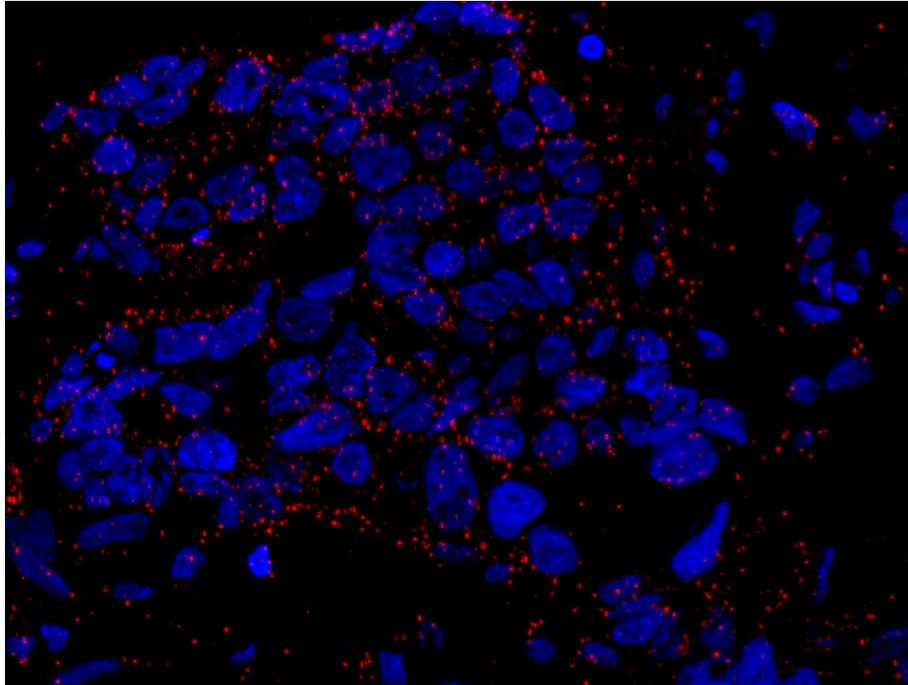


Abb. 2: Ergebnis im Fluoreszenzmikroskop (rote Fluoreszenz= Signale der Proteinkomplexe, blaue Fluoreszenz= Kerngegenfärbung)

4.4 Methodische Herausforderungen

Ausgehend vom Protokoll der Firma Olink wurden im Laufe der Versuchsreihen mehrere Varianten ausgetestet und bei positiven Ergebnissen in das Protokoll übernommen.

So wurde auf die Verwendung einer „künstlichen“ Barriere um den Schnitt bei Durchführung der Färbungen nach Austestung verschiedener Methoden (Dako- Pen, Folie) verzichtet.

Variiert wurden auch die Inkubationszeiten beim Blocken und bei der DNA-Amplifikation.

Weiters folgte auch der Vergleich zweier Detection Kits der Firma Olink, Detection Kit 563 und Detection Kit 613 (www.olink.com).

Die durchgeführten Varianten und deren Ergebnisse werden im Teil Ergebnisse genauer beschrieben.

4.5 Zelllinie

Um die Methode zu verifizieren, wurde sie an einer Mammakarzinom- Zelllinie, T47D, getestet, bei der Her2/neu und PTK6 hoch exprimiert vorliegen.

Die Herunterregulation eines der Proteine wurde von Kollegen am Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München unter Verwendung von siRNA- (RNA-) Interferenz durchgeführt (Aubele et al. 2010).

Die Zellkulturen wurden in sterilen Zellkulturgefäßen (Quadriperm) direkt auf Objektträgern (SuperFrost, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gezogen. Nach Erreichen einer ausreichender Zelldichte wurden die Zellen dann in 4%- igem Formalin fixiert und die PLA- Methode nach Protokoll (siehe Anhang S. 88) durchgeführt.

Bei der Durchsicht unter dem Fluoreszenzmikroskop (AxioImager, Zeiss, Jena) waren in den T47D- Zellen, die Her2/neu und PTK6 hoch exprimieren, reichlich spezifische Signale vorhanden (Abb.12, S. 50).

Im Vergleich dazu waren in T47D- Zellen mit herunterreguliertem Her2/neu nur noch vereinzelte Signale erkennbar (Abb. 13, S. 51).

Somit wurde nachgewiesen, dass die PLA- Methode glaubhaft und spezifisch ist und das Vorhandensein und die Interaktion der jeweiligen Proteine zuverlässig anzeigt.

4.6 Axio Imager

Die Beurteilung der PLA-markierten Schnitten hinsichtlich Qualität der Färbung und Morphologie sowie die Bildaufnahme erfolgte am Axio Imager Z1 (Zeiss, Jena, Deutschland).

Die Fluoreszenz- Signale liegen in den histologischen Schnitten meist auf unterschiedlichen Ebenen. Um alle Signale aufnehmen zu können, müssen

Schichtaufnahmen mithilfe der Apotomfunktion von dem jeweiligen Präparat erfolgen. Abhängig von der Vergrößerung wählt das Apotome eine Gitterstruktur aus, welche in die Brennebene des Objektivs projiziert wird. Die Gitterstruktur wird von lateral in 3 definierten Schritten positioniert. An jeder Position wird ein Bild aufgenommen. Aus diesen 3 Bildern wird dann mittels AxioVision Software (Zeiss, Jena) ein Bild erstellt, das einen Schnitt in dieser Ebene darstellt.

Es wurden mehrere Schnittbilder im Abstand von durchschnittlich 0,29 µm sowohl im blauen (Emission bei 455 nm) als auch im roten (Emission bei 581 nm)

Spektralbereich erzeugt. Die erstellten Bilder wurden in Projektionsbilder

umgerechnet und ins TIF-Format zur weiteren Auswertung mit Definiens konvertiert.

Bei der Erstellung der Bilder für die vorliegende Arbeit erfolgte die Orientierung am Präparat bei einer Objektivvergrößerung von 10x im blauen Spektralkanal. Die Bildaufnahme erfolgte dann bei einer Objektivvergrößerung von 63x. Pro Tumorgewebestanze wurden durchschnittlich 2-3 repräsentative Blickfelder erfasst. Die durchschnittliche Belichtungszeit lag bei 110 ms.

4.7 Definiens- Software

Die Auszählung der Signale für die Auswertung erfolgte über die Definiens Enterprise Image Intelligence Suite software (Definiens, München). An den vorliegenden Projektionsbildern im TIF- Format wurde die jeweilige Fläche (area of interest) markiert. Nach Definition der oberen und unteren Schwellenwerte erfolgte die Auszählung der innerhalb dieser area of interest liegenden Signale dann automatisch. Das Ergebnis der Auszählung wurde in einer Excel- Tabelle ausgegeben und statistisch ausgewertet.

4.8 Methodische Herausforderungen

Während der Erstellung der vorliegenden Arbeit traten mehrere methodische Herausforderungen auf.

4.8.1 Variable Schnittdicken

Gängige Mikrotome liefern zum Teil variierende Schnittdicken. Bei Einstellung von 5 µm können diese nach unserer Erfahrung zwischen 2 und 10 µm variieren. Diese unterschiedliche Dicke erschwerte die Auswertung unter dem AxioImager und die betroffenen Schnitte mussten wiederholt werden, bevor sie ausgewertet werden konnten.

4.8.2 Lichtempfindlichkeit der Präparate

Für die Auswertung wesentlich war auch die Lichtempfindlichkeit der PLA- gefärbten Präparate. Es fiel eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz während des Mikroskopierens auf, was durch die hohe Intensität des Lasers verursacht wurde. Signale von Tumorstanzen am Ende einer TMA- Reihe waren deutlich abgeblasst und schwächer, auch wenn die Schnittqualität gut war.

5 STATISTIK

5.1 *Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient*

Die Rangkorrelation kommt zum Einsatz, wenn die gewünschten Parameter nicht normal verteilt sind. Der Korrelationskoeffizient wird anhand der Reihenfolge, oder Rangfolge, der jeweiligen Messwerte und nicht anhand ihrer tatsächlichen numerischen Größe errechnet. Mit dem Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten kann der monotone Zusammenhang zweier Parameter dargestellt werden. Der Korrelationskoeffizient kann Werte von +1 bis -1 annehmen,. Je näher der Wert bei +/- 1 liegt, umso stärker korrelieren die verglichenen Parameter miteinander. Werte \geq +/- 0,7 bezeichnen eine starke Korrelation, Werte zwischen +/- 0,7 und +/- 0,4 eine mäßige Korrelation. (Cottin 2009) (Dissertation D. Ritterswürden 2009)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient für die Darstellung der Beziehung zwischen ausgezählten PLA- Signalen und immunhistochemischen bzw. histopathologischen Merkmalen verwendet.

5.2 *Kaplan- Meier- Methode*

Die Kaplan- Meier- Methode wird bei Überlebenszeitstudien angewandt, bei denen nicht alle Patienten im gesamten Studienzeitraum vorliegen, sondern eventuell nur in einzelnen Zeitintervallen. Der entscheidende Faktor an der Kaplan- Meier- Methode ist, dass die Beobachtungsintervalle nicht fest vorgegeben sind, sondern von Ereignissen bestimmt werden. Ein solches Ereignis wird beispielsweise durch den Tod eines an der Studie beteiligten Patienten definiert und markiert dann den Beginn eines neuen Beobachtungsintervalls. Für jedes Beobachtungsintervall wird für jeden Patienten, der bis zu Beginn des jeweiligen Intervalls überlebt hat, die Wahrscheinlichkeit, das jeweilige Intervall zu überleben, berechnet. Die Gesamtwahrscheinlichkeit einen bestimmten Zeitraum zu überleben ist das Produkt aus diesen Wahrscheinlichkeiten (Ziegler et al. 2007).

in der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Kaplan- Meier- Methode die univariate Korrelation der einzelnen Parameter mit dem metastasenfren Überleben der Patientinnen berechnet.

5.3 Log-Rang- χ^2 -Test

Der Log- Rang- Test stellt ein Standardverfahren in der medizinischen Statistik zum Vergleich zweier Gruppen bei Überlebenszeitanalysen dar. Verglichen werden dabei die beobachteten Todesfälle mit den zu erwartenden. Damit lässt sich eine valide Aussage bezüglich des Mortalitätsrisikos in beiden Gruppen treffen. (Ziegler et al. 2007)

In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mithilfe des Log- Rang- Tests untersucht.

5.4 Multivariate Analyse/ Cox Proportional Hazards

Mit dem Cox-Modell können die Einflüsse verschiedener Parameter, z.B. der Einfluss von Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Hormonrezeptorstatus etc. untersucht werden. Für jeden Parameter wird das Risiko pro Skaleneinheit des Parameters berechnet. Das errechnete Risiko gilt für den gesamten untersuchten Zeitraum, in diesem Fall 240 Monate.

Im Cox-Modell wurden nur signifikante (d.h. $p < 0.05$) Parameter zugelassen. Diese wurden mit Hilfe eines Vorwärtsschrittverfahrens aus allen Parametern ausgewählt, die univariat einen p-Wert von höchstens $p = 0.15$ aufwiesen. Beim Vorwärtsschrittverfahren werden sukzessive verschiedene Cox-Modelle mit einer wachsenden Parameteranzahl berechnet. Es endet, wenn sich der Modellfehler nicht mehr verbessert, bzw. kein weiterer Parameter $p \leq 0.05$ erreicht in Ko-Variation mit den schon vorhandenen.

5.5 Ergebnisse an Tumorgewebe

Bei den untersuchten Tumoren handelte es sich um invasive Mammakarzinome vom duktafen Typ.

Untersucht wurde unter anderem der Zusammenhang der experimentell erhobenen Parameter mit dem metastasenfrem Überleben der Patientinnen. Das früheste beobachtete Auftreten von Fernmetastasen fand nach 5 Monaten statt, das späteste nach 240, der Median der Verlaufskontrolle lag bei 139. Insgesamt wurde in 24 von 76 Fällen das Auftreten von Fernmetastasen beobachtet.

Davon maßen 56 Tumore eine Tumorgroße ≤ 2 cm (T1), 20 eine Tumorgroße > 2 cm (T2). Bei T1 traten in 14 von 19 erwarteten Fällen eine Fernmetastasierung auf, bei T2 in 10 von 5 erwarteten Fällen. Mit $p= 0,0115$ lässt sich eine deutliche Signifikanz zwischen Tumorgroße und Auftreten von Fernmetastasen nachweisen.

Zwischen Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung ließ sich ebenso ein signifikanter Zusammenhang herstellen. Bei 49 Tumore waren die Lymphknoten metastasenfrem (LN 0), bei 27 hatte bereits ein Befall der Lymphknoten stattgefunden (LN 1). Bei LN 0 wurden insgesamt 10 Fälle von Fernmetastasierung beobachtet, bei LN 1 kam es zu 14 Fällen von Fernmetastasierung. Es ergibt sich ein p- Wert von 0,00385.

59 Tumore waren Her2/neu- Rezeptor negativ, 17 positiv. In 46 der Tumore wurde eine hohe Expression von PTK6 gefunden, in 28 eine niedrige.

5.5.1 Korrelation der PLA- Ergebnisse

In der Korrelation der Parameter untereinander zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgroße und Anzahl an PLA- Signalen ($p= 0,015$).

Tumore > 2 cm zeigten demnach signifikant mehr Signale für Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexe als Tumore ≤ 2 cm.

5.5.2 Korrelation der PLA mit IHC

Bei der Auswertung zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen PLA und IHC von Her2/neu und PTK 6. Für PTK6 zeigte sich $p=0,098$, für Her2/neu $p=0,197$ (Tab. 2).

	IHC Her2/neu	IHC PTK6
PLA	$p=0,0987$	$p=0,1969$

Tab. 2: Korrelation der Anzahl an PLA- Signalen mit den Ergebnissen der IHC

5.5.3 Korrelation der PLA mit klinisch- histologischen Parametern

Folgende histopathologischen Parameter wurden mit den PLA- Ergebnissen korreliert: Lymphknotenstatus, Tumorgröße, Grading nach Elston Ellis sowie Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Ein signifikanter Zusammenhang konnte mit der Tumorgröße nachgewiesen werden ($p= 0,015$), alle anderen Parameter wiesen p - Werte $> 0,05$ auf (Lymphknotenstatus $p= 0,479$, Grading $p= 0,159$, Östrogenrezeptorstatus $p= 0,965$, Progesteronrezeptorstatus $p= 0,529$) (Tab.3)

	LN- Status	Tumorgröße	Histolog. Grading	ER- Rezeptor- status	PR- Rezeptor- status
PLA	$p=0,479$	$p=0,015$	$p=0,159$	$p=0,965$	$p=0,529$

Tab. 3 Korrelation der Anzahl an PLA- Signalen mit klinischen Parametern

5.6 Korrelation der Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen

5.6.1 Univariate Analyse

Für die univariate Analyse wurde das metastasenfreie Überleben mittels Kaplan-Meier- Kurven dargestellt. Dabei wurden $\leq 0,5$ PLA- Signale pro 1000 Pixel als signalarm gewertet, eine Anzahl von $> 0,5$ PLA- Signalen pro 1000 Pixel galt als signalreich. Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Kaplan- Meier- Kurven wurden mittels Log-Rang- χ^2 - Test bestimmt.

Bei der Korrelation der einzelnen Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen zeigten folgende Parameter einen signifikanten Zusammenhang: Lymphknoten-

Status ($p= 0,00385$), Tumorgroße ($p= 0,0115$), Anzahl der PLA- Signale ($p= 0,0122$) und IHC PTK6 ($p= 0,0184$).

Das metastasenfremie Überleben betrug bei Tumoren > 2 cm (T 2) 72,8%, bei Tumoren ≤ 2 cm (T 1) 38,0%. Bei Tumoren > 2 cm lag die mediane Metastasen- freie Zeit bei 162 Monaten.

Der Lymphknotenstatus stellt bezüglich des Auftretens von Fernmetastasen nach wie vor einen starken Prognosefaktor dar. Nach 240 Monaten wiesen Karzinome ohne stattgehabten Lymphknotenbefall (LN0) in 72,8% der Fälle keine Fernmetastasierung auf, während bei bereits aufgetretenen Lymphknotenmetastasen (LN1) in nur 41,0% der Fälle keine Fernmetastasierung stattfand. Die mediane Metastasen- freie Zeit betrug bei LN1 ebenfalls 162 Monate.

Tumore mit einer hohen Anzahl an PLA- Signalen ($>0,5/1000$) blieben in 46,2% der Fälle nach 240 Monaten frei von Fernmetastasen. Nach 240 Monaten blieb eine Fernmetastasierung bei Tumoren mit einer geringen Anzahl an PLA- Signalen ($\leq 0,5/1000$) in 76,7% der Fälle aus. Die mediane Metastasen- freie Zeit betrug bei Tumoren mit einer hohen Anzahl an PLA- Signalen 181 Monate. (Tab. 4).

	PLA $\leq 0,5/1000$	PLA $> 0,5/1000$
total	n=48	n=28
Metastasen	n=10	n=14

Tab. 4 Anzahl an signalreichen- bzw. signalarmen Tumoren und damit verbundene Anzahl an Fernmetasen

Ein signifikanter Zusammenhang ließ sich auch zwischen der PTK6- Expression (IHC) und dem Auftreten von Fernmetastasen erkennen. Tumore mit einer geringen Expression von PTK6 wiesen in 66,1% der Fälle nach 240 Monaten eine ausbleibende Fernmetastasierung auf. Von den Tumoren mit einer hohen Expression von PTK6 waren nach 240 Monaten 52,7% frei von Fernmetastasen. Die mediane Metastasen- freie Zeit betrug bei Tumoren mit einer niedrigen PTK6- Expression 130 Monate. (Tab. 5)

	LN- Status	Tumor- größe	Grading	PLA Her2/neu PTK6	IHC Her2/neu	IHC PTK6
Fern- metastasen	p=0,00385	p=0,0115	p=0,4020	p=0,0122	p=0,3640	p=0,0184

Tab. 5 Korrelation zwischen dem Auftreten von Fernmetastasen und klinisch- histologischen Parametern

Kein signifikanter Zusammenhang ließ sich zwischen histologischem Grad ($p= 0,402$) und der Her2/neu- Expression (IHC, $p= 0,364$) und dem Auftreten von Fernmetastasen nachweisen. Nach 240 Monaten waren 83,3% der Grad 1- Tumore frei von Fernmetastasen, 59,2% der Grad 2- Tumore und 63,8% der Grad 3- Tumore.

Von den Tumoren mit einer hohen Her2/neu- Expression in der IHC blieben nach 240 Monaten in 52,7% der Fälle Fernmetastasen aus, bei den Tumoren mit einer niedrigen Her2/neu- Expression blieben 66,1% metastasenfri.

5.6.2 Multivariate Analyse

Multivariat wurden alle untersuchten Parameter, die in den univariaten Analysen $p \leq 0,15$ aufwiesen, zur Analyse zugelassen. Konkret waren dies Lymphknotenstatus, IHC- PTK6, und Anzahl an PLA- Signalen. Hierbei zeigten sich als aussagekräftigster Parameter der Lymphknotenstatus ($p=0.006$), gefolgt von der IHC- PTK6 ($p=0,024$) und der Anzahl der PLA- Signale ($p=0,016$) hinsichtlich des Auftretens von Fernmetastasen. Das Risiko für die PLA- Signale bezog sich auf die Gruppierung in einer 0-1- Skala, d.h. genauso wie in der Kaplan- Meier- Analyse. (Tab. 6)

	Koeffizient	Risikofaktor	z- Testwert	p- Wert
LN	1,17	3,21	2,66	0,008
IHC PTK6	-1,24	0,29	-2,73	0,006
PLA	1,096	2,99	2,48	0,013

Tab. 6 Ergebnis der multivariaten Analyse (Cox- Proportional- Hazard)

PTK6 wies eine inverse Korrelation auf (Regressionskoeffizient -1,24). Dies bedeutet, dass Tumore mit höherer Expression von PTK6 eine geringere Rate an Fernmetastasen aufwiesen als hoch exprimierende Tumore.

Für Lymphknotenstatus und Anzahl der PLA- Signale traf das Gegenteil zu, da sie direkt, also positiv, korreliert sind. Lymphknotenpositive bzw. signalreiche Tumore wiesen ein höheres Risiko für Fernmetastasen auf.

6 ERGEBNISSE

6.1 *Methodische Ergebnisse*

Ausgehend vom Protokoll der Firma Olink (Uppsala, Schweden) wurden im Lauf der Experimente mehrere Varianten getestet und die Methode der PLA- Färbung weiter optimiert.

6.1.1 Aufbringung der Schnitte auf die Objektträger

Zur optimalen Aufbringung der Schnitte auf den Objektträger wurden die Gewebearrays anfangs zum Schneiden im Mikrotom mit Folie (Instrumedics, Hackensack, USA) fixiert. Dies soll eine unbeschädigte Übertragung des TMA-Schnittes auf den speziell beschichteten Objektträger sowie eine bessere Haftung auf demselben ermöglichen. Ohne Folienfixation rollt sich der Schnitt beim Schneiden auf und es besteht auch das Risiko, dass beim Schneiden Gewebestücke abgehen. Allerdings führte die Folie bei der PLA- Färbung zu einem unspezifischen Hintergrund, sodass von dieser Technik wieder Abstand genommen wurde.

6.1.2 Begrenzung des Reaktionsvolumens

Vom Hersteller (Olink Bioscience, Uppsala, Schweden) wird bei der Färbung, um die Lösungen auf der Schnittfläche zu halten, die Verwendung einer künstlichen Barriere um den histologischen Schnitt herum empfohlen (Olink Manual, www.olink.com).

Bei den Waschschrritten befanden sich die Präparate senkrecht stehend in Küvetten in der jeweiligen Reaktionslösung und waren somit jederzeit benetzt. Bei den Färbeschrritten wurden sie jedoch flach liegend behandelt und das Reaktionsvolumen direkt auf das Gewebe aufgebracht. Wichtig hierbei war die gleichmäßige Bedeckung der Gewebe mit der Reaktionslösung zur Inkubation und auch zum Schutz vor Austrocknung. Die definierte Gewebegröße lag bei 1 cm², das definierte Reaktionsvolumen bei 50 µl. Im Laufe der Versuchsreihen wurden unterschiedliche

Methoden zur Begrenzung des Reaktionsvolumens auf die definierte Gewebegröße durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Begrenzung mittels Dako- Pen (Dako Denmark A/S, Dänemark). Dako- Pen ähnelt in Aussehen und Handhabung einem handelsüblichem Filzstift und besteht aus 1- Bromopropan (60 – 100%) und Dipentene (5 – 10%). Damit wird eine wasserabweisende, alkohol- und acetonunlösliche Begrenzungslinie zur Definition des gewünschten Volumens auf dem Objektträger um das Gewebe herum gezogen (Manual Dako Denmark).

Bei den Versuchen mit Dako- Pen blieb das definierte Volumen innerhalb des eingegrenzten Bereiches. Von der gezogenen Begrenzungslinie liefen allerdings Schlieren in das Reaktionsvolumen. In der Auswertung führte dies auf den Bildern zu einem störenden unspezifischen Hintergrund, welcher die Auswertung erschwerte.

Im Folgenden wurde versucht, das Präparat mit Folie abzudecken. Dies hatte den Vorteil, dass der Flüssigkeitsfilm zwischen Gewebeschnitt und Folie gleich dick war und das Gewebe so nicht austrocknen konnte. Dabei lief allerdings ein Teil des Reaktionsvolumens über die definierte Fläche des Objektträgers hinaus und bedeckte teilweise die gesamte Fläche. In der Auswertung zeigte sich erneut ein unspezifischer Hintergrund. Im Vergleich zu dem Verfahren mit dem Dako-Pen waren die Ergebnisse bei dieser Methode allerdings besser.

Im weiteren wurde dazu übergegangen, das Präparat sauber begrenzt mit einem trockenen Papiertuch abzuwischen und auf begrenzende Medien wie Dako-Pen oder Folie gänzlich verzichtet. Mit dieser Methode wurden letztlich die zufriedenstellendsten Ergebnisse erzielt. Das Reaktionsvolumen blieb auf die definierte Fläche begrenzt und verlief nicht. Es kam auch weniger zum Auftreten des unspezifischen Hintergrundes.

6.1.3 Vorbehandlung in der Mikrowelle

Eine wesentliche Rolle kommt der Vorbehandlung der Gewebeschnitte in der Mikrowelle zu. Durch die Formalinfixierung entsteht ein dichtes Geflecht der Moleküle durch Quervernetzungen. Diese Quervernetzungen verhindern nun das Eindringen und die Anlagerung von Sonden oder Antikörpern (Grizzle et al. 2009).

Diese Vorbehandlung bricht diese Quervernetzungen durch Koagulation der Proteine auf, was das Eindringen von Sonden oder Antikörpern in das Gewebe ermöglicht. Eine Kochzeit in der Mikrowelle von mehr als 30 min führte dazu, dass ein Großteil der auf dem Schnitt vorhandenen Gewebeprobe zerkocht war (Abb. 3). Bei Kochzeiten von genau 30 min blieb das Gewebe weitestgehend in guter Qualität erhalten.

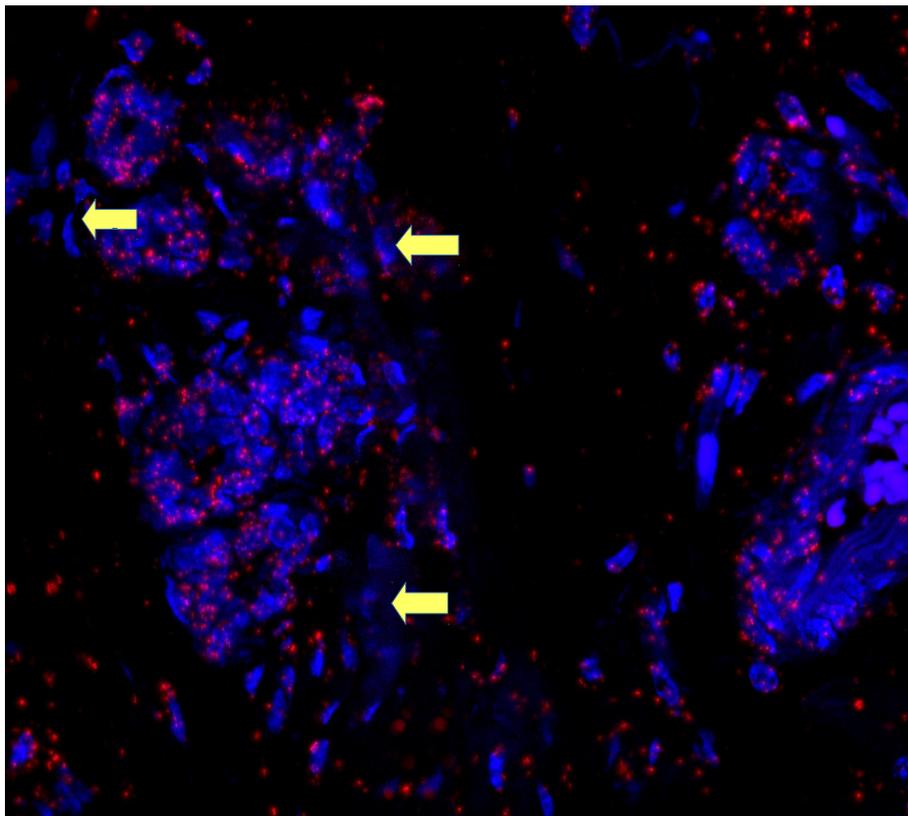


Abb. 3 Bei der Vorbehandlung in der Mikrowelle zerkochtes Gewebe (siehe Pfeile)

6.1.4 Variation der Inkubationszeit beim Blocken

Beim Blocken sollen möglichst alle Antigene, die Ähnlichkeit mit den zu untersuchenden Proteinen aufweisen, gebunden und damit abgesättigt werden. Mit diesem Schritt wird eine unspezifische Anfärbung weitestgehend reduziert. Bei einer Inkubationszeit von 30 min, wie im Protokoll der Firma Olink angegeben, kam es zur

unspezifischen Anfärbung des Hintergrundes (Abb. 4). In den weiteren PLA-Versuchen wurde das Blocken auf 60 min Inkubationszeit ausgedehnt. Im Vergleich zu Versuchen mit 30 min Inkubationszeit zeigte sich dabei eine deutlich reduzierte Hintergrundanfärbung.

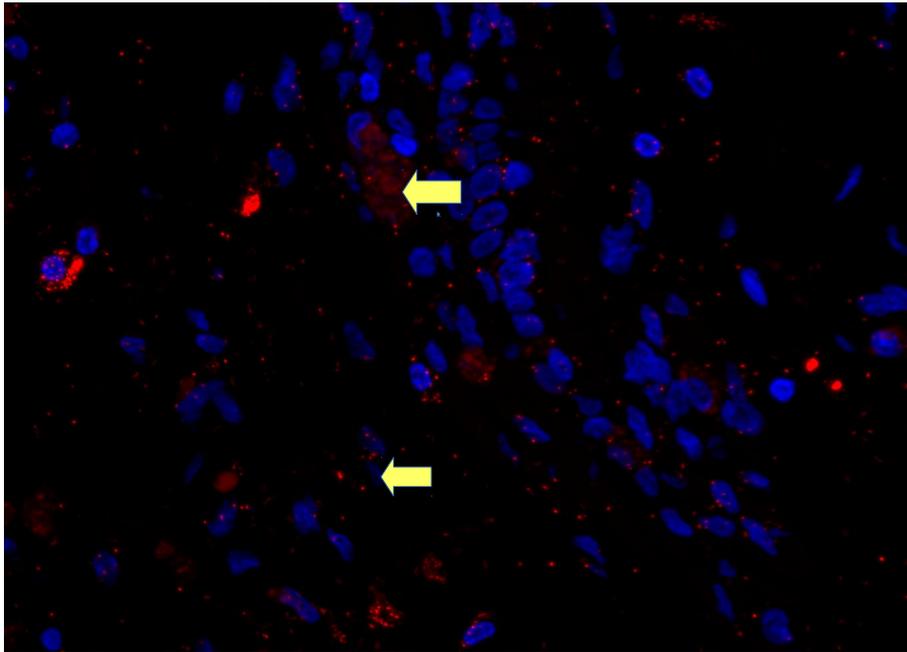


Abb. 4 Gewebeschnitt mit Hintergrundanfärbung (siehe Pfeile)

6.1.5 Variation der Inkubationszeit bei der Amplifikation

Bei Verlängerung der Amplifikationszeit von 90 auf 150 min konnten erste adäquate Ergebnisse erreicht werden. Diese Ergebnisse waren im Folgenden bei gleicher Amplifikationszeit reproduzierbar. Damit konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Amplifikationszeit in Bezug auf Qualität des Ergebnisses der PLA- Färbung eine wichtige Rolle spielt.

Eine Amplifikationszeit von 180 min brachte keine nennenswerten Vorteile. Die Signale konnten zwar minimal besser dargestellt werden, allerdings kam es erneut zu einem unspezifischen Hintergrund und zudem zu einer schlechteren Erhaltung des Gewebes, insbesondere der Zellkerne. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit einer Amplifikationszeit von 150 min erzielt wurden, bot die Amplifikationszeit von 180 min erhebliche Nachteile, sodass im Folgenden 150 min lang amplifiziert wurde. Bei der DNA- Amplifikation wurden zusätzlich noch bessere Ergebnisse erzielt, wenn bei 42°C und nicht wie ursprünglich bei 37°C inkubiert wurde.

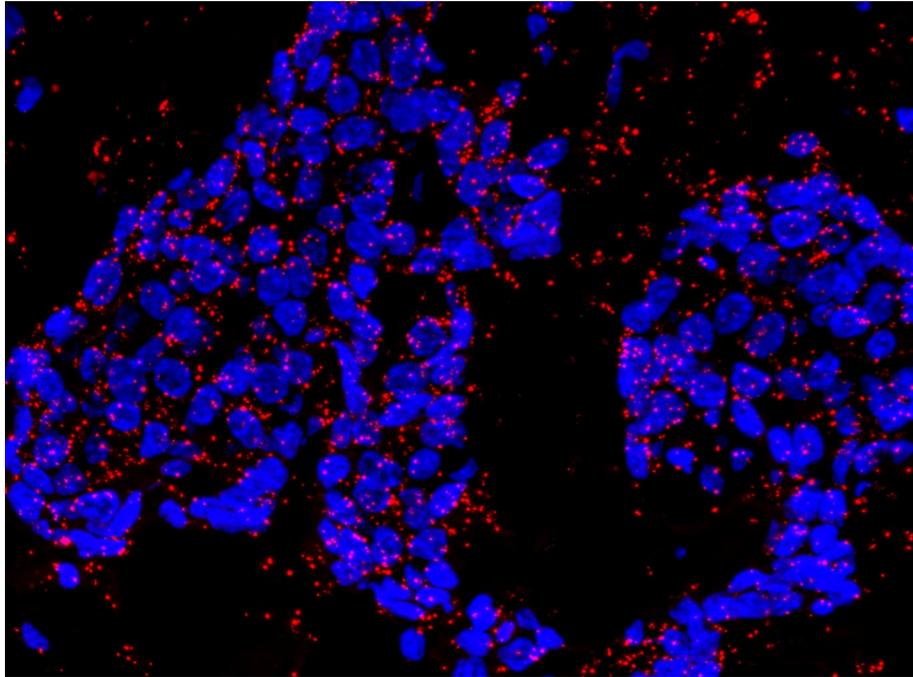


Abb. 5 hohe Anzahl an Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexen

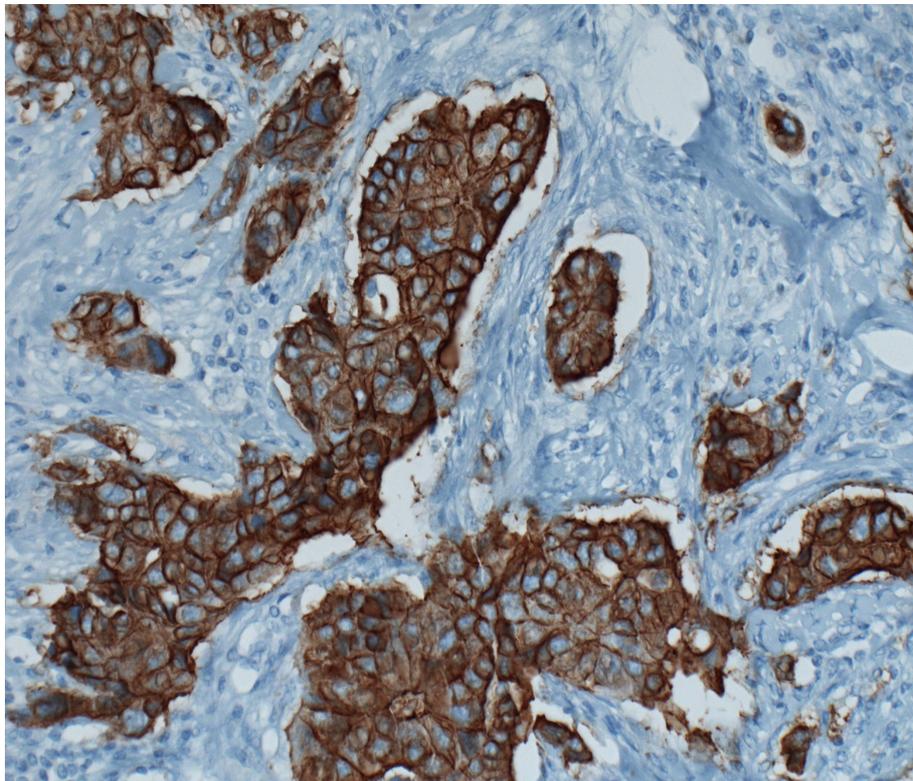


Abb. 6 IHC- Her2/neu 3+

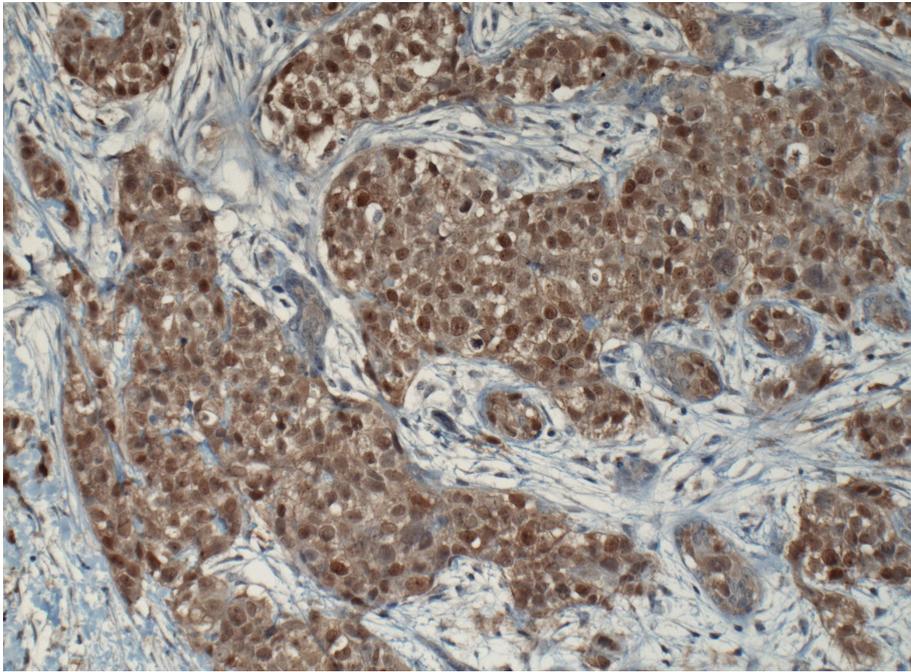
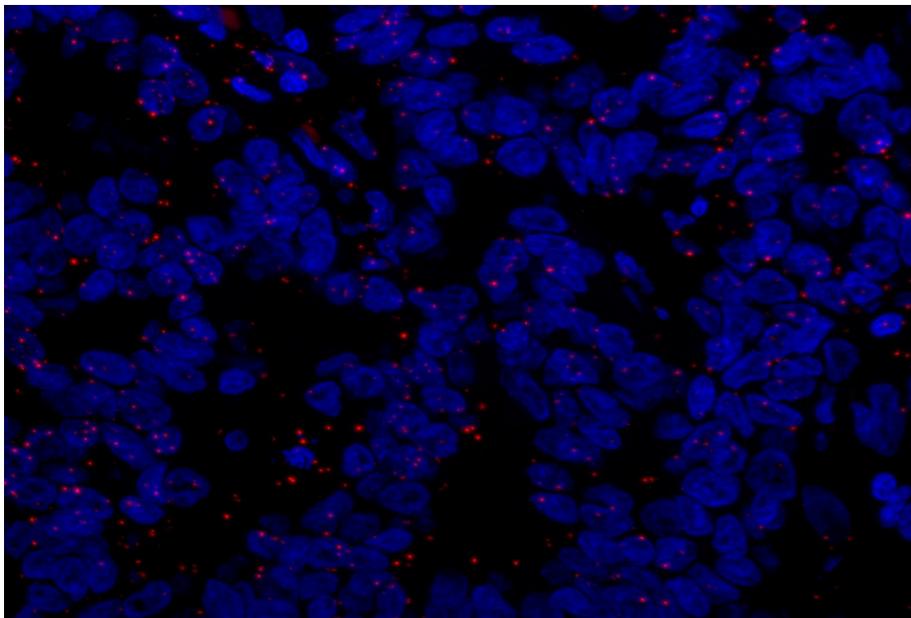


Abb. 7 IHC- PTK6 2+



*Abb. 8 niedrige Expression an Her2/neu- PTK6-
Proteinkomplexen*

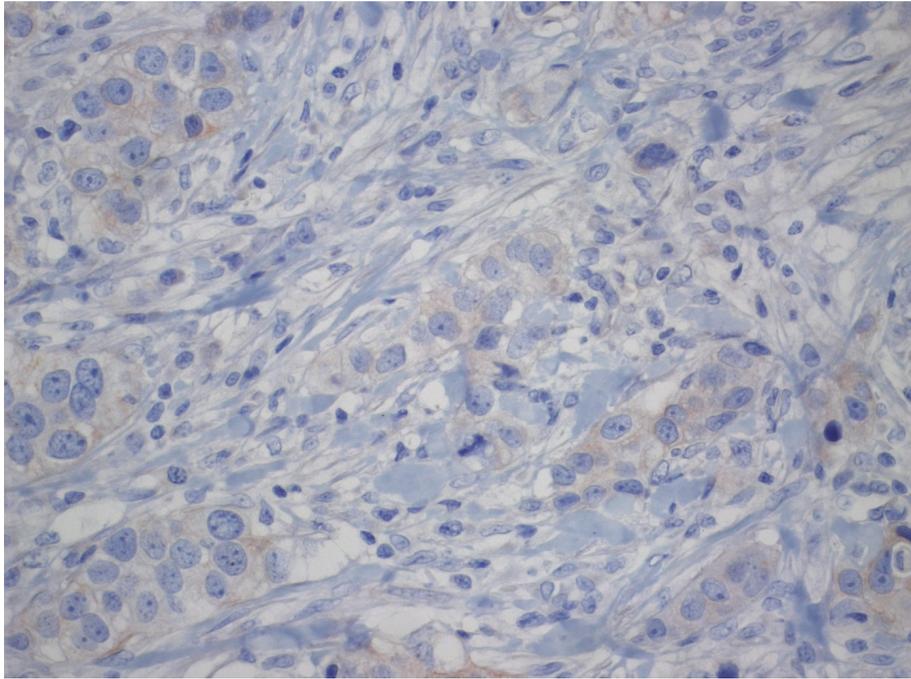


Abb. 9 IHC- Her2/neu 1+ (nur in sehr kleinen Bereichen, ansonsten 0)

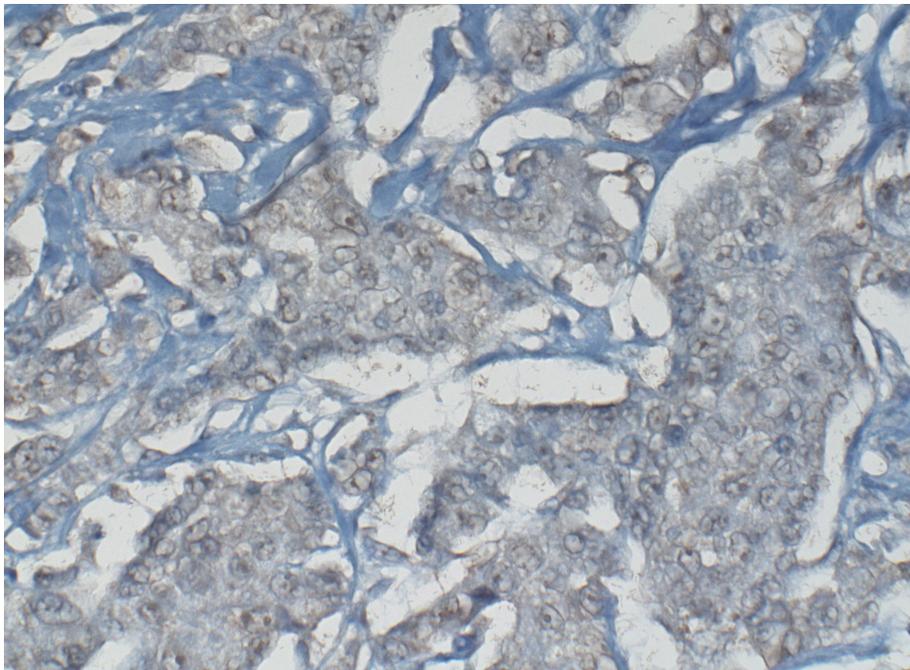


Abb. 10 IHC- PTK6 1+

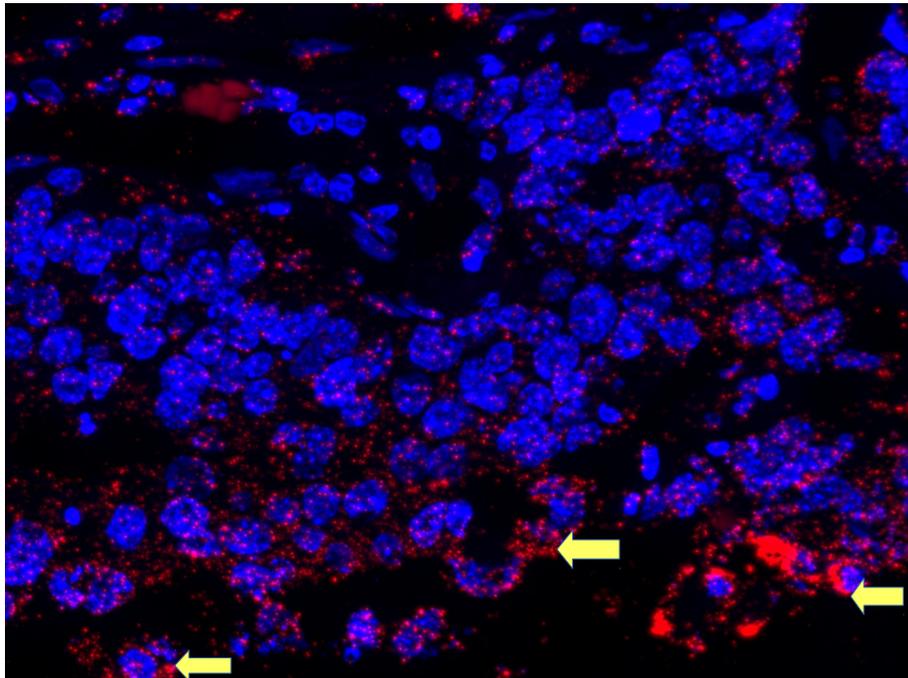


Abb. 11: übersteuerte Anfärbung der Proteinkomplexe (siehe Pfeile) mit viel unspezifischem Hintergrund, Einzelsignale zum Teil nicht mehr auswertbar

6.1.6 Vergleich unterschiedlicher Detection Kits

Bei der Austestung wurde auch das Detection Kit 613 verwendet. Dieser soll laut Beschreibung der Firma OLINK BIOSCIENCE die Zellkerne blau, das Zytoplasma grün und die Signale orange anfärben. Bei der Auswertung am Axio Imager stellte sich heraus, dass die Färbequalität nicht mit dem zuvor verwendeten Detection Kit Nr. 563 zu vergleichen war. Spezifische Signale waren nicht erkennbar, prominent war lediglich eine flächige unspezifische Anfärbung mit den drei Farbstoffen. Deswegen wurden die Präparate, die zur Auswertung herangezogen wurden, mit dem Detection Kit Nr. 563 gefärbt. Bei dieser Färbung mit Detection Kit 563 werden die Zellkerne blau und die Signale rot dargestellt.

6.1.7 Verifizierung der Methode

Die Methode selbst wurde mit der Austestung an der Zelllinie T47D verifiziert. Dafür wurde die PLA-Technik für die Proteine PTK6 und Her2/neu unter den oben ausgetesteten optimierten Bedingungen durchgeführt. Da beide Proteine in dieser permanenten Mammakarzinom-Zelllinie stark exprimiert vorliegen führte die PLA zu reichlich spezifischen Signalen (Abb. 12). Im Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München wird unter anderem mit RNA Interferenz (siRNA, Aubele et al 2010, Ludyga et al. 2011) gearbeitet, was die Herunterregulierung bestimmter Proteine ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielhaft an herunterreguliertem Her2/neu die PLA- Technik durchgeführt. Wie in der unten abgedruckten Abbildung dargestellt führte die Herunterregulierung eines der Proteine zu nur sehr wenigen PLA- Signalen (Abb. 13). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die beiden Proteine PTK6 und Her2/neu interagieren, und dass die PLA- Methode zuverlässig nur zu vielen Signalen führt, wenn auch beide beteiligten Proteine reichlich präsent sind.

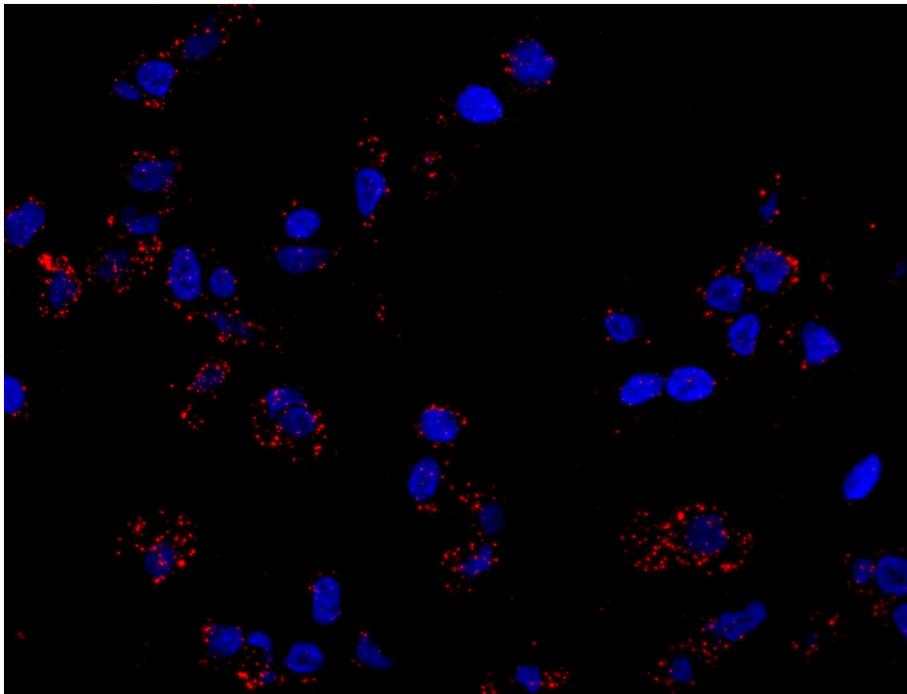


Abb. 12 T47D- Zellen unbehandelt, hohe Anzahl an Signalen

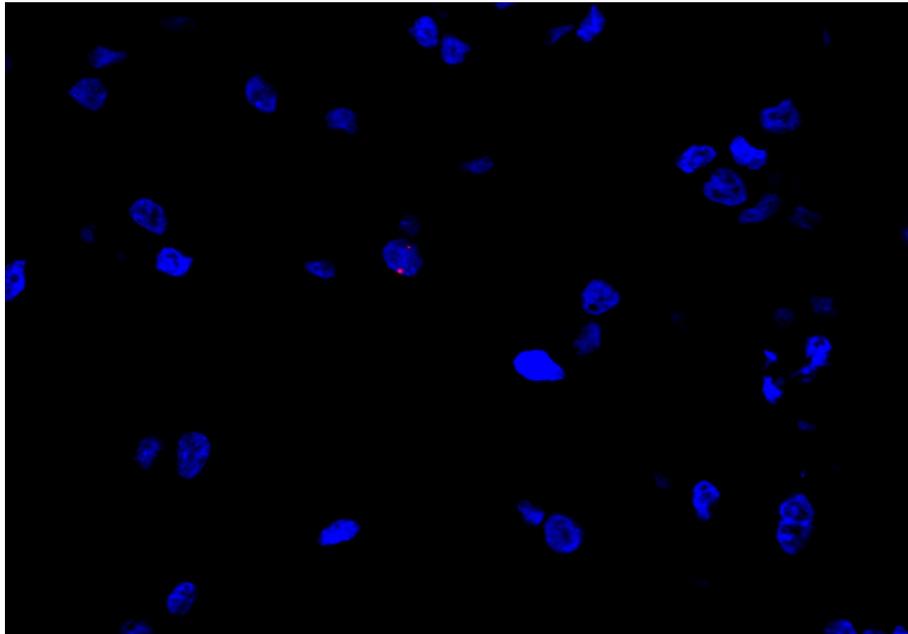


Abb. 13 Her2/neu herunterreguliert an T47D- Zellen, nur sehr wenig Signale

6.2 Ergebnisse an Tumorgeweben

Bei den untersuchten Tumoren handelte es sich um invasive Mammakarzinome vom duktaalen Typ.

Untersucht wurde unter anderem der Zusammenhang der experimentell erhobenen Parameter mit dem metastasenfren Überleben der Patientinnen. Das früheste beobachtete Auftreten von Fernmetastasen fand nach 5 Monaten statt, das späteste nach 240, der Median der Verlaufskontrolle lag bei 139. Insgesamt wurde in 24 von 76 Fällen das Auftreten von Fernmetastasen beobachtet.

Davon maßen 56 Tumore eine Tumogröße ≤ 2 cm (T1), 20 eine Tumogröße > 2 cm (T2). Bei T1 traten in 14 von 19 erwarteten Fällen eine Fernmetastasierung auf, bei T2 in 10 von 5 erwarteten Fällen. Mit $p= 0,0115$ lässt sich eine deutliche Signifikanz zwischen Tumogröße und Auftreten von Fernmetastasen nachweisen.

Zwischen Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung ließ sich ebenso ein signifikanter Zusammenhang herstellen. Bei 49 Tumore waren die Lymphknoten metastasenfren (LN 0), bei 27 hatte bereits ein Befall der Lymphknoten stattgefunden

(LN 1). Bei LN 0 wurden insgesamt 10 Fälle von Fernmetastasierung beobachtet, bei LN 1 kam es zu 14 Fällen von Fernmetastasierung. Es ergibt sich ein p- Wert von 0,00385.

59 Tumore waren Her2/neu- Rezeptor negativ, 17 positiv. In 46 der Tumore wurde eine hohe Expression von PTK6 gefunden, in 28 eine niedrige.

6.2.1 Korrelation der PLA- Ergebnisse

In der Korrelation der Parameter untereinander zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Anzahl an PLA- Signalen ($p= 0,015$).

Tumore > 2 cm zeigten demnach signifikant mehr Signale für Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexe als Tumore ≤ 2 cm.

6.2.2 Korrelation der PLA mit IHC

Bei der Auswertung zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen PLA und IHC von Her2/neu und PTK 6. Für PTK6 zeigte sich $p=0,098$, für Her2/neu $p=0,197$ (Tab. 7).

	IHC Her2/neu	IHC PTK6
PLA	$p=0,0987$	$p=0,1969$

Tab. 7 Korrelation der Anzahl an PLA- Signalen mit den Ergebnissen der IHC

6.2.3 Korrelation der PLA mit klinisch- histologischen Parametern

Folgende histopathologischen Parameter wurden mit den PLA- Ergebnissen korreliert: Lymphknotenstatus, Tumorgröße, Grading nach Elston Ellis sowie Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus. Ein signifikanter Zusammenhang konnte mit der Tumorgröße nachgewiesen werden ($p= 0,015$), alle anderen Parameter wiesen p- Werte $> 0,05$ auf (Lymphknotenstatus $p= 0,479$, Grading $p= 0,159$, Östrogenrezeptorstatus $p= 0,965$, Progesteronrezeptorstatus $p= 0,529$) (Tab.8).

	LN- Status	Tumorgröße	Histolog. Grading	ER-Rezeptor-status	PR-Rezeptor-status
PLA	p=0,479	p=0,015	p=0,159	p=0,965	p=0,529

Tab. 8 Korrelation der Anzahl an PLA- Signalen mit klinischen Parametern

6.3 Korrelation der Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen

6.3.1 Univariate Analyse

Für die univariate Analyse wurde das metastasenfrem Überleben mittels Kaplan-Meier- Kurven dargestellt. Dabei wurden $\leq 0,5$ PLA- Signale pro 1000 Pixel als signalarm gewertet, eine Anzahl von $> 0,5$ PLA- Signalen pro 1000 Pixel galt als signalreich. Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Kaplan-Meier- Kurven wurden mittels Log-Rang- χ^2 - Teste bestimmt.

Bei der Korrelation der einzelnen Parameter mit dem Auftreten von Fernmetastasen zeigten folgende Parameter einen signifikanten Zusammenhang: Lymphknoten-Status (p= 0,00385), Tumorgröße (p= 0,0115), Anzahl der PLA- Signale (p= 0,0122) und IHC PTK6 (p= 0,0184).

Bei Tumoren > 2 cm (T 2) traten bei 50 % der Fälle Fernmetastasen auf. Tumore ≤ 2 cm (T 1) wiesen dagegen in 25 % der Fälle eine Fernmetastasierung auf.

Der Lymphknotenstatus stellt bezüglich des Auftretens von Fernmetastasen nach wie vor den stärksten Prognosefaktor dar. In rund 52 % der Fälle kam es bei bereits stattgefundenen Lymphknotenbefall (LN 1) zur Fernmetastasierung, während im Vergleich dazu lediglich 20 % der lymphknotennegativen Tumore (LN 0) eine Fernmetastasierung aufwiesen (Tab. 5).

Tumore mit einer hohen Anzahl an PLA- Signalen ($\geq 0,5/1000$) zeigten in 50 % der Fälle ein Auftreten von Fernmetastasen. Bei Tumoren mit einer geringen Anzahl an

PLA- Signalen ($\leq 0,5/1000$) ließen sich in rund 21 % der Fälle eine Fernmetastasierung beobachten (Tab. 9).

	PLA $\leq 0,5/1000$	PLA $\geq 0,5/1000$
total	n=48	n=28
Metastasen	n=10	n=14

Tab. 9 Anzahl an signalreichen- bzw. signalarmen Tumoren und damit verbundene Anzahl an Fernmetastasen

Ein signifikanter Zusammenhang ließ sich auch zwischen der PTK6- Expression (IHC) und dem Auftreten von Fernmetastasen erkennen. In 46 % der Fälle kam es bei Tumoren mit einer geringen Expression von PTK6 zu einer Fernmetastasierung. Tumore mit einer hohen Expression von PTK6 wiesen nur in 20 % der Fälle Fernmetastasen auf. (Tab. 10)

	LN- Status	Tumor- größe	Grading	PLA Her2/neu PTK6	IHC Her2/neu	IHC PTK6
Fern- metastasen	p=0,00385	p=0,0115	p=0,4020	p=0,0122	p=0,3640	p=0,0184

Tab. 10 Korrelation zwischen dem Auftreten von Fernmetastasen und klinisch-histologischen Parametern

Kein signifikanter Zusammenhang ließ sich zwischen histologischem Grad ($p= 0,402$) und der Her2/neu- Expression (IHC, $p= 0,364$) und dem Auftreten von Fernmetastasen nachweisen. 15 % aller Grad 1- Tumore wiesen eine Fernmetastasierung auf, rund 37 % Grad 2- Tumore und rund 32 % aller Grad 3- Tumore.

Von den Tumoren mit einer hohen Her2/neu- Expression in der IHC konnten insgesamt bei rund 44 % das Auftreten von Fernmetastasen beobachtet werden.

Tumore mit einer niedrigen Her2/neu- Expression zeigten in 30 % der Fälle eine Fernmetastasierung.

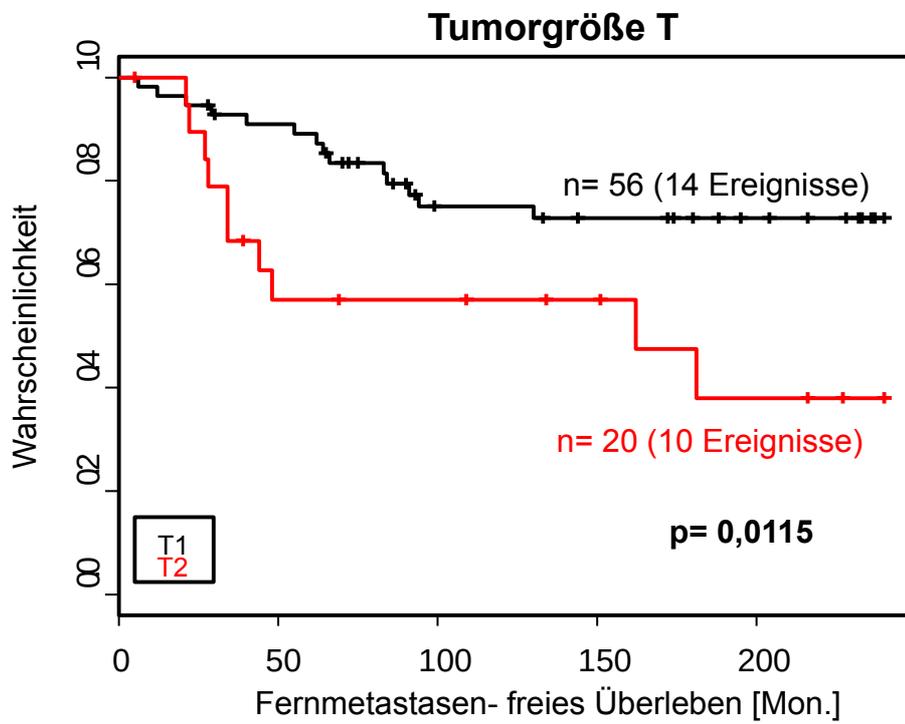


Abb. 14: Kaplan- Meier- Kurve für das fernmetastasen- freie Überleben der Patientinnen, gruppiert nach Tumorgröße ($T1 \leq 2 \text{ cm}$, $T2 > 2 \text{ cm}$)

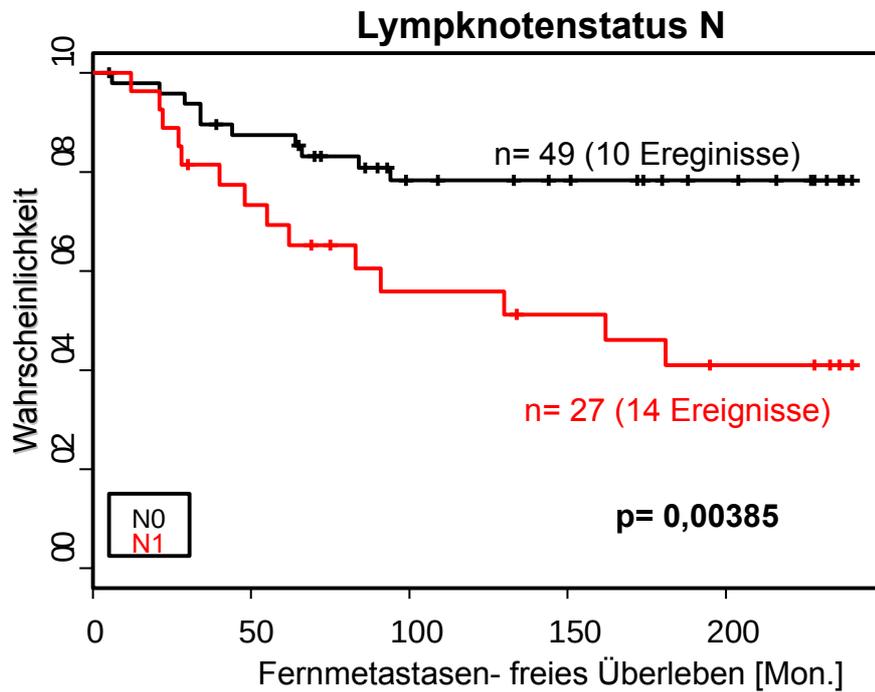


Abb. 15: Kaplan- Meier- Kurve für das fernmetastasen- freie Überleben, unterteilt nach Lymphknotenstatus (N0= keine Lymphknotenmetastasen, N1= Lymphknotenmetastasen)

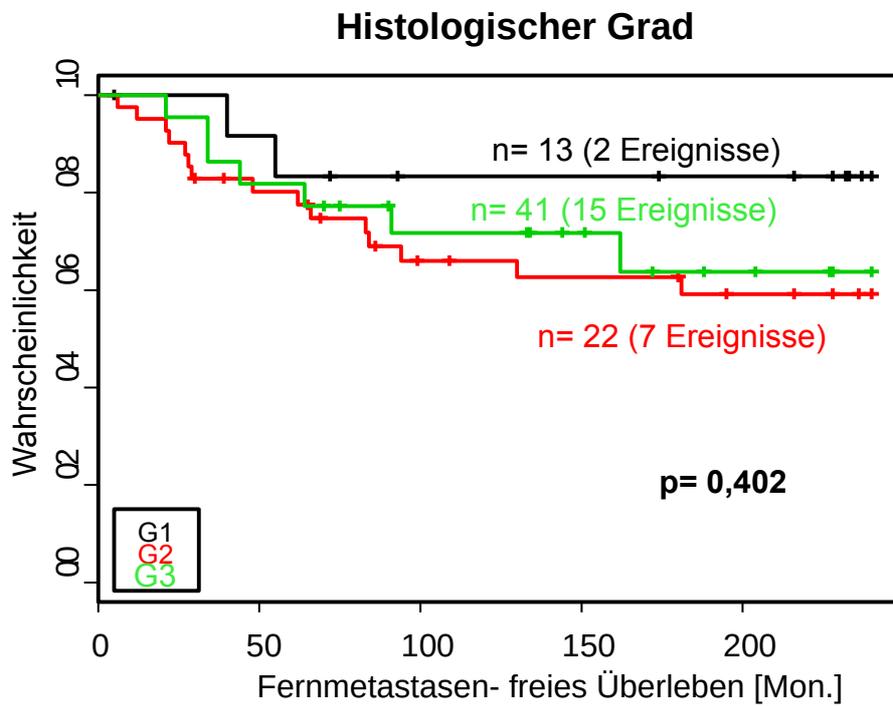


Abb. 16: Kaplan- Meier- Kurve für das fernmetastasen- freie Überleben der Patientinnen, stratifiziert nach histologischem Grad (G1= gut differenziert, G2= mäßig differenziert, G3= schlecht differenziert)

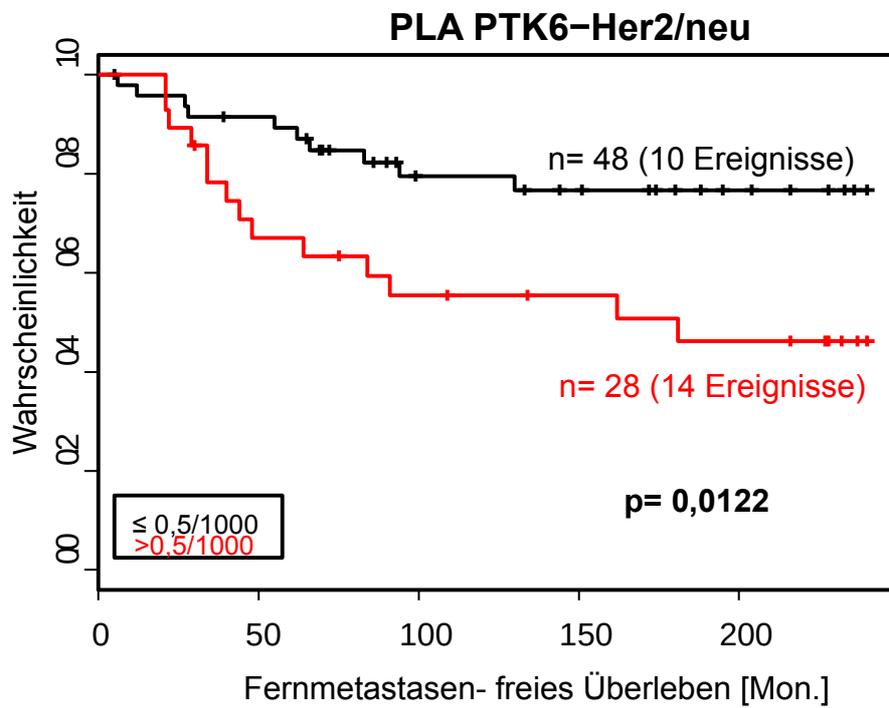


Abb. 17: Kaplan- Meier- Kurve für das fernmetastasen- freie Überleben der Patientinnen, stratifiziert nach histologischem Grad (G1= gut differenziert, G2= mäßig differenziert, G3= schlecht differenziert)

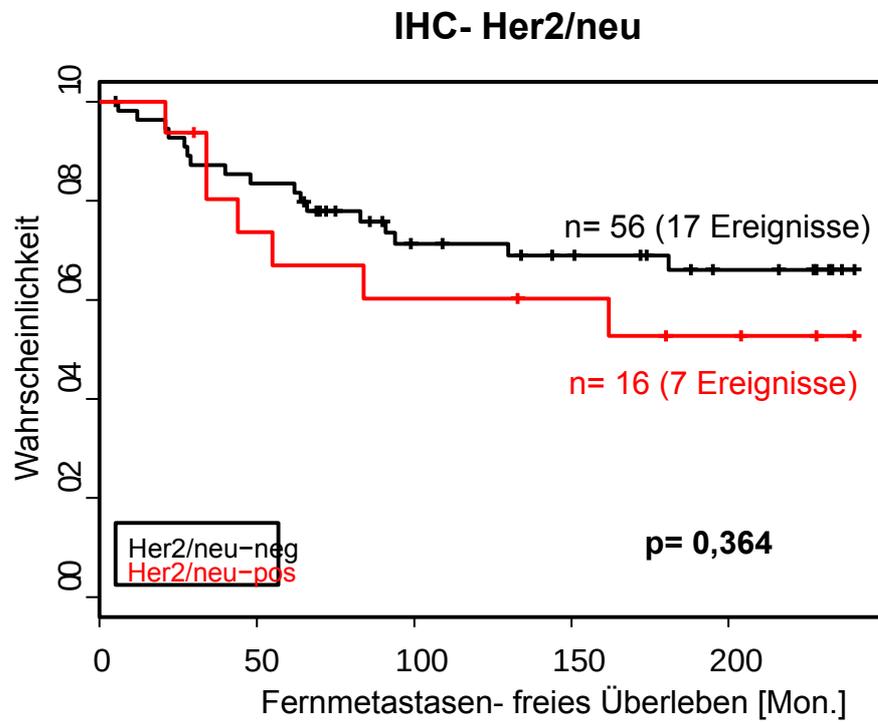


Abb. 18: Kaplan- Meier- Kurve für das fernmetastasen- freie Überleben der Patientinnen, stratifiziert nach Her2/neu- Status (Her2/neu- negativ= IHC 0 bzw. 1+, Her2/neu- positiv= IHC 2+ bzw. 3+)

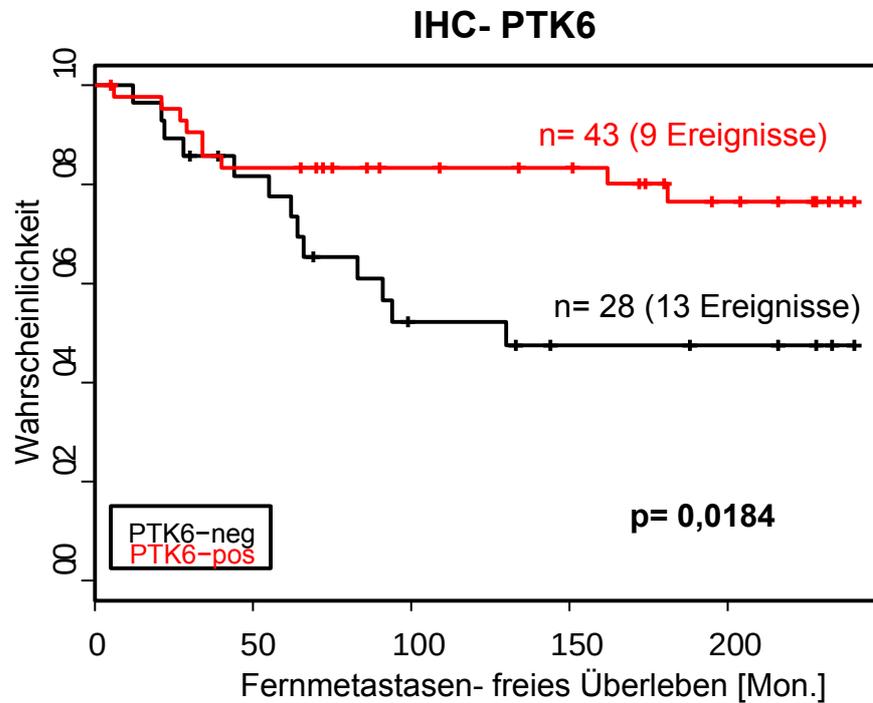


Abb. 19: Kaplan- Meier- Kurve für das fernmetastasen- freie Überleben der Patientinnen, unterteilt nach PTK6- Status (PTK6- negativ= IHC 0 bzw. 1+, PTK6 positiv= IHC 2+ bzw. 3+)

6.3.2 Multivariate Analyse

Multivariat wurden alle untersuchten Parameter, die in den univariaten Analysen $p \leq 0,15$ aufwiesen, zur Analyse zugelassen. Konkret waren dies Tumorgröße, Lymphknotenstatus, IHC- PTK6, IHC- Her4, IHC- Her3 und Anzahl an PLA-Signalen. Hierbei zeigten sich als aussagekräftigster Parameter der Lymphknotenstatus ($p=0.006$), gefolgt von der IHC- PTK6 ($p=0,024$) und der Anzahl der PLA- Signale ($p=0,016$) hinsichtlich des Auftretens von Fernmetastasen (Tab. 11)

	Koeffizient	Risikofaktor	p- Wert
LN	1,17	2,66	0,008
IHC PTK6	-1,24	-2,73	0,006
PLA	1,096	2,48	0,013

Tab. 11: Ergebnis der multivariaten Analyse (Cox- Proportional- Hazard)

PTK6 wies eine inverse Korrelation auf (Regressionskoeffizient -1,24). Dies bedeutet, dass Tumore mit höherer Expression von PTK6 eine geringere Rate an Fernmetastasen aufwiesen als hoch exprimierende Tumore.

Für Lymphknotenstatus und Anzahl der PLA- Signale traf das Gegenteil zu, da sie direkt, also positiv, korreliert sind. Lymphknotenpositive bzw. signalreiche Tumore wiesen ein höheres Risiko für Fernmetastasen auf.

7 DISKUSSION

Das Mammakarzinom stellt weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau dar. Jährlich treten 1 Million Neuerkrankungen auf, pro Jahr verstirbt rund eine halbe Million Frauen an den Folgen ihrer Brustkrebserkrankung. (Bauernfeind et al, 2011) Brustkrebs ist in den letzten Jahren immer stärker ins Zentrum des öffentlichen Interesses gerückt. Die Entstehung eines Mammakarzinoms ist multifaktoriell bedingt, die genaue Ätiologie ist noch unklar (Kiechle 2007). Die Prognose hängt im wesentlichen von der Tumorausbreitung und dem histologischen Typ ab. Für die weitere Therapie ist die Bestimmung des Steroidhormonrezeptorstatus unumgänglich, da sich gezeigt hat, dass hormonrezeptorpositive Tumore vermehrt ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit dem selektiven Östrogen- Rezeptor-Modulator (SERM) Tamoxifen (Nolvadex ®, Istubal ®, Valodex ®, Astrazeneca, London, UK) zeigen.

Bei der adjuvanten, gerichteten Therapie des Mammakarzinoms gibt es zwei Ansätze: die Antihormontherapie und die Anti- Her2/neu- Therapie.

Rund 77 % aller Mammakarzinome zeigen eine hohe Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sodass die grundsätzliche Bestimmung des Steroidhormonrezeptorstatus durchaus berechtigt ist (Bauernfeind 2011). Für die Therapie des hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms steht der SERM Tamoxifen als Mittel der ersten Wahl zur Verfügung. Tamoxifen bindet an den Östrogenrezeptor und führt dort zu einer Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung bedingt die Inhibition der Transkription Östrogengekoppelter Gene und wirkt letztlich proliferationshemmend auf östrogensensitive Mammakarzinomzellen (Ring und Dowsett 2004). In einer Metaanalyse konnte die Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group bei einer 5 Jahre andauernden Therapie mit Tamoxifen eine Reduktion des Rezidivrisikos um 39 % nachweisen. (Davies et al. 2011). Voraussetzung für ein Ansprechen auf Tamoxifen und das reduzierte Rezidivrisiko war die Expression von Östrogenrezeptoren. Dennoch zeigte sich, dass es bei rund 40 % aller mit Tamoxifen adjuvant behandelten Patientinnen

zum Auftreten eines Rezidivs kam. (Ring und Dowsett 2004). Die genauen Ursachen für diese Resistenzentwicklung sind noch unklar. Mutationen im Östrogenrezeptor, pharmakologische Toleranzentwicklung, eine höhere Metabolisierung von Tamoxifen, gesteigerte Expression von co-regulatorischen Proteinen des Östrogenrezeptors und Interaktionen zwischen Östrogenrezeptoren und EGF/Her2/neu- und IGF- Rezeptoren und den damit verbundenen Signalwegen werden diskutiert. (Ring und Dowsett 2004).

Zur Antihormontherapie zählen ebenfalls die Aromataseinhibitoren, die direkt in die Biosynthese von Steroidhormonen eingreifen und die Synthese von Östrogen reduzieren. Zur Therapie des metastasierten, hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms sind aktuell Anastrozol (Arimidex ®, AstraZeneca, London, UK), Letrozol (Femara ®, Novartis Oncology, Basel, Schweiz) und Exemestan (Aromasin ®, Pfizer, Berlin, Deutschland) zugelassen. Aromataseinhibitoren sind gut verträglich und zeigen im Vergleich zu Tamoxifen ähnliche klinische Wirksamkeit. Verglichen mit Tamoxifen kommt es bei Letrozol zu einem geringeren Auftreten von Rezidiven (Chumsri et al. 2011). Allerdings lässt sich auch bei den Aromataseinhibitoren eine Resistenzentwicklung beobachten. Lediglich 26 % aller Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen sprechen auf eine Therapie mit Aromataseinhibitoren an (Chumsri et al 2011).

Die zweite Möglichkeit einer gerichteten Therapie des Mammakarzinoms stellen die Her2/neu- Antikörper dar. Trastuzumab (Handelsname Herceptin ®) war der erste der Her2/neu- Antikörper, der zur Therapie des metastasierten Mammakarzinoms zugelassen wurde, inzwischen wurden weitere entwickelt und auf den Markt gebracht.

Rund 25 % aller Mammakarzinome zeigen eine gesteigerte Expression von Her2/neu, was in den meisten Fällen mit einem aggressiveren Verlauf und einer schlechteren Prognose einhergeht (Hsieh, Moasser 2007). Mit dem monoklonalen Her2/neu- Antikörper Trastuzumab liegt eine potente Therapie des metastasierten, Her2/neu- positiven Mammakarzinoms vor. Trastuzumab bindet an die extrazelluläre Domäne von Her2/neu und wirkt proliferationshemmend auf Her2/neu-exprimierende Zellen (Harries und Smith 2002). Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom profitieren nachweislich von der Therapie mit Trastuzumab,

allerdings sprechen initial nur rund 20 bis 30 % von ihnen auf Trastuzumab an. Von diesen 30 % entwickeln wiederum rund 30 % im Laufe der Therapie eine sekundäre Resistenz. Dadurch wird deutlich, dass die bisherigen therapeutischen Maßnahmen für die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms noch nicht ausreichend sind und weitere Möglichkeiten erforscht werden müssen. Möglicherweise liegt die Zukunft in einer Kombination mit Trastuzumab und seinen Äquivalenten. Weitere therapeutische Alternativen sind gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung.

Der monoklonale Her2/neu- Antikörper Pertuzumab (Perjeta ®, Omnitarg ®, Genentech, South San Francisco, USA) bindet ebenfalls extrazellulär an Her2/neu, inhibiert die Ausbildung von Heterodimeren zwischen Her2/neu und anderen Her-Rezeptoren und unterbricht somit den Phosphoinositid- 3- Kinase (PI3K)/Akt- und MAPK- Signalweg und wirkt proliferationshemmend auf Mammakarzinomzellen. (Tsang et al. 2012, Nahta et al. 2004). Die Kombination von Trastuzumab und Pertuzumab zeigte einen deutlichen synergistischen Effekt der beiden Therapeutika (Nahta et al. 2004). Pertuzumab stellt eine weitere Option zur Therapie des metastasierten, Her2/neu- positiven Mammakarzinoms dar.

Mit Lapatinib (Tyverb ®, GlaxoSmithKline plc., London, UK) steht eine weitere Therapieoption des metastasierten Her2/neu- positiven Mammakarzinoms zur Verfügung. Lapatinib ist ein dualer Tyrosinkinase- Inhibitor, der an EGFR- 1 und Her2/neu bindet und die Signaltransduktion inhibiert sowie die Apoptose im Tumorgewebe induziert (Nahta et al. 2007). Patientinnen, die nach Trastuzumabtherapie eine Progression ihrer Brustkrebserkrankung aufweisen, zeigen durchwegs ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Lapatinib (Tinoco et al. 2012, Tsang et al. 2012). Konecny et al. konnten eine gesteigerte proliferationshemmende Wirkung bei der Kombination von Lapatinib und Trastuzumab in Mammakarzinom- Zelllinien nachweisen (Konecny et al. 2006). Bei einer Kombinationstherapie von Lapatinib und Trastuzumab konnte zudem ein längeres metastasenfreies Überleben im Vergleich zur Monotherapie mit Lapatinib beobachtet werden (Nahta 2012).

Ein weiterer Ansatz, um das Problem der Trastuzumab- Resistenz zu umgehen, besteht mit Trastuzumab emtansine (Genentech, South San Francisco, USA). Dabei

liegt Trastuzumab an das zytotoxische Mikrotubulin DM1 gebunden vor. Trastuzumab fungiert hier lediglich als Transportmolekül von DM1 in die Her2/neu-positive Zelle. In klinischen Studien zeigte sich ein gutes Ansprechen von Patientinnen mit metastasiertem Her2/neu-positiven Mammakarzinom auf Trastuzumab emtansine (Tinoco et al. 2013).

Mit den hier besprochenen Therapeutika stehen viel versprechende Alternativen zu Trastuzumab zur Verfügung. Dennoch ist in Anbetracht der Rate nichtansprechender Tumore und der Resistenzen die Suche nach weiteren Zielmolekülen dringend angezeigt.

In rund 2/3 aller Mammakarzinome ist eine Überexpression von PTK6 nachweisbar, während PTK6 in gesundem Mammagewebe nur gering oder gar nicht exprimiert ist (Kang 2010). Die genaue Funktion von PTK6 im Gewebe ist derzeit Gegenstand mehrerer Studien. Nachgewiesen ist eine Steigerung der Proliferation im Gewebe von Mammakarzinomen durch Interaktion zwischen PTK6 und EGF (Ostrander 2011). Damit stellt PTK6 neben Her2/neu einen neuen Angriffspunkt zur Therapie des Mammakarzinoms dar.

In früheren Arbeiten konnten bereits Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Her2/neu und PTK6 beim Mammakarzinom gefunden werden (Aubele et al. 2005, Aubele et al. 2007, Aubele et al. 2008, Kamalati et al. 1996, Ostrander et al. 2010). Born et al. gelang es 2005 einen Zusammenhang zwischen der Expression von Her2/neu und PTK6 im Gewebe von Mammakarzinomen nachzuweisen (Born et al. 2005). Dieser Zusammenhang wurde in dieser Arbeit detaillierter mittels der PLA-Technik untersucht.

Ein wichtiger methodische Ansatz dieser Arbeit war die bessere Etablierung und Optimierung der PLA- Technik.

Die PLA- Technik wurde 2006 von Söderberg et al. erstmals zur Detektion von Proteinkomplexen beschrieben (Söderberg et al 2006). Sie wurde damals zum Nachweis von c- Myc und Max- Proteinkomplexen an einer humanen Fibroblasten-Zelllinie (GM08402) und Gefrierschnitten von Kolongewebe, Tonsillengewebe und

Burkitt- Lymphomgewebe durchgeführt (Söderberg 2006). Mit dieser Technik kann die Interaktion zwischen zweier in unmittelbarer Nachbarschaft liegender Proteine sichtbar gemacht werden. Voraussetzung dafür sind allerdings die Verwendung zweier spezifischer, in unterschiedlichen Spezies gezogener primärer Antikörper, welche an die jeweiligen Proteine binden. Desweiteren ist eine enge örtliche Nähe zwischen den beiden Proteinen Voraussetzung, damit es zur Ligation und im weiteren präparatorischen Verlauf zur DNA- Amplifikation der an die Antikörper gekoppelten Oligonukleotide kommen kann. Mit der DNA- Amplifikation wird das resultierende Fluoreszenz-Signal so verstärkt, dass auch geringe Mengen an Proteinen nachgewiesen werden können. Mit der PLA- Technik können also spezifisch die Interaktionen zwischen zwei benachbarten Proteinen bzw. die Ausbildung von Proteinkomplexen nachgewiesen werden. Wichtigster Punkt jedoch ist, dass dieser Nachweis - der bislang zwar experimentell z.B. in Zellkultur durch Immunpräzipitation u.a. möglich war - nun mittels PLA-Technik in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten möglich ist. Dies eröffnet ein riesiges neues Anwendungsgebiet in der Proteinanalyse im Gewebeschnitt. Söderberg et al. untersuchten mit der PLA- Technik die Interaktion zwischen c-Myc/Max- Proteinen. (Söderberg et al. 2006), andere Gruppen untersuchten damit die Interaktion zwischen PSA und α 1- Protease- Inhibitor (Zhu et al. 2009), zwischen VEGF- A und VEGF1- Rezeptor und VEGF2- Rezeptor (Gustafsdottir et al. 2008), zwischen EGF- Rezeptor und Her2/neu bzw. Her3 im Gewebe von Mammakarzinomen (Leuchowius et al. 2013), Fibroblast Growth- Factor (FGF1)- Rezeptoren und Serotoninrezeptoren in Serotoninzellen in den Raphekernen (Borrito- Escuela et al. 2012) untersucht. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Ausbildung von Proteinkomplexen zwischen Her2/neu und PTK6 im Gewebe von invasiven duktalem Mammakarzinomen anhand der PLA- Methode dargestellt werden und mit der vorliegenden klinischen Verlaufskontrolle von über 20 Jahren auf Korrelation getestet werden. Leuchowius et al. untersuchten mithilfe der PLA- Technik die Interaktion zwischen EGFR, Her2/neu und Her3 in Zelllinien und Gefrierschnitten von Mammakarzinomen, der Fokus dabei lag auf dem Nachweis der Ausbildung von Proteinkomplexen zwischen EGFR, Her2/neu und Her3. Die Ergebnisse der PLA- Färbungen wurden mit den Ergebnissen der Her- immunhistochemischen Färbungen

verglichen. Gewebe mit einem Ergebnis von 2 + oder 3 + in der IHC zeigten bei Leuchowius et al. auch eine höhere Anzahl an PLA- Signalen (Leuchowius et al. 2013). Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag hauptsächlich im Nachweis von Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexen mittels PLA- Technik und die Untersuchung der klinischen Relevanz, was mit den vorliegenden Daten aus der rund 240 Monate langen Verlaufszeit untersucht werden konnte.

Mittels dieser Technik konnten in der vorliegenden Arbeit Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexe nachgewiesen werden. Die Zuverlässigkeit und Glaubwürdigkeit dieser Methode wurde an einer permanenten Mammakarzinom- Zelllinie (T47D) bestätigt. Die PLA- Färbung der unbehandelten Zelllinie, die Her2/neu und PTK6 hoch exprimiert, zeigte reichlich Signale, nach Herunterregulierung eines der Proteine jedoch nur mehr vereinzelte Signale. Damit wurde die Glaubwürdigkeit und die Zuverlässigkeit und der Methode nachgewiesen.

Bei der Korrelation der PLA- Ergebnisse zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Anzahl der PLA- Signale. Tumore mit einer Größe über 2 cm wiesen eine höhere Anzahl an PLA- Signalen auf. Damit lagen in größeren Tumoren auch mehr Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexe vor. Zwischen Anzahl der PLA- Signale und Lymphknotenstatus, histologischem Grad sowie Hormonrezeptorstatus ließ sich kein signifikanter Zusammenhang nachweisen.

In univariater Analyse zeigte sich bei einer hohen Anzahl an PLA- Signalen (> 0,5/1000 Pixel) ein vermehrtes Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen. In 50 % der Fälle kam es bei signalreichen Tumoren zur Fernmetastasierung, während signalarme Tumore lediglich in 21 % der Fälle eine Fernmetastasierung aufwiesen. Damit kann gezeigt werden, dass die PLA- Technik über bedeutende prognostische Relevanz verfügt. So könnte sie in Zukunft zur verbesserten Einteilung in Risikogruppen herangezogen werden.

In der univariaten Analyse konnte zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der PTK- Expression in der IHC und dem Auftreten von Fernmetastasen nachgewiesen werden. Eine geringe Expression von PTK6 ging mit einem erhöhten

Risiko für Fernmetastasen einher. 46 % aller Patientinnen mit einer geringen Expression von PTK6 erlitten Fernmetastasen, während lediglich 20 % der Patientinnen mit einer hohen Expression von PTK 6 das Auftreten von Fernmetastasen aufzeigten. Eine hohe Expression von PTK6 ist demnach als prognostisch günstig anzunehmen, während eine niedrige Expression auf eine schlechtere Prognose hindeutet. Somit könnte PTK6 in Zukunft als prognostischer Marker beim Mammakarzinom an Bedeutung gewinnen.

Aktuell werden zur Einteilung in Risikogruppen nach der St. Gallen Konsenskonferenz 2005 die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus, der histologische Grad, der Steroidrezeptor- Status, die Her2/neu- Expression sowie das Alter herangezogen (Goldhirsch et al. 2007).

Die Her2/neu- Expression wird üblicherweise mittels Immunhistochemie dargestellt. Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Anzahl der PLA- Signalen und dem Auftreten von Fernmetastasen ($p= 0,012$). 50 % der Tumore mit einer hohen Anzahl an PLA- Signalen zeigten im Verlauf das Auftreten von Fernmetastasen. Im Vergleich dazu zeigte sich zwischen PTK6 IHC und dem Risiko einer Fernmetastasierung ein etwas geringere Signifikanz ($p= 0,018$). Tumore mit einer Her2/neu IHC von 2+ und 3+ zeigten in 44 % der Fälle das Auftreten einer Fernmetastasierung. In Anbetracht dieser Ergebnisse kann gesagt werden, dass die PLA- Technik im Vergleich zur gängigen Immunhistochemie hinsichtlich ihrer prognostischen Aussagekraft präziser ist und in Zukunft möglicherweise eine wichtige Rolle in Differenzierung und Therapieplanung spielen kann. Verglichen mit Tumorgröße und Lymphknotenstatus zeigte sich die PLA- Methode hinsichtlich ihrer Aussagekraft für das Risiko einer Fernmetastasierung univariat nicht überlegen, sondern wies ähnliche Ergebnisse auf. Rund 50 % aller Tumore T2 zeigten während der 240 Monate langen Verlaufszeit das Auftreten von Fernmetastasen, sowie 52 % der Tumore mit bereits stattgehabten Lymphknotenbefall. Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Anzahl der Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexe in der PLA- Färbung unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aussagekraft nur geringfügig, während die Immunhistochemie der PLA- Methode unterlegen ist. Es ist denkbar, dass sich die PLA- Technik in Zukunft als standardmäßiges Verfahren zur Feststellung der Her2/neu- PTK6- Status für die

weitere Therapieplanung etabliert und möglicherweise an die Stelle der Immunhistochemie treten kann.

In der multivariaten Analyse zeigte sich als aussagekräftigster Parameter hinsichtlich des Auftretens von Fernmetastasen der Lymphknotenstatus, gefolgt von der Expression von PTK6 in der IHC und die Anzahl an PLA- Signalen. In die multivariate Analyse wurden außerdem die Tumorgröße, der histologische Grad, der Hormonrezeptorstatus und die Expression von Her2/neu in der IHC mit einbezogen. Von all diesen Parametern rangierte die Anzahl der PLA- Signale bezüglich ihrer Aussagekraft beim Auftreten von Fernmetastasen an dritter Stelle und ergänzte somit signifikant die prognostische Aussagekraft von Nodalstatus und PTK6-IHC. Damit zeigt sich, dass die PLA- Technik auch im Vergleich mit bereits bekannten und gut erprobten Parametern besteht und in Zukunft als prognostisches Mittel an Bedeutung gewinnen kann. Zudem bietet sich mit dem Nachweis der Her2/neu-PTK6- Proteinkomplexe im Gewebe metastasierender Mammakarzinome ein neues, vielversprechendes Therapieziel.

Mit dieser Arbeit wurde die Markierung dieser Proteinkomplexe mithilfe der PLA-Färbung und ihre Korrelation mit dem Auftreten von Metastasen nachgewiesen.

Die Her2/neu- Expression wird üblicherweise mittels immunhistochemischen Verfahren dargestellt. Mit der PLA- Färbung existiert nun eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexen im Paraffin- fixierten Gewebe von Mammakarzinomen.

Es ist denkbar, dass diese Methode in Zukunft bei der Therapieplanung von Mammakarzinomen zur Anwendung kommt.

Die in dieser Arbeit dargestellte Interaktion zwischen Her2/neu und PTK6 sowie deren prognostische Bedeutung kann einerseits eine bessere Differenzierung von Risikopatientinnen erlauben, zusätzlich aber auch Basis für weitere Forschungen sein. So könnten die Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexe neue Angriffsmöglichkeiten für Therapeutika darstellen und wären damit eine Alternative zu Her2/neu- Antikörpern und Anti- Östrogenen.

Abschließend kann gesagt werden, dass die PLA- Technik und die in dieser Arbeit damit nachgewiesene Interaktion zwischen Her2/neu und PTK6 im Gewebe invasiver Mammakarzinome sowie deren signifikanter Zusammenhang mit dem metastasenfrien Überleben eine vielversprechende Rolle in der Brustkrebsforschung spielen wird.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Für die vorliegende Arbeit wurde das in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe von 80 invasiven duktalem Mammakarzinomen untersucht. Von den Tissue Micro Arrays wurden 5 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt und mittels PLA-Technik gefärbt. Mit der PLA-Methode können Proteinkomplexe spezifisch markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Spezifität dieser Methode wird durch die Verwendung zweier in unterschiedlichen Spezies gezogener primärer Antikörper gewährleistet. Zudem müssen die Proteine sich in unmittelbarer Nähe zu einander befinden, damit die DNA-Amplifikation zwischen den an die Sekundär-Antikörper gekoppelten Oligonukleotide stattfinden kann.

In dieser Arbeit wurde das Vorliegen von Proteinkomplexen zwischen Her2/neu und PTK6 im Gewebe invasiver duktalem Mammakarzinome und deren klinische Relevanz untersucht.

Die Glaubhaftigkeit der PLA-Methode wurde an einer Mammakarzinomzelllinie (T47D), an der eines der Proteine herunterreguliert worden war, bestätigt. Die herunterregulierten Zellen wiesen deutlich weniger PLA-Signale auf, als die unbehandelten Zellen.

Für die insgesamt 76 untersuchten Mammakarzinome lagen die Verlaufsdaten für einen Zeitraum von über 20 Jahren vor.

Ein signifikanter Zusammenhang zeigte sich univariat in Bezug auf das metastasenfrem Überleben für den Lymphknotenstatus, die Tumorgröße, die Anzahl der PLA-Signale und die IHC-PTK6. Tumore mit einer hohen Anzahl an PLA-Signalen, also einem hohen Anteil an Proteinkomplexen zwischen Her2/neu und PTK6, wiesen in rund 50 % der Fälle das Auftreten von Metastasen auf. Bei Tumoren mit einer geringen Anzahl an PLA-Signalen kam es nur in 20 % zu einer Fernmetastasierung. Ähnliches zeigte sich für Lymphknotenstatus (LN 1 52 %, LN 0 20 %), Tumorgröße (T 2 50 %, T 1 25 %) und IHC PTK6 (PTK6 pos. 20 %, PTK6 neg. 46 %).

Multivariat waren der Lymphknoten Status, die PTK6-IHC und die Anzahl der PLA-Signale signifikant. Hierbei zeigte PTK6 eine inverse Korrelation mit dem Auftreten von Fernmetastasen, wonach also eine hohe Expression von PTK6 für ein geringeres Risiko einer Fernmetastasierung spricht, während das Risiko bei einer geringen Expression von PTK6 deutlich erhöht ist. Eine direkte, also positive, Korrelation hingegen bestand für den Lymphknotenstatus und die Anzahl der PLA-Signale. In beiden Fällen gilt ein positiver Status bzw. eine hohe Anzahl an Signalen als prognostisch ungünstig und deutet auf ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen hin. Zu betonen wäre hier jedoch, dass die Anzahl an PLA-Signalen, also die Anzahl Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexen, im histologischen Schnitt die prognostische Aussage signifikant verbessern konnte.

Anhand der hier gewonnenen Ergebnisse könnte in Zukunft die PLA-Technik und damit der Nachweis von Proteinkomplexen auch für die Therapieplanung beim Mammakarzinom diskutiert werden.

Mit den Her2/neu- Antikörpern (Trastuzumab und weitere) und der Antihormontherapie (Tamoxifen) existieren bereits gut erprobte und vor allem gut wirksame Therapieschemata. Allerdings ist die Rate an Therapieversagen alarmierend und macht die Suche nach neuen möglichen Zielmolekülen notwendig. Mit dem Nachweis der klinischen Relevanz der Her2/neu- PTK6- Proteinkomplexe im Gewebe metastasierender invasiver Mammakarzinome ist möglicherweise eine weitere Alternative diesbezüglich vorhanden.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Aubele M., Walch A.K., Munro A., Atkinson M.J., Braselmann H., Fornander T., Bartlett J.M.S

PTK (protein tyrosine kinase)-6 and HER2 and 4, but not HER1 and 3 predict long-term survival in breast carcinomas

British Journal of Cancer (2007) 96, 801 – 807

Aubele M., Walch A.K., Ludyga N., Braselmann H., Atkinson M.J., Lubner B., Auer G., Tapio S., Cooke T., Bartlett J.M.S.

Prognostic value of protein tyrosine kinase 6 (PTK6) for long-term survival of breast cancer patients

British Journal of Cancer (2008) 99, 1089 – 1095

Aubele M., Spears M., Ludyga N., Braselmann H., Feuchtinger A., Taylor K.J., Lindner K., Auer G., Stering K., Höfler H., Schmitt M., Bartlett J.M.S.

In situ quantification of HER2–protein tyrosine kinase 6 (PTK6) protein–protein complexes in paraffin sections from breast cancer tissues

British Journal of Cancer (2010) 103, 663 – 667

Barrett C., Magee H., O’Toole D., Daly S., Jeffers M.

Amplification of the HER2 gene in breast cancers testing 2+ weak positive by HercepTest immunohistochemistry: false-positive or false-negative immunohistochemistry?

J Clin Pathol (2007) 60:690–693

Bauernfeind I., Tumorzentrum München

Manual Mammakarzinome

(Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag, München, 2011, 13. Auflage

Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U.

“Pathologie“

(Hrsg.), Urban & Fischer., München, Jena, 2004, 3. Auflage, S. 987 – 996

Born M., Quintanilla- Fend L., Braselmann H., Reich U., Richter M. Hutzler P., Aubele M.

Simultaneous over-expression of the Her2/neu and PTK6 tyrosine kinases in archival invasive ductal breast carcinomas

J Pathol 2005; 205: 592–596

Borroto- Escuela D., Romero- Fernandez R., Pérez- Alea M., Narvaez M., Tarakanov A., Mudó G., Agnati L., Ciruela F., Belluardo N., Fuxe K.
The existence of FGFR1-5-HT1A receptor heterocomplexes in midbrain 5-HT neurons of the rat: relevance for neuroplasticity
The Journal of Neuroscience (2012) 32(18):6295– 6303

Carmichael A. R.
Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer
BJOG (2006) 113:1160–1166

Carney W. P. Leitzel K., Ali S., Neumann R., Lipton A.
HER-2/neu diagnostics in breast cancer
Breast Cancer Res. (2007) 9 (3):207

Casalini P., Iorio M. Galmozzi E., Ménard S.
Role of HER receptor family in development and differentiation
Journal of cellular physiology (2004) 200: 343–350

Chen W.
Postmenopausal Hormone Therapy and Breast Cancer Risk: Current Status and Unanswered Questions
Endocrinol Metab Clin North Am. (2011) 40(3): 509–518

Chumsri S., Howes T., Bao T., Sabnis G., Brodie A.
Aromatase, Aromatase Inhibitors and Breast Cancer,
J Steroid Biochem Mol Biol. (2011) 125(1-2): 13–22

Cottin C., Döhler S.
"Risikoanalyse"
Vieweg+Teubner Wiesbaden, 2009, 1. Auflage, 276 - 278

Davies C., Godwin J., Gray R., Clarke M., Cutter D., Darby S., McGale P., Pan H.C., Taylor C., Wang Y.C., Dowsett M., Ingle J., Peto R., for Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group
Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials
Lancet (2011) 378(9793): 771–784

Gajria D., Chandarlapaty S.
HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies
Expert Rev Anticancer Ther. (2011) 11(2): 263–275

Goldhirsch A., Wood W., Gelber R., Coates A., Thürlimann B., Sellin H.-J.
Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007
Ann. Oncol. (2007) 18: 1133–1144

Grizzle W.E.
Models of fixation and tissue processing
Biotech. Histochem. (2009) 84(5): 185 – 193

Gustafsdottir S., Schallmeiner E., Fredriksson S., Gullberg M., Söderberg O., Jarvius M., Jarvius J., Howell M., Landegren U.
Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses
Analytical Biochemistry 345 (2005) 2-9

Gustafsdottir S., Wennström S., Fredriksson S., Schallmeiner E., Hamilton A., Sehti S., Landegren U.
Use of proximity ligation to screen for inhibitors of interactions between vascular endothelial growth factor A and its receptors
Clinical Chemistry (2008) 54:7 1218 - 1225

Harries M., Smith I.
The development and clinical use of Trastuzumab (Herceptin)
Endocrine- related cancer (2002) 9 75 – 85

Hsieh A. C., Moasser M. M.
Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non- target HER3
Br. J. Cancer (2007) 97 (4): 453–7

Janni W.
Manual of Recommendations for the Diagnosis, Therapy, and Follow-Up of Patients with Breast Cancer of the Tumor Center Munich – a Regional Hands-On Publication
Breast Care (2008) 3:100–107

Kamalati T., Jolin H., Mitchell P., Barker K., Jackson L., Dean C., Pagei M., Gusterson B., Crompton M.
Brk, a Breast Tumor-derived Non-receptor Protein-tyrosine Kinase, Sensitizes Mammary Epithelial Cells to Epidermal Growth Factor
The Journal of Biological Chemistry (1996) Vol. 271, No. 48, Issue of November 29, pp. 30956–30963

Keefe D. L.
Trastuzumab- associated cardiotoxicity,
Cancer (2002) 95(7):1592-60

Key T., for the Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group
Body Mass Index, Serum Sex Hormones and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women
Journal of the National Cancer Institute (2003) Vol. 95, No. 16

Kiechle M.
"Gynäkologie und Geburtshilfe"
(Hrsg.), Urban & Fischer, München, Jena, 2007, 1. Auflage, S. 553 – 576

Kvåle G., Heuch I.
Menstrual factors and breast cancer risk
Cancer 62 (1988) 1625-1631

Lahman P., Lissner L., Gullberg B., Olsson H., Berglund G.
A prospective study of adiposity and postmenopausal breast cancer risk: The Malmö Diet and Cancer Study
Int. J. Cancer (2003), 103, 246–252

Laloo F., Evans DG
Familial Breast Cancer
Clinical Genetics 2012; 82: 105 – 114

Leuchowius K.-J., Clausson C.-M., Grannas K., Erbilgin Y., Botling J., Zieba A., Landegren U., Söderberg O.
Parallel visualization of multiple protein complexes in individual cells in tumor tissue
Molecular & Cell Proteomics (2013), Digitale Veröffentlichung vor Druckversion

Lofgren K.A., Ostrander J.H., Housa D., Hubbard G.K., Locatelli A., Bliss R.L., Schwertfeger K.L., Lange C.A.

Mammary gland specific expression of Brk/PTK6 promotes delayed involution and tumor formation associated with activation of p38 MAPK

Breast Cancer Res. (2011) 13(5):R89

Luo J., Horn K., Ockene J., Simon M., Stefanick M., Tong E., Margolis K.

Interaction Between Smoking and Obesity and the Risk of Developing Breast Cancer Among Postmenopausal Women

Am. J. Epidemiol. (2011) 174(8):919–928

Ludyga N, Anastasov N, Gonzalez-Vasconcellos I, Ram M, Höfler H, Aubele M

Impact of Protein Tyrosine Kinase 6 (PTK6) on Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) Signalling in Breast Cancer.

Mol BioSyst (2011) 7(5): 1603-1612

Ludyga N., Anastasov N., Rosemann M., Seiler J., Lohmann N., Braselmann H., Mengele K., Schmitt M., Höfler H., Aubele M.

Effects of Simultaneous Knockdown of HER2 and PTK6 on Malignancy and Tumor Progression in Human Breast Cancer Cells

Mol Cancer Res (2013) 1–12

MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J

Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk.

Int. J. Cancer (1982) (30) 427- 431

Mendelsohn J., Baselga J.

The EGF family as targets for cancer therapy

Oncogene (2000) 19, 6550-6565

Mitchell P.J., Sara E.A., Crompton M.R.

A novel adaptor-like protein which is a substrate for the non-receptor tyrosine kinase, BRK Oncogene (2000) 19(37):4273-82

Nahta R.

Molecular Mechanisms of Trastuzumab- based treatment in HER2- overexpressing breast cancer

ISRN Oncology Volume (2012) Volume 2012

Nahta R., Hung M.-C., Esteva F.

The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically

Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells
Cancer Research 64 (2004) 2343–2346

Nahta R., Yuan L., Du Y., Esteva F.
Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling
Mol. Cancer Ther. (2007) 6(2):667–74

Nelson H.D., Zakher B., Cantor A., Fu R., Griffin J., O'Meara E.S., Buist D., Kerlikowske K., van Ravesteyn N., Trentham-Dietz A., Mandelblatt J., Miglioretti D.
Risk Factors for Breast Cancer for Women age 40 to 49: A Meta- Analysis
Ann. Int. Med. (2012) 156(9): 635–648

Newcomb P.A., Trentham-Dietz A., Hampton J.M., Egan K.M., Titus-Ernstoff L., Warren S., Andersen S., Greenberg E.R., Willett W.C.
Late age at first full- term birth is strongly associated with lobular breast cancer
Cancer (2012) 117(9): 1946–1956
Ostrander J.H., Daniel A.R., Lange C.A.
Brk/PTK6 Signaling in Normal and Cancer Cell Models
Curr. Opin. Pharmacol. (2010) 10(6):662-9

Piccart-Gebhart M. J., Procter M., Leyland-Jones B., Goldhirsch A., Untch M., Smith I., Gianni L., Baselga J., Bell R., Jackisch C., Cameron D., Dowsett M., Barrios C., Steger G., Huang C-S., Andersson M., Inbar M., Lichinitser M., Lang I., Nitz U., Iwata H., Thomssen C., Lohrisch C., Suter T.M., Ruschoff J., Sutoy T., Greatorex V., Ward C., Straehle C., McFadden E., Dolci M.S., Gelber R. D.
Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer
N. Engl. J. M. (2005) 353;16

Ritterswürden D.
Mammakarzinom: Histopathologische und prognostische Bedeutung der Gene HER-2/neu, GRB-7 und PTK-6
Dissertation am Institut für Pathologie der TU München, 2009

Rayson D, Richel D., Chia S., Jackisch C., van der Vegt S., Suter T.
Anthracycline–trastuzumab regimens for HER2/neuoverexpressing breast cancer: current experience and future strategies
Annals of Oncology (2008) 19: 1530–1539

Rexer B., Arteaga C.
Intrinsic and Acquired Resistance to HER2-Targeted Therapies in HER2 Gene-Amplified Breast Cancer: Mechanisms and Clinical Implications
Crit. Rev. Oncol. (2012) 17(1): 1–16

Ring A., Dowsett M.
Mechanisms of Tamoxifen Resistance
Endocrine- related Cancer (2004) 11 643–658

Robert Koch- Institut
Krebs in Deutschland 2007/2008
8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012

Roussow J., Anderson G., Prentice L., LaCroix A., Kooperberg C., Stefanick M., Jackson R., Beresford S., Howard B., Johnson K., Kotchen J., Ockene J. For the American Medical Association
Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women,
JAMA (2002) (288) 321 – 333

Russo J., Moral R., Balog G., Mailo D., Russo I.
The protective role of pregnancy in breast cancer
Breast Cancer Research (2005) 7:131-142

Seidmann A., Hudis C., Pierri M. K., Shak S., Paton V., Ashby M., Murphy M., Stewart S. J., Keefe D.
Cardiac dysfunction in the Trastuzumab clinical trials experience
J. Clin. Oncol. (2002) 20 (5):1215-21

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind,
TNM. Classification of Malignant Tumours.
7th ed. New York: Wiley.Ch (2009).

Söderberg O., Gullberg M., Jarvius M., Ridderstråle K., Leuchowius K.-J., Jarvius J., Wester K., Hydbring P., Bahram F., Larsson L.-G., Landegren U.
Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation Nature Methods (2006) Vol. 3. No.12 995-1000

Söderberg O., Leuchowius K.-J., Gullberg M., Jarvius M., Weibrecht I., Larsson L.-G., Landegren U.

Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the *in situ* proximity ligation assay,

Methods 45 (2008) 227-232

Tavassoli FA, Devilee P.

World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Femal Genital Organs.

IARC Press, Lyon, 2003, S. 9-112

Testino G.

The burden of cancer attributable to alcohol consumption

Maedica- A Journal of Clinical Medicine (2011) Volume 6 No. 4

Tinoco G., Warsch S., Glück S., Avancha K., Montero A.J.

Treating Breast Cancer in the 21st Century: Emerging Biological Therapies

J. Cancer (2013) 4(2):117-32

Tsang R. Y., Finn R. S.

Beyond Trastuzumab: novel therapeutic strategies HER2- metastatic breast cancer

British Journal of cancer (2012) 106, 6 –13

Ziegler A., Lange S., Bender R.

Überlebenszeitanalyse: Der Log- Rang- Test

Dtsch. Med. Wochenschr. (2007) 132: e39 – 41

Ziegler A., Lange S., Bender R.

Überlebenszeitanalyse: Die Cox- Regression

Dtsch. med. Wochenschr. (2007) 132: e42- e44

Ziegler A., Lange S., Bender R.

Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan- Meier- Methode

Dtsch. med. Wochenschr. (2007) 132: e36–e38

Zhu L., Koistinen H., Landegren U., Stenman U.-H.

Proximity Ligation Measurement of the Complex between Prostate Specific Antigen and α 1-Protease Inhibitor

Clinical Chemistry (2009) 55:9 166

10 ANHANG

10.1 *Klinische Daten zu den Patientinnen*

	Anzahl
Histologie invasiv duktales Karzinome	80
Tumorgröße T 1 T 2	56 20
Lymphknotenstatus LN 0 LN 1	49 27
Histologischer Grad Grad 1 Grad 2 Grad 3	13 41 22
Her2/neu Her2 neg. (0, 1+) Her2 pos. (2+, 3+)	59 17
PTK6 PTK6 neg. (0) PTK6 pos. (1+, 2+, 3+)	28 46
Auftreten von Fernmetastasen	24

10.2 *pTNM- Klassifikation*

Die pTNM- Klassifikation ermöglicht eine Stadieneinteilung von Tumoren. Folgende Kriterien werden hierfür zu Rate gezogen: die Tumorgröße (T), der Lymphknotenstatus (N) und die Fernmetastasierung (M) (Sobin et al. 2009).

Tumor (T)

pTis	präinvasives Karzinom (Carcinoma in situ) ohne Durchbrechung der Basalmembran
pT0	keine histologische Evidenz für Malignität
pT1	Tumorgröße 2 cm oder weniger
pT2	Tumorgröße zwischen 2 und 5 cm
pT3	Tumorgröße über 5 cm

pT4	direkte Beteiligung von Haut oder Brustwand unabhängig von der Ausdehnung des Tumors
pTx	Beurteilung des Primärtumors nicht möglich

Lymphknotenstatus (N)

pN0	keine Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 4 oder weniger ipsilateralen axillären Lymphknoten, davon keine mehr als 3 cm Durchmesser
pN2	Metastasen in 5 oder mehr ipsilateralen axillären Lymphknoten, größer als 3 cm im größten Durchmesser oder ipsilateral der A. thoracica interna

Fernmetastasen (M)

pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar

10.2.1 WHO- Klassifikation invasiver Mammakarzinome (WHO 2003)

- Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified (NOS):
 - gemischter Typ
 - pleomorphes Karzinom
 - Karzinom mit osteoklastenartigen Riesenzellen
 - Karzinom mit chorionkarzinomartigen Merkmalen
 - Karzinom mit melanotischen Merkmalen
- Invasives lobuläres Karzinom
- tubuläres Karzinom
- invasives kribriiformes Karzinom
- medulläres Karzinom
- muzinöses Karzinom und andere muzinreiche Tumoren:
 - muzinöses Karzinom
 - Zystadenokarzinom und zylinderezelliges muzinöses Karzinom
 - Siegelringzell- Karzinom
- neuroendokrine Tumoren:
 - solides neuroendokrines Karzinom
 - atypischer Karzinoidtumor
 - kleinzelliges Karzinom
 - großzelliges neuroendokrines Karzinom
- invasives papilläres Karzinom
- invasives mikropapilläres Karzinom

- apokrines Karzinom
- metaplastische Karzinome:
 - rein epitheliale metaplastische Karzinome
 - (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom mit Spindelzell- Metaplasie, adenosquamöses Karzinom, mukoepidermoides Karzinom)
 - gemischtes epithelial-/ mesenchymales metaplastisches Karzinom
- lipidreiches Karzinom
- sekretorisches Karzinom
- onkozytäres Karzinom
- adenoid- zystisches Karzinom
- Azinuszell- Karzinom
- glykogenreiches Klarzellkarzinom
- sebazeöses Karzinom
- inflammatorisches Karzinom

10.3 Reagenzien

Citratpuffer

10 mM; pH 6,0

9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B auf 500 ml mit MilliQ- Wasser auffüllen

Stammlösung A

19,2 g (0,1 M) Zitronensäure in 1000 ml MilliQ- Wasser. Bei 4°C lagern

Stammlösung B

29,4 g (0,1 M) Natriumcitrat- Dihydrat in 1000 ml MilliQ- Wasser. Bei 4°C lagern

TBS-T

8,8 g NaCl, 1,2 g Trisbase und 0,5 µl Tween 20 in 800 ml MilliQ- Wasser lösen und anschließend mit HCl auf pH 7,4 einstellen. Danach mit MilliQ- Wasser auf 1000 l auffüllen und durch einen 0,22 µm Filter steril filtern.

SSC 20x

17,5 g NaCl und 8,8 g Na- Citrat in 800 ml MilliQ- Wasser lösen, PH auf 7,0 mit HCl einstellen und auf 1000 ml mit MilliQ- Wasser auffüllen.

Duolink in situ PLA

Für die PLA- Färbung wurden die Duolink in situ PLA- Reagenzien der Firma OLINK Bioscience verwendet. Die Duolink PLA probes bestanden aus anti- rabbit PLUS und anti- mouse MINUS, blocking stock, Antibody Diluent stock, außerdem wurde der Duolink Detection kit 563, der den Hybridization stock, den Ligation stock, den Amplification stock, die Polymerase und den Detection stock beinhaltet, verwendet.

Antikörper

Für PTK6 wurde ein polyklonaler Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnologie von der Spezies Kaninchen mit der Spezifität für Brk (c-18) human in der Verdünnung 1: 50, für HER2 ein monoklonaler Antikörper von der Firma Novocastra

mit der Spezies Maus mit der Spezifität c- erbB2- Onkoprotein (interne Domäne) human verwendet.

10.4 Protokoll IHC (Ventana Medical Systems Inc., USA)

Vorbereitung

Beschriftung der OT mit Etiketten

Entparaffinierung

Hitzevorbehandlung

Behandlung mit Cell Conditioning 1- Pufferlösung (CC1)

manuelle Titration Primärantikörper (150 µl pro OT)

Inkubation für 1 h bei RT

manuelle Titration der Sekundärantikörper

Inkubation 32 min bei RT

Färbung mit 3,3'- Diaminobenzidin (DAB), Inkubation 8 min

Gegenfärbung mit 1 Tropfen Hämatoxylin, Inkubation 4 min

Nachfärbung mit 1 Tropfen Bluing Reagent (Ventana Medical Systems Inc., USA),
Inkubation 4 min

Waschen der OT

Einlegen in aufsteigende Alkoholreihe (EtOH 70 %, EtOH 90 %, EtOH absolut, Xylol
für jeweils 2x2 min)

zum Abschluss Bedeckung mit Eindeckmedium (Eukitt, O. Kindler GmbH & Co.,
Freiburg, Deutschland) und Abschluss mit Deckgläschen

Aushärtung im Brutschrank bei +60°C über Nacht

10.5 Protokoll PLA

Entparaffinieren

Xylol 2x 30 min
EtOH absolut 2x 2 min
EtOH 90 % 2 min
EtOH 70 % 2 min
Ampuwa

Oberflächenbehandlung

Kochen der OT in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 1000 W für 30 min
Anschließend im Citratpuffer (pH 6,0) bei Raumtemperatur für 20 min lagern

Glycin- Behandlung

TBS 50 ml + Glycin 3-4 Tropfen bei RT für 5 min
TBS 50 ml + Glycin 3-4 Tropfen bei RT für 5 min
TBS bei RT bis zum Blocken

Blocken

20 µl Blocking- Lösung + 80 µl Ampuwa
Inkubation bei +37°C für 1 h in der feuchten Kammer (im Originalprotokoll Inkubation für 30 min.)

Primärantikörper (PTK6 1:50, HER2 1:7)

20 µl antibody diluent + 2µl PTK6 + 14,4 µl HER2 + 64 µl Ampuwa

Negativ- Kontrolle: 20 µl antibody diluent + 80 µl Ampuwa

Vorinkubation bei 20 min RT, anschließend Inkubation in der feuchten Kammer bei 4°C über Nacht
Danach waschen in TBS- T 2x5 min auf dem Shaker

PLA- Sonden

20 µl antibody diluent + 40 µl Ampuwa + 20 µl PLA probe mouse + 20 µl PLA probe rabbit

Inkubation in der feuchten Kammer bei +37°C für 2 h

anschließend waschen in TBS- T 2x5 min auf dem Shaker

Hybridisierung

20 µl Hybridisierungslösung + 80 µl Ampuwa

15 min Vorinkubation bei RT, im Anschluss Inkubation in der feuchten Kammer bei +37°C für 60 min (im Originalprotokoll der Firma Olink Inkubation für 15 min)

anschließend waschen in TBS- T für 2x5 min auf dem Shaker (im Originalprotokoll der Firma Olink Waschen für 2x2 min.)

Ligation

20 µl Ligationslösung + 78 µl Ampuwa + 2,6 µl Ligase

Vorinkubation 15 min bei RT, dann Inkubation in der feuchten Kammer bei +37°C für 20 min (im Originalprotokoll der Firma Olink Inkubation für 15 min)

anschließend waschen in TBS- T für 2x2 min auf dem Shaker

Amplifikation

78,4 µl Ampuwa + 20 µl Amplifikationslösung + 1,4 µl Polymerase

Vorinkubation 15 min bei RT, dann Inkubation in der feuchten Kammer bei +42°C für 150 min (im Originalprotokoll der Firma Olink Inkubation bei +37°C für 90 min.)

anschließend waschen in TBS- T für 2x2 min auf dem Shaker

Detektion

80 µl Ampuwa + 20 µl Detektionslösung

Vorinkubation bei RT für 15 min, dann Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C für 60 min

Finale

waschen in SSC 2x, SSC 1x, SSC 0,2x, SSC 0,02x für jeweils 2 min, dann in 70 % EtOH für 20 s

abschließend trocknen auf dem Heizblock bei 37°C, Eindeckung mit Vectashield (Vector Lab., Inc., USA) und Umrandung mit klarem Nagellack zum luftdichten Abschluss

11 DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön gilt **Frau Prof. Dr. Michaela Aubele**, die mir nicht nur das Thema zur Verfügung stellte, sondern mir während der gesamten Zeit umfassend und mit viel Geduld ihre Unterstützung zukommen ließ. Besonders beim Schreiben der Arbeit stand sie mir mit Rat und Tat zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Ich möchte ihr ganz besonders für die vielen Stunden ihrer Zeit, ihre Geduld und ihre motivierende Unterstützung aus ganzem Herzen danken.

Frau Katrin Lindner danke ich besonders für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Präparation der histologischen Schnitte für die PLA und IHC sowie ihre Hilfsbereitschaft, die sie mir immer zuteilwerden ließ.

Herrn Herbert Braselmann gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Erstellung der statistischen Auswertung.

Herrn Andreas Voss danke ich für die Einführung in die Handhabung des Axio Imagers.

Ein herzliches Danke geht auch noch an alle Korrekturleser.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich nach Kräften unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Ohne euch wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt bin.

12 LEBENS LAUF

Geburtstag und -ort

07.04.1987 in Leoben/ Österreich

Schul Ausbildung

09/97 – 07/05

Bundesgymnasium Judenburg, mit Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Note 1,25)

Hochschulausbildung

10/05 – 04/08

Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Ludwig- Maximilians- Universität München

03/08

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3)

04/08 – 12/12

Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Technischen Universität München

12/12

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3)

Beruflicher Werdegang

seit 07/13

Assistenzärztin an der Klinik für Unfall-, Wiederherstellungs- und Handchirurgie
Klinikum Augsburg