

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Korrelation eines neuen tumorassoziierten Glykopeptids TA-MUC1 mit
dem
Follow-Up von Brustkrebs-Patientinnen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Peter Fries
aus Köln

Mainz den 28.11.2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachterin: Prof. Dr. W. Brenner

2. Gutachter: Univ.-Prof. E. Schmitt

Tag der Promotion: 28.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1 Brustkrebs	2
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
2.1.3 Diagnostik	3
2.1.4 Klassifikation und Stadien-Einteilung	4
2.1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren	7
2.1.6 Therapie.....	8
2.2 Tumorimmunologie und -Immuntherapie.....	10
2.2.1 Die immunologische Situation im Tumor	10
2.2.2 Immuntherapeutische Ansätze	13
2.3 Muzine	16
2.3.1 Die Familie der Muzine – Biologie, Funktion und Besonderheiten	16
2.3.2 Muzine und Krebs	20
2.4 MUC1	22
2.4.1 MUC1 in Krebs	22
2.4.2 MUC1 als Tumorantigen.....	24
2.4.3 Die Identifizierung des neuen tumorassoziierten Glykopeptids TA-MUC1.....	25
2.5 Zielsetzung der Dissertation	29
3. Material und Methoden	30
3.1 Materialien	30
3.2 Methoden	33
3.2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung	33
3.2.2 Immunhistochemie	33
3.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	38
3.2.4 Statistische Auswertung	46
4. Ergebnisse.....	48
4.1 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs.....	48
4.2 TA-MUC1-Expression im Mammakarzinom	52
4.3 Korrelation zwischen der Gesamtexpression von TA-MUC1 und histopathologischen Tumormerkmalen.....	57
4.4 Korrelation zwischen der subzellulären Expression von TA-MUC1 und histopathologischen Tumormerkmalen.....	63

4.5 TA-MUC1 in Bezug auf die Prognose des Mammakarzinoms	78
4.5.1 Einfluss von TA-MUC1 auf das Gesamtüberleben.....	78
4.5.2 Einfluss von TA-MUC1 auf das Metastasenfreie-Überleben	86
4.5.3 Einfluss von TA-MUC1 auf das Krankheitsfreie-Überleben.....	93
5. Diskussion	122
5.1 TA-MUC1 ist ein tumorspezifischer und sensitiver Marker im Mammakarzinom.....	122
5.2 TA-MUC1 als Marker im Vor- und Frühstadium des Mammakarzinoms	124
5.3 Bedeutung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 im Mammakarzinom	126
5.4 Zusammenhang zwischen Tumorbiologie und TA-MUC1-Expression im Mammakarzinom	128
5.4 TA-MUC1 als unabhängiger Prognostikator des Mammakarzinoms.....	131
5.5 Die Bedeutung von TA-MUC1 im triple-negativen Mammakarzinom.....	140
6. Fazit und Ausblick.....	144
7. Zusammenfassung	146
8. Literaturverzeichnis	148
9. Lebenslauf	160
10. Danksagung	160

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung nach T-Stadium (Größe und Ausdehnung des Primärtumors).....	5
Tabelle 2: Einteilung nach Nodalstatus (Zahl und Lage befallender Lymphknoten).....	6
Tabelle 3: Einteilung nach Metastasen-Status.....	7
Tabelle 4: Stadieneinteilung nach UICC/ AJCC.....	7
Tabelle 5: Verwendete Geräte mit Hersteller.....	30
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller.....	30
Tabelle 7: Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Hersteller.....	31
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien mit Ref.-Nr. und Hersteller.....	31
Tabelle 9: Verwendeter Primärantikörper.....	32
Tabelle 10: Follow-Up: Patientenbezogen-Daten.....	48
Tabelle 11: Follow-Up: Tumorbezogene-Daten.....	49
Tabelle 12: Follow-Up: Daten zum klinischen Verlauf.....	51
Tabelle 13: Follow-Up: Überleben- und Prognose-Daten.....	51
Tabelle 14: Vergleich der Überlebensraten in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression.....	78
Tabelle 15: Multivariate-Cox-Regression: Vergleich der Sterberaten unterschiedlicher Einflussfaktoren.....	79
Tabelle 16: Vergleich der Überlebensraten in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression, unterteilt nach subzellulärem-Verteilungsmuster.....	81
Tabelle 17: Vergleich der Überlebensraten unterteilt nach subzellulärer TA-MUC1-Expression.....	84
Tabelle 18: Multivariate Cox-Regression: Einfluss des subzellulärem Expressionsmusters auf das MFS (cyt vs. Restliche).....	91
Tabelle 19: Multivariate Cox-Regression: Einfluss des subzellulären Expressionsmusters auf das MFS (mc vs. Restliche).....	92
Tabelle 20: Multivariate Cox-Regression: Einfluss der TA-MUC1-Expression auf das DFS.	94
Tabelle 21: Multivariate Cox-Regression: Einfluss des subzellulären Expressionsmusters auf das DFS (cyt. vs. Restliche).....	98
Tabelle 22: Multivariate-Cox-Regression: Einfluss des subzellulären Expressionsmusters auf das DFS (mc vs. Restliche).....	100
Tabelle 23: Follow-Up (TNBC-Kollektiv): Patientenbezogene-Daten.....	102
Tabelle 24: Follow-Up (TNBC-Kollektiv): Tumorbezogene-Daten.....	103
Tabelle 25: Follow-Up (TNBC-Kollektiv): Überleben- und Prognose-Daten.....	104

Tabelle 26: Vergleich der Überlebensraten in Abhängigkeit der subzellulären TA-MUC1-Expression (TNBC).....	114
--	-----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele von immunhistochemischen Färbungen in unterschiedlicher Antikörper-Konzentration.	37
Abbildung 2: Beispiel: gemischt, überwiegend membranständiges Expressionsmuster (mc) ..	39
Abbildung 3: Beispiel: gemischt, überwiegend zytoplasmatisches Expressionsmuster (cm) ..	41
Abbildung 4: Beispiel: rein zytoplasmatisches Expressionsmuster (c).....	43
Abbildung 5: Beispiel Duktales Carcinoma in situ (DCIS)	44
Abbildung 6: Beispiel Positiv-Kontrolle.	45
Abbildung 7: Beispiel Immunhistochemische-Negativkontrolle.	45
Abbildung 8: Verteilung der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe.....	53
Abbildung 9: Verteilung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 im Tumorgewebe.	54
Abbildung 10: Verteilung der TA-MUC1-Expression im DCIS.....	55
Abbildung 11: Verteilung des subzellulären-Expressionsmusters von TA-MUC1 im DCIS. .	56
Abbildung 12: Verteilung der TA-MUC1-Expression über die Tumorphistologie.	58
Abbildung 13: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Tumoren unterschiedlicher Histologie.....	59
Abbildung 14: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit der Grading-Stadien. 60	
Abbildung 15: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Abhängigkeit der Grading-Stadien.	61
Abbildung 16: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit des Progesteronrezeptor-Status.	62
Abbildung 17: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptor-Status.....	63
Abbildung 18: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters.	65
Abbildung 19: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster.	65
Abbildung 20: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Tumoren mit überwiegend membranständigem Expressionsmuster.	66
Abbildung 21: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Tumoren mit überwiegend zytoplasmatischem Expressionsmuster.	67
Abbildung 22: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters.	68

Abbildung 23: Verteilung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 in Abhängigkeit der Tumorhistologie.....	69
Abbildung 24: Vergleich des subzellulären-Expressionsmusters von NST- und nicht-NST-Tumoren.....	70
Abbildung 25: Verteilung der histologischen Subtypen nach subzellulärem-Expressionsmuster.	71
Abbildung 26: Verteilung des Nodal-Status in Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster und der Vergleichsgruppe.	72
Abbildung 27: Verteilung des HER2-Rezeptorstatus in Abhängigkeit des subzellulären-Expressionsmusters. (mc vs. restliche).....	73
Abbildung 28: Verteilung der Risikogruppe „Luminal A“ in Abhängigkeit des subzellulären-Expressionsmusters.	75
Abbildung 29: Verteilung der Risikogruppe 2 unterschieden nach subzellulärem-Expressionsmuster.....	76
Abbildung 30: Verteilung der Herdexpression (unifokal vs. multifokal) nach subzellulärem-Expressionsmuster.....	77
Abbildung 31: Überlebenszeitkurven (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der TA-MUC1-Expression.	79
Abbildung 32: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (zytoplasmatisches Kollektiv).	81
Abbildung 33: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (mc-Kollektiv).	82
Abbildung 34: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cm-Kollektiv).	82
Abbildung 35: Vergleich der Überlebenszeitkurven unterteilt nach subzellulärem. Expressionsmuster (cyt vs. Restliche).....	84
Abbildung 36: Vergleich der Überlebenszeitkurven unterteilt nach subzellulärem. Expressionsmuster (mc vs. restliche).	85
Abbildung 37: Vergleich der Überlebenszeitkurven unterteilt nach subzellulärem Expressionsmuster (cm vs. restliche).	85
Abbildung 38: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression	87
Abbildung 39: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (zytoplasmatisches Kollektiv).	88

Abbildung 40: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (mc-Kollektiv)	89
Abbildung 41: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cm-Kollektiv)	89
Abbildung 42: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) unterteilt nach subzellulärem Expressionsmuster (cyt vs. Restliche)	90
Abbildung 43: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters (mc vs. Restliche)	92
Abbildung 44: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters (cm vs. Restliche)	93
Abbildung 45: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression.	94
Abbildung 46: Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (mc-Kollektiv)	95
Abbildung 47: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cyt-Kollektiv)	96
Abbildung 48: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cm-Kollektiv)	97
Abbildung 49: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der subzellulären Expression (cyt. vs. Restliche)	98
Abbildung 50: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der subzellulären Expression (mc vs. Restliche)	99
Abbildung 51: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der subzellulären Expression (cm vs. Restliche)	101
Abbildung 52: Verteilung der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe (TNBC).	105
Abbildung 53: Verteilung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 (TNBC) .	106
Abbildung 54: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters (TNBC)	107
Abbildung 55: Vergleich der TA-MUC1-Expression; zytoplasmatisch vs. Restliche (TNBC)	108
Abbildung 56: Vergleich der TA-MUC1-Expression; cm vs. Restliche (TNBC)	109
Abbildung 57: Verteilung von Risikoläsionen im Tumorschnitt; Vergleich mc vs. restliche (TNBC).....	109

Abbildung 58: Vergleich der Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression (TNBC).....	110
Abbildung 59: Vergleich der Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters (TNBC).....	112
Abbildung 60: Vergleich der Überlebenszeitkurven; zytoplasmatisch vs. restliche (TNBC)	113
Abbildung 61: Vergleich der Überlebenszeitkurven; li.: mc vs. Restlich; re.: cm vs. restliche (TNBC).....	113
Abbildung 62: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Anhängigkeit der TA-MUC1-Expression (TNBC).....	115
Abbildung 63: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit des subzellulären. Expressionsmusters (TNBC).....	116
Abbildung 64: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS); zytoplasmatisch vs. Restliche (TNBC).....	117
Abbildung 65: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS); mc vs. Restliche (TNBC).....	118
Abbildung 66: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression (TNBC).....	119
Abbildung 67: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS); mc vs. Restliche (TNBC).....	120
Abbildung 68: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS); cm vs. Restliche (TNBC).....	120
Abbildung 69: Die Rolle von MUC1 im nukleären Transport von und während der Interaktion mit EGFR.....	139

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Ala	Alanin
Aqua dest.	destilliertes Laborwasser
AS	Aminosäure(n)
BET	brusterhaltene-Therapie
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
c	zytoplasmatisch
cm	gemischt, überwiegend zytoplasmatisch
CQC-Motiv	Cystein-Glutamin-Cystein-Motiv
CysD	Cystein-D
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DFS	<i>diseases-free survival</i> , Krankheitsfreies-Überleben
ED	Erstdiagnose
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii, und andere
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GY	Gray
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
IRS	Immunreaktiver-Score
J	Jahre
KI	Konfidenzintervall
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
m	membranständig
mAk	monoklonaler Antikörper
mc	gemischt, überwiegend membranständig
MCF7	<i>Michigan Cancer Foundation 7</i>
Md	Median
MFS	Metastasenfreies-Überleben
mRNA	messenger-RNA, <i>messenger ribonucleic acid</i>

mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MUC1	Mucin-1
MUC1-C/ -N	C- bzw. N-terminale Mucin-1-Untereinheit
n	Häufigkeit
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'</i>
ns	nicht signifikant
NST	<i>invasive carcinoma of no special type</i>
OP	Operation
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PR	Progesteronrezeptor
Pro	Prolin
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SD	Standardabweichung
SEA	<i>sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin</i>
Ser	Serin
SLNB	Sentinel-Node-Biopsie
(S)T	(Sialyl-)Thomsen-Friedenreich antigen
(S)Tn	(Sialyl-)Thomsen-nouveau antigen
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TACA	<i>tumor-associated carbohydrate-antigens</i>
Th-Zelle	T-Helferzellen
Thr	Threonin
TNBC	<i>triple negative breast cancer</i>
TSA	Tumorspezifisches Antigen
TTox	Tetanus-Toxoid
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
ÜLR	Überlebensrate
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vgl.	vergleiche
VNTR	<i>variable-number-tandem-repeat</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Einleitung

1. Einleitung

Mucin-1 (MUC1) ist ein etablierter Tumormarker, der von einer Vielzahl epithelialer Tumoren exprimiert wird (1, 2). Neben seinem Nutzen als Serum-Tumormarker, unter anderem beim Mammakarzinom, hat sich MUC1 als potenzieller Angriffspunkt (*target*) zielgerichteter Tumor-Immuntherapien bewiesen (3, 4). Vor allem für Brustkrebs, eine Erkrankung, die auf Grund einer global steigenden Inzidenz und ihrer - in Abhängigkeit der Tumorbiologie - limitierten Therapiemöglichkeiten eine enorme Krankheitslast bewirkt, stellt die Identifizierung universell zugänglicher Tumorantigene, wie MUC1, einen großen Nutzen dar (5, 6, 7).

MUC1 ist ein stark glykosyliertes membranständiges Glykoprotein, das auf epithelialen Oberflächen exprimiert wird. Die extrazelluläre Domäne von MUC1 beinhaltet eine variable Anzahl an sich wiederholenden Aminosäuren-Sequenzen (*tandem repeats*). Jede dieser Sequenzen besteht aus 20 Aminosäuren, die wiederum fünf potenziellen O-Glykosylierungsstellen an Serin- und Threonin-Seitenketten enthalten (8). Eine veränderte Enzymaktivität im Tumorgewebe führt über Modifikationen an der Tandem-Repeat-Domäne zu der Entstehung veränderter tumorassoziierter Kohlenhydrat-Strukturen auf MUC1. Dies hat wiederum eine Konformationsänderung des gesamten MUC1-Moleküls zur Folge. Die so entstandenen tumorassozierten Glykopeptid-Epitope stellen neue immunogene Strukturen dar, welche von verschiedenen synthetisch hergestellten MUC1-Antikörpern detektiert werden können (9-11).

Das in dieser Arbeit untersuchte *target* TA-MUC1 stellt ein solches tumorassoziertes MUC1-Glykopeptid-Epitop dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TA-MUC1 in der Lage ist, eine effektive und spezifische Anti-Tumor-Immunantwort im Mammakarzinom zu bewirken (12, 13). Dies führte zu der Entwicklung des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30, mit dem es möglich ist, das Tumorantigen TA-MUC1 spezifisch nachweisen zu können (14). In einzelnen Studien konnten so bereits signifikante Zusammenhänge zwischen der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe und der Prognose von Brustkrebspatientinnen gezeigt werden (12, 13, 15). In dieser Arbeit wurde die Expression von TA-MUC1 in über 200 Mammakarzinomen untersucht und anhand eines umfangreichen Follow-Up korreliert. Durch die Erkenntnisse dieser Studie soll es gelingen, die Eignung von TA-MUC1 als Tumormarker sowie den diagnostischen und therapeutischen Nutzen von GGSK-1/30 im Mammakarzinom zu beschreiben.

2. Literaturdiskussion

2.1 Brustkrebs

2.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs stellt weltweit die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung und zugleich die häufigste Krebstodesursache der Frau dar (6). Im Jahr 2018 wurden weltweit schätzungsweise über 2.000.000 Neuerkrankungen diagnostiziert. Mehr als 600.000 Frauen starben 2018 an den Folgen von Brustkrebs (7). In Deutschland lag die Zahl an Neuerkrankungen 2016 bei rund 69.000. Bei einem Lebenszeitrisiko von 12,8% erkrankt etwa jede 8. Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Etwa 30% der Patientinnen sind bei der Diagnosestellung jünger als 55 Jahre (16, 17).

Trotz einer sukzessiv steigenden Inzidenz konnte in den letzten Jahren, durch die Einführung konsequenter Früherkennungsmaßnahmen und einer optimierten systemischen Therapie, ein Rückgang der Mortalität erreicht werden (16, 18). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland zurzeit bei etwa 88%; im lokalisierten Brustkrebs-Stadium sogar bei 98,8% (19). Allerdings werden nur etwa 62% aller Mammakarzinome in einem frühen, bzw. lokalisierten Stadium diagnostiziert. In rund 30% der Fälle zeigt sich bei Diagnosestellung bereits ein regionaler Lymphknotenbefall und in etwa 6% liegt ein metastasiertes Stadium vor (20, 21). Auf Grund einer stetig steigenden Inzidenz des Mammakarzinoms wird Brustkrebs, trotz aller bisherigen Fortschritte in der Diagnostik und Therapie, auch in Zukunft eine zunehmende Krankheitslast mit allen damit einhergehenden enormen gesundheitlichen und ökonomischen Kosten bewirken (6, 7, 22). Um dem entgegenzuwirken, ist eine Weiterentwicklung effektiverer diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium und bei Hochrisiko-Tumoren von entscheidender Bedeutung.

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Neben einem weiblichen Geschlecht (Geschlechterverteilung: ♀ >> ♂ (100:1)) gelten folgende Faktoren als gesicherte oder sehr wahrscheinliche Risikofaktoren des Mammakarzinoms (23-25):

- Ein Höheres Alter

2. Literaturdiskussion

- Hormonelle Risikofaktoren (Frühe Menarche und späte Menopause, keine/wenige Schwangerschaften, späte erste Geburt, kurze Stillzeit, Hormonersatztherapien, Einnahme oraler Kontrazeptiva)
- Hereditäre Faktoren (insb. Mutationen der *BRCA1*-, *BRCA2*- und *PALB2*-Gene)
- Brustkrebs-Anamnese (Risikoläsionen, Brustkrebs der kontralateralen Seite, proliferative Läsionen mit oder ohne Atypien, nicht-proliferative Läsionen)
- Lebensstil-Faktoren (hoher BMI, übermäßiger Alkoholkonsum, Nikotinkonsum, erhöhter Konsum gesättigter/tierischer Fettsäuren, Diabetes Mellitus Typ 2, geringe körperliche Aktivität)
- Strahlenexposition der Brust und weitere toxische Faktoren

2.1.3 Diagnostik

Die Diagnostik des Mammakarzinoms setzt sich aus einer ausführlichen Anamnese kombiniert mit einer klinischen Untersuchung, einer apparativen Diagnostik mittels Mammographie und Ultraschall sowie der histologischen Untersuchung zusammen (17). Die klinische Inspektion und Palpation der Brust wird Frauen im Rahmen der gesetzlichen Früherkennungsuntersuchung ab dem Alter von 30 Jahren als ärztliche Maßnahme angeboten. Zudem wird empfohlen, eine regelmäßige Selbstuntersuchung der Brust durchzuführen. Die klinische (Selbst-) Untersuchung der Brust stellt eine wichtige Maßnahme der Früherkennung dar, auch wenn hierdurch keine Mortalitätssenkung gezeigt werden konnte (17, 26). In Deutschland wird Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr die Teilnahme an einem Mammographie-Screening-Programm empfohlen. Die Mammographie stellt hierbei die einzige diagnostische Maßnahme dar, die für sich genommen zu einer gesicherten Reduktion der Mortalität führt (27-29). Eine Ultraschalluntersuchung der Brust ist, wie die klinische Untersuchung auch, als alleinige Maßnahme der Brustkrebsdiagnostik unzureichend. Sie sollte jedoch als ergänzende Maßnahme angewandt werden, da eine Kombination aus Mammographie und Ultraschalluntersuchung, im Vergleich zu einer alleinigen Mammographie-Diagnostik, eine signifikant höhere Diagnoserate bewirkt (30, 31). Insbesondere Frauen mit erhöhtem Brustkrebsrisiko und einer hohen Brustdichte wird daher eine ergänzende Ultraschalluntersuchung der Brust empfohlen (17). Bei suspekten Untersuchungsbefunden stehen den Patientinnen als weiterführende Diagnostik interventionelle Verfahren, wie die Stanzbiopsie oder Vakuumbiopsie von Brust und Lymphknoten zur Verfügung. Hierbei erfolgt

2. Literaturdiskussion

eine histologische Aufarbeitung der Proben mit Beurteilung der für die Therapie und Prognose entscheidenden pathomorphologischen Merkmalen.

2.1.4 Klassifikation und Stadien-Einteilung

Histopathologische Klassifikation

Anhand von Biopsie- oder Schnellschnittuntersuchungen kann eine histologische Beurteilung des Brustkrebsgewebes erfolgen. Man unterscheidet verschiedene histologische Subtypen des Mammakarzinoms, die sich anhand ihres Ursprungsgewebes und Wachstumsmusters unterscheiden. Die gängigsten Subtypen sind nach aktueller WHO-Klassifikation folgende:

- Invasive Karzinome ohne speziellen Typ (*invasive carcinoma of no special type, NST*)
- Invasiv-lobuläre Karzinome
- Muzinöse Karzinome
- Tubuläre Karzinome
- Kribiforme Karzinome
- Neuroendokrine Tumoren
- Inflammatorische Karzinome

Differenzierungsgrad (Grading)

Eine Einteilung des histologischen Differenzierungsgrades erfolgt anhand verschiedener Dignitätskriterien (Mitoserate, Anteil tubulärer Strukturen und Ausmaß der Kernpolymorphien). Das Grading wird in einem nach Elston und Ellis modifizierten Scoring-System unterteilt in (32):

- G1-Tumoren: Gut differenziert, geringer Malignitätsgrad
- G2-Tumoren: Mäßig differenziert, mittlerer Malignitätsgrad
- G3-Tumoren: Schlecht differenziert, hoher Malignitätsgrad

Hormonrezeptor-/ HER2-Status

Im Rahmen der Primärdiagnostik sollten sowohl der Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptorstatus (PR) als auch die HER2/neu-Expression im Tumorgewebe bestimmt werden (17). Eine Einteilung der Hormonrezeptor-Expression erfolgt anhand des Anteils positiv-gefärbter Tumorzellen in der immunhistochemischen Färbung (33). Der HER2/neu-Status kann entweder über eine immunhistochemisch-nachgewiesene Protein-Überexpression oder über eine Genamplifikation in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestimmt werden

2. Literaturdiskussion

(34). Das triple-negative Mammakarzinom als Sonderfall zeichnet sich durch einen negativen Östrogen- und Progesteronrezeptor sowie eine fehlende HER2/neu-Überexpression im Tumorgewebe aus. Je nach Hormon- und HER2-Rezeptorstatus ergeben sich für die Tumoren unterschiedliche Therapiemöglichkeiten und -ansprechraten, was wiederum einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose hat (35).

Ki-67-Proliferationsindex

Ein hoher Proliferationsindex spricht für ein schnelles Tumorwachstum. Sehr hohe bzw. sehr niedrige Werte sollten in der Beurteilung des Tumors berücksichtigt werden. Ab einer Ki-67-Positivität $\geq 25\%$ kann von einem erhöhten Proliferationsrisiko ausgegangen werden (17).

TNM-Klassifikation

In der TNM-Klassifikation werden Primärtumor (T) (Tabelle 1), Lymphknoten (L) (Tabelle 2) und das Vorliegen einer Fernmetastasierung (M) (Tabelle 3) nach Größe oder Ausmaß des Befalls klassifiziert.

Tabelle 1: Einteilung nach T-Stadium (Größe und Ausdehnung des Primärtumors)

T-Stadium	Bedeutung
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Duktales Carcinoma in situ
Tis (LCIS)	Lobuläres Carcinoma in situ
Tis (Paget)	M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
T1	Tumor max. 2 cm im größten Durchmesser
T1mi	Mikroinvasion (0,1 cm oder weniger)
T1a	> 0,1 cm bis max. 0,5 cm
T1b	> 0,5 cm bis max. 1 cm
T1c	> 1 cm bis max. 2 cm
T2	Tumor > 2 cm bis max. 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
T4a	Ausdehnung auf Brustwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, Vorderer Serratusmuskel)
T4b	Ödem, Ulzeration oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
T4c	Kriterien 4a und 4b

2. Literaturdiskussion

T4d Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

© Leitlinienprogramm Onkologie | S3-Leitlinie Mammakarzinom | Version 4.1 | September 2018

Tabelle 2: Einteilung nach Nodalstatus (Zahl und Lage befallender Lymphknoten)

Nodalstatus	Bedeutung
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten Level I und II
N2	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten Level I und II, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
N2a	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
N2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
N3	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten (Level III) mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten des Level I und II oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen des Level I und II oder Metastase(n) in ipsilateralen supra- klavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
N3a	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
N3b	Metastase(n) in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen
N3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

© Leitlinienprogramm Onkologie | S3-Leitlinie Mammakarzinom | Version 4.1 | September 2018

2. Literaturdiskussion

Tabelle 3: Einteilung nach Metastasen-Status

M-Stadium	Bedeutung
Mx	Beurteilung von Fernmetastasen nicht möglich
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

© Leitlinienprogramm Onkologie | S3-Leitlinie Mammakarzinom | Version 4.1 | September 2018

Stadieneinteilung nach UICC/ AJCC

Zusammengefasst werden die TNM-Klassifikationsangaben in der aktuellen UICC/ AJCC-Klassifikation, nach der sich auch die Therapieempfehlungen richten (Tabelle 4).

Tabelle 4: Stadieneinteilung nach UICC/ AJCC

UICC/AJCC-Stadium	TNM-Klassifikation
0	• Tis, N0, M0
I	IA • T1, N0, M0
	IB • T0–T1, N1mic, M0
II	IIA • T0–T1, N1, M0 • T2, N0, M0
	IIB • T2, N1, M0 • T3, N0, M0
III	IIIA • T0–T2, N2, M0 • T3, N1–N2, M0
	IIIB • T4, N0–N2, M0
	IIIC • Jedes T, N3, M0
IV	• Jedes T, jedes N, M1

TNM Classification of Malignant Tumours, Eighth Edition. © 2017 UICC. Published 2017 by John Wiley & Sons

2.1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren

Die Bestimmung prognostischer Faktoren dient als klinische Entscheidungshilfe sowie zur Einschätzung des Erkrankungsverlaufs. Darüber hinaus können anhand dieser Faktoren unterschiedliche Patientengruppen miteinander verglichen und der Erfolg einer Therapie abgeschätzt werden (36). Eine Erhebung der folgenden pathomorphologischen und klinischen Parameter des Mammakarzinoms wird empfohlen (17, 37-40):

2. Literaturdiskussion

- pTNM-Status
- Resektionsrandstatus und Sicherheitsabstände
- Histologischer Typ
- Histologisches Grading
- Peritumorale Lymphgefäßinvasion
- ER-, PR- und HER2-Status¹
- Alter
- Menopausenstatus²
- (Ki-67)

2.1.6 Therapie

Operative Therapie

Der operative Eingriff bildet die Basis in der Brustkrebstherapie. Grundsätzlich sollte bei allen frühen Mammakarzinomen versucht werden, eine vollständige Resektion des Tumors zu erreichen (*R0-Status*) (17). Ein R0-Status korreliert mit einem niedrigeren Lokalrezidivrisiko und ist Prognose-entscheidend (41). Als operative Verfahren stehen prinzipiell eine brusterhaltende Therapie (*BET*) oder eine vollständige Mastektomie zur Verfügung. Eine BET mit nachfolgender Bestrahlung der Brust ist vor allem bei lokal begrenzten, nicht invasiven Karzinomen oder bei invasiven Karzinomen mit einer günstigen Brust-Tumor-Relation geeignet. Im Falle einer unvollständigen Entfernung des Tumors, bei Vorliegen eines inflammatorischen Mammakarzinoms oder bei Kontraindikationen zur Nachbestrahlung, sollte eine Mastektomie durchgeführt werden (17, 41, 42). Weiterer Bestandteil der operativen Therapie ist die Sentinel-Lymphknoten-Entfernung (*SLNB*). Dieser Eingriff dient der Erfassung des Nodalstatus und sollte hinsichtlich der weiteren Therapieplanung und Prognose bei jedem invasiven Mammakarzinom durchgeführt werden (43).

Strahlentherapie

Bei jeder Patientin sollte nach einer brusterhaltenden Therapie eine postoperative Strahlentherapie der betroffenen Brust erfolgen (17). Dies stellt eine effektive Maßnahme dar, um das Rezidivrisiko und die Brustkrebs-spezifische Mortalität zu senken (44) (45). Die

¹ Für den Einsatz einer endokrinen- bzw. zielgerichtete Anti-HER2-Therapie

² Für den Einsatz einer antiöstrogenen Therapie

2. Literaturdiskussion

Radiotherapie kann entweder hypofraktioniert³ oder mittels konventioneller Fraktionierung⁴ durchgeführt werden (17, 46, 47). Eine lokale Dosis-Aufsättigung in Form einer *Boost*-Bestrahlung kann darüber hinaus das Rückfallrisiko nach brusterhaltender Operation weiter reduzieren und sollte bei jeder Patientin ≤ 50 Jahren sowie bei älteren Patientinnen mit erhöhtem Rückfallrisiko erfolgen (17, 48, 49). Nach einer Mastektomie kann bei Patientinnen mit erhöhtem Rezidivrisiko, konkordant zur BET, eine Bestrahlung der Brust oder der Lymphabflusswege indiziert sein (17). Auch hier hat die Therapie einen positiven Effekt auf die lokale und regionale Tumorkontrolle und kann das Rückfallrisiko reduzieren (50).

Systemische Therapie

Als systemische adjuvante Therapiemöglichkeit stehen eine endokrine Therapie, eine Chemotherapie oder Antikörpertherapien zur Verfügung. Für die Therapieauswahl werden Faktoren wie die Tumorgroße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptor- und HER2-Status, Menopausen-Status und das Alter berücksichtigt. Eine adjuvante endokrine Therapie sollte bei Patientinnen mit ER-/ PR-positiven invasiven Mammakarzinom nach Abschluss der Chemotherapie, ggf. auch parallel zur Strahlentherapie durchgeführt werden (17). Der Umfang einer endokrinen Therapie und die Wahl des Therapeutikums ist abhängig vom Menopausenstatus und dem Risikoprofil der Patientin (51). Eine adjuvante Chemotherapie ist zunächst bei allen HER2-positiven Tumoren, Tumoren mit hohem Rezidivrisiko und triple-negativen Tumoren⁵ (TNBC) indiziert. Die eingesetzten Wirkstoffe und Chemotherapie-Protokolle richten sich auch hier nach dem tumorbedingten Mortalitätsrisiko und dem Risikoprofil der Patientin (17). Ist eine Chemotherapie indiziert, kann diese auch vor der Operation (neoadjuvant) durchgeführt werden. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens ist dieses Verfahren einer adjuvanten Chemotherapie gleichwertig (52). Eine Antikörpertherapie wird zurzeit vor allem bei Patientinnen mit HER2-überexprimierenden Tumoren mittels des monoklonalen Antikörper Trastuzumab angewendet. Bei einer adjuvanten Behandlung mit Trastuzumab wird eine Kombination mit einer Standardchemotherapie empfohlen, wodurch eine Reduktion der Rezidivrate und der Mortalität erreicht werden konnte (17) (53, 54). Weitere

³ Gesamtdosis ca. 40 Gy in 15-16 Fraktionen in 3 bis 5 Wochen

⁴ Gesamtdosis ca. 50 Gy in 25-28 Fraktionen in 5 bis 6 Wochen

⁵ ER-, PR- und HER2-negativ

2. Literaturdiskussion

Therapiemöglichkeiten bei Brustkrebs sind Tyrosinkinase-Inhibitoren, mTOR-Hemmer, CDK4/6-Inhibitoren und VEGF-Antikörper, zur Zell- bzw. Gefäß-Wachstumshemmung.

Weitere zielgerichtete Ansätze und Therapiekonzepte, wie auch der Einsatz des in dieser Arbeit getesteten monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30, werden derzeit erforscht. Insbesondere bei Tumoren mit limitierten Therapieoptionen, wie dem TNBC, ist die Etablierung neuer zielgerichteter Therapiemöglichkeiten mit einer besseren Verträglichkeit und Wirksamkeit von besonderer Bedeutung (55).

2.2 Tumorimmunologie und -Immuntherapie

2.2.1 Die immunologische Situation im Tumor

Die Theorie der Immunüberwachung von Tumoren

Anfang des 20. Jahrhunderts veröffentlichte Paul Ehrlich seine Theorien zur Entstehung von Krebs und den immunologischen Mechanismen im Tumor. Den Prozess der Tumorentstehung unterteilte Ehrlich in zwei Phasen: eine primäre Phase mit der Entstehung „karzinomatöser Zellumänderungen“, gefolgt von einer zweiten Phase mit dem Auswachsen (ausdifferenzieren) veränderter Zellen zu einem tatsächlichen Tumor (56). Ehrlich postulierte die These, dass spezielle Schutzmechanismen des Organismus in der Lage seien, den Übergang dieser zwei Phasen, also die Transformation neoplastischer Veränderungen hin zu einem invasiven Karzinom zu verhindern. Gestörte oder gar fehlende Schutzmechanismen wiederum führten laut Ehrlich zu einer deutlich häufigeren Karzinomentstehung in betroffenen Organismen (56). Etwa 50 Jahre nach Ehrlich veröffentlichte Lewis Thomas seine Beobachtungen einer gegen spezifische Tumorantigene gerichteten zellulären Immunantwort in Krebspatienten. Die Mechanismen dieser Immunantwort, die laut Thomas vergleichbar mit den Vorgängen einer Transplantat-Abstoßung waren, erlaubten es dem Immunsystem, das Tumorwachstum effektiv zu kontrollieren (57).

Im Jahr 1970 formulierten Burnet und Thomas ihre Theorie der Immunüberwachung (*Immunosurveillance*) von Tumoren. Sie postulierten, dass durch die immunogene Wirkung von Tumoren starke Abwehrmechanismen der angeborenen und adaptiven Immunantwort ausgelöst werden, die letztlich zu einer vollständigen Tumorregression führen können (58). Die

2. Literaturdiskussion

Immunosurveillance-Theorie und die Annahme, dass das eigene Immunsystem nicht nur in der Lage ist körperfremde, sondern auch tumorassoziierte körpereigene Antigene zu erkennen und diese effektiv zu eliminieren, wurde lange Zeit mangels ausreichender Evidenz kontrovers diskutiert. Erst einige Jahre später konnte anhand experimenteller Studien mit humanen-Transplantat- und Maus-Modellen gezeigt werden, dass ein intaktes Immunsystem einen wichtigen Schutz vor der Entstehung von Krebserkrankungen darstellt, und umgekehrt immunsupprimierte Individuen ein erhöhtes Krebsrisiko aufweisen (59-61). Diese neuen Erkenntnisse führten dazu, dass die *Immunosurveillance*-Theorie von Burnet und Thomas heute wieder im Fokus der aktuellen Krebsforschung steht (62).

Durch die Tatsache, dass maligne Tumoren nicht nur in immungeschwächten, sondern offensichtlich auch in gesunden und immunkompetenten Organismen entstehen können sowie auf Grund verschiedener weiterer Beobachtungen, erkannte man, dass die *Immunosurveillance*-Theorie allein für die Beschreibung der komplexen und dynamischen Rolle des Immunsystems im Tumor unzureichend ist (63). Durch ein erweitertes Verständnis der molekularen Natur von Tumorantigenen gelang es Dunn und Schreiber, die komplexen immunologischen Prozesse während der Tumorentstehung exakter beschreiben zu können. Sie formten hierfür den Begriff des Tumor-*Immunoeditings* (64).

Die ambivalente Rolle des Immunsystems im Tumor

Um zu verstehen, wie es Tumoren möglich ist, trotz der vorhandenen Abwehrmechanismen eines immunkompetenten Organismus unkontrolliert zu wachsen, versuchte man anhand von Mausmodellen die immunogene Wirkung von Tumoren genauer zu beschreiben. Hierbei zeigte sich, dass Tumoren, die innerhalb eines immundefizitären Umfelds (Organismus) entstanden waren, eine deutlich höhere Immunogenität aufwiesen als solche, die sich unter dem ursprünglichen Einfluss eines kompetenten Immunsystems entwickelt hatten (65). Für einen Nachweis isolierte man Tumorzellen aus sowohl immunsupprimierten als auch immunkompetenten Mäusen und implantierte diese jeweils gesunden Individuen. Anschließend beobachtete man die hierdurch ausgelöste Immunreaktion im gesunden Organismus des „Transplantat-Empfängers“. Es zeigte sich, dass jene Tumorzellen, die in einem immundefizitären Organismus entstanden waren, vom Empfänger-Organismus häufiger abgestoßen wurden und zudem ein langsames Zellwachstum aufwiesen als solche Tumorzellen, die sich unter ursprünglich immunkompetenten Bedingungen entwickelt hatten (65-67). Hieraus schlussfolgerte man, dass ein abgeschwächter oder sogar fehlender Einfluss

2. Literaturdiskussion

des Immunsystems während der Tumorentstehung zu einer erhöhten Immunogenität der entstandenen Tumorzellen führt, was wiederum in einer verstärkten anti-Tumor-Immunantwort des Organismus resultiert. Umgekehrt schienen unter dem Einfluss eines kompetenten Immunsystems solche Tumorvarianten zu entstehen, denen es möglich war, eine Immunantwort zu umgehen und in ein Stadium des unkontrollierten Wachstums überzugehen (68).

Für diesen während der Tumorentstehung stattfindenden Prozess der „immunologischen Prägung“ durch das Immunsystem formten Dunn und Schreiber den Begriff des *Tumor-Imprintings* (64). Während dem Immunsystem gemäß der *Immunosurveillance*-Theorie eine rein protektive Funktion zugeschrieben wird, spielt das Immunsystem in der *Immunoediting*-Theorie von Dunn und Schreiber eine ambivalente Rolle und ist in der Lage, über Mechanismen wie dem *Tumor-Imprinting* auch Tumor- begünstigende Effekte zu haben (63).

Die Immunoediting-Theorie

Der Prozess des Tumor-Immunoeditings umfasst drei parallel ablaufende Phasen: (i) eine Phase der Tumor-Elimination (*elimination*), (ii.) eine Phase des dynamischen Gleichgewichts (*equilibrium*), (iii.) die Phase des Entweichens von Tumoren (*escape*). Die Phase der Elimination entspricht einer Überwachung (*Immunosurveillance*) des Tumors durch das Immunsystem. Über adaptive und angeborene Abwehrmechanismen gelingt es dem Immunsystem, eine zielgerichtete Detektion und Elimination von Tumorzellen zu erreichen (69). Diejenigen Tumorzellen, die diesem Elimination-Prozess zunächst entweichen können, gehen in eine Phase des dynamischen Gleichgewichts über (Phase ii). Einige Tumorzellen werden in dieser Phase weiterhin durch das Immunsystem erkannt und zerstört und das Tumorwachstum so in Schach gehalten. Gleichzeitig übt das Immunsystem einen Selektionsdruck auf die verbliebenen genetisch instabilen Tumorzellen aus. Über Mutationsprozesse führt dieser Selektionsdruck zu der Entstehung immer neuer Tumorzell-Varianten, die sich durch eine reduzierte Immunogenität und eine immer stärkere Immunresistenz auszeichnen (70). Die Prozesse des dynamischen Gleichgewichts und die damit einhergehenden genetischen Veränderungen können über mehrere Jahre andauern, um schließlich in einer mitunter vollständigen Unempfindlichkeit der entstandenen Tumorzell-Varianten gegenüber dem Immunsystem zu resultieren (71). In der dritten Phase des Immunoeditings, dem Tumor-Escape, gelingt es Tumorzellen schließlich, durch ihre erworbene „immunogene Unsichtbarkeit“ einer Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen (64, 72).

2. Literaturdiskussion

Zudem bedienen sich Tumoren weiterer Escape-Mechanismen, wie bspw. der Exprimierung körpereigener tumorassoziierter Antigene (TAAs) und einer auf Grund von Selbsttoleranz-Mechanismen hierauf abgeschwächten Immunantwort des Organismus (73, 74).

Die drei Phasen des *Immunoeditings* sind keine chronologisch voneinander getrennt ablaufenden Prozesse, sondern spiegeln das gleichzeitige und kontinuierliche Zusammenspiel zwischen dem Immunsystem und Tumoren wider. Während der Tumorentstehung findet ein stetiger Übergang zwischen den verschiedenen Phasen statt. Je nach Immunstatus und Tumorbiologie führt dies, teilweise auch noch nach mehreren Jahren, zu variablen Tumor-Ausprägungen und unterschiedlichen klinischen Verläufen (64, 71). Für Tumoren, die durch das Immunsystem vollständig zerstört wurden, stellt die Phase der Elimination den Endpunkt des *Immunoeditings* dar. Verbliebende, nicht zerstörte Tumorzellen können durch einen andauernden Selektionsdruck des Immunsystems in ihrer Immunogenität so geformt werden, dass sie in der Lage sind, einer Elimination vollständig zu entgehen und unkontrolliert zu wachsen (63, 72).

Durch den einerseits hemmenden und andererseits fördernden Einfluss auf das Tumorwachstum spielt das Immunsystem in der Tumorentstehung eine ambivalente Rolle. Die Möglichkeiten, das Immunsystem zu kontrollieren und so die immunologischen Vorgänge im Tumor zu beeinflussen, bieten enormes Potenzial für therapeutische Ansätze der gezielten Krebstherapie.

2.2.2 Immuntherapeutische Ansätze

Tumorantigene

Eine effektive Immunüberwachung von Tumoren erfordert die Identifizierung tumorspezifischer und/oder tumorassoziierter Antigene. Tumorspezifische-Antigene (TSAs) entstehen durch Mutationsprozesse im Tumorgewebe und lassen sich ausschließlich (spezifisch) auf Tumorzellen nachweisen. Tumorassozierte-Antigene (TAAs) hingegen werden sowohl auf der Oberfläche von Tumorzellen als auch auf den Pendanten des korrespondierenden gesunden Gewebes exprimiert (63). Im Gegensatz zu den körpereigenen, tumorassozierten Antigenen (=Selbst-Antigenen) sind tumorspezifische Antigene (=Neo-Antigene) auf Grund ihrer immunogenen Wirkung in der Lage, eine effektive T-Zell-Immunantwort auszulösen, ohne hierbei durch Mechanismen der Immuntoleranz limitiert zu

2. Literaturdiskussion

werden (75). Man fand heraus, dass Mäuse, die zuvor mit Tumorzellen infiziert wurden, nachfolgend gegen eine erneute Übertragung durch denselben Tumor geschützt waren. Diesen Schutz führte man auf eine erworbene Immunantwort gegen spezifische Strukturen auf den Tumorzellen zurück, wodurch die ersten Tumorantigene identifiziert wurden (76). Durch *in vitro*-Nachweisverfahren, unter Verwendung synthetisch-hergestellter Antikörper und zytotoxischer T-Zellen, wurden Ende des 20. Jahrhunderts bereits mehrere Dutzend und heute über 2000 spezifischer Tumorantigene beschrieben (77) (78).

Anhand einer durch Tumorantigene ausgelösten Immunantwort, bspw. durch den Einsatz therapeutischer monoklonaler Antikörper und Tumorstoffe zur Induktion einer gerichteten T-Zell-Immunantwort, ergaben sich zunächst neue und tumorspezifische Therapiemöglichkeiten (79). Dennoch blieben die Erfolge einer so generierten Anti-Tumor-Immunantwort hinter den Erwartungen zurück. Ursächlich hierfür sah man die Tatsache an, dass die überwiegende Mehrheit der identifizierten Tumor-Antigene eben keine tumorspezifischen, sondern tumorassoziierte, aus körpereigenen Peptiden entstandene „Selbst-Antigene“ darstellen, weshalb eine dagegen gerichtete Immunantwort auf Grund der Selbsttoleranz limitiert ist und folglich schwächer ausfällt (78).

Die Unterscheidung zwischen *Eigen* und *Fremd*

Im Gegensatz zu den durch Mutation entstandenen tumorspezifischen (Neo)-Antigenen (TSAs) - die im engeren Sinne nicht Tumor- sondern Patientenspezifisch bezeichnet werden müssen und sich dadurch schon für ein universelles Therapiekonzept disqualifizieren - stellen tumorassoziierte Antigene (TAAs) keine individuellen Zufallsprodukte dar. Sie sind vielmehr veränderte (Multi-)Peptid-Derivate eines im gesunden Gewebe exprimierten Proteins. Sie können daher als Selbst-Tumorantigene (engl.: *shared tumor-associated Antigene*) bezeichnet werden. Trotz der Annahme, dass eine gegen diese Tumorantigene gerichtete Immunantwort auf Grund einer erhaltenen Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen inadäquat ausfallen müsste, konnten dennoch effektive anti-TAAs-T-Zell-Immunantworten im Tumor beobachtet werden (80). Es muss dem Immunsystem also möglich sein, zwischen den tumorassoziierten Selbst-Antigenen und ihren körpereigenen Pendanten zu unterscheiden.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, dass unter anderem das membranständige Glykoprotein MUC1, welches ein solches tumorassoziiertes Selbst-Antigen

2. Literaturdiskussion

darstellt, in deutlich höheren Maßen im Tumorgewebe exprimiert wird als im Gesunden (9). Dieser *quantitative* Unterschied schien es dem Immunsystem zu ermöglichen, zwischen dem tumorassoziierten MUC1-Selbst-Antigen und dem MUC1-Glykoprotein im Gesunden unterscheiden zu können (80). Neben einem quantitativen Unterschied fand sich zudem ein *qualitativer* Unterschied in der Molekülstruktur des Tumor-Antigens. Auf tumorassoziierten MUC1 ließen sich charakteristische Molekülmodifikationen nachweisen, die zu der Entstehung neuer tumorassoziiertes Epitope führen und dem Immunsystem als neue immunogene Zielstrukturen (*targets*) dienen (80, 81). Das Immunsystem erkennt das tumorassoziierte MUC1 folglich nicht mehr als Eigen. Zugleich stellt das aberrante MUC1 für das Immunsystem aber auch keine völlig fremde Struktur dar. Vielmehr wird das quantitativ und qualitativ veränderte MUC1 vom Immunsystem als „entartetes Selbst-Antigen“ (*abnormal-self-AG*) erkannt (80).

Neben einer einfachen Unterscheidung in *Eigen* und *Fremd*, gelingt es dem Immunsystem also, in *entartet-Selbst* bzw. „ehemals-Eigen“ zu unterscheiden. Auf Grundlage dieser Erkenntnis lassen sich zwei für die Immuntherapie essentiellen Hypothesen formulieren:

- i. Tumorassoziierte Antigene werden nicht als körpereigene Antigene erkannt. Für das Immunsystem stellen sie aberrante, nicht mehr als *Eigen* erkennbare Strukturen dar. Die Mechanismen der Selbsttoleranz und eine hierdurch bedingte abgeschwächte T-Zell-Immunantwort liefern daher keine ausreichende Erklärung für die beobachtete ineffektive Immunantwort gegenüber tumorassoziierten Antigenen.
- ii. Wenn TAAs aberrante Formen ehemals körpereigener Proteine darstellen und dadurch vom Immunsystem folglich nicht mehr als *Eigen*, sondern *entartet-Eigen* erkannt werden, scheint es plausibel, dass anhand dieser Zielstrukturen eine effektive Immunantwort gegen Tumoren erzeugt werden kann, ohne hierbei die Prinzipien der Selbsttoleranz zu verletzen.

Die Identifizierung eines universellen tumorassoziierten Antigens ist für die Entwicklung einer effektiven und verträglichen Immuntherapie von entscheidender Bedeutung. Das bereits angesprochene membranständige Glykoprotein MUC1 war eines der ersten Tumorantigene, für das eine effektive tumorspezifische Immunantwort nachgewiesen werden konnte (80). Es stellt heute ein häufig untersuchtes und vielversprechendes *Target* für die Krebsimmuntherapie dar (82).

2. Literaturdiskussion

2.3 Muzine

2.3.1 Die Familie der Muzine – Biologie, Funktion und Besonderheiten

Der Schutz von Epithelien

Das Epithelgewebe besteht aus einem Komplex geschlossener Zellverbände. Als Deckschicht überzieht es die äußeren Körperoberflächen und kleidet die Körperhöhlen, Drüsen- und Hohlorgane im Inneren aus. Es schützt die Organe vor mechanischen, thermischen und chemischen Einflüssen und dient zugleich als Barriere für das Eindringen von Keimen und das Austreten von Flüssigkeiten. Epithelien sind polar differenziert. Sie besitzen einen nach außen zum Lumen hin gerichteten apikalen und einen an das darunterliegende Bindegewebe grenzenden basalen Pol. Durch die polare Ausrichtung ergeben sich strukturelle und funktionelle Unterschiede für die verschiedenen Seiten einer Epithelzelle. Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Zellstruktur und -funktionen benötigt die Epithelzelle selbst beständige Abwehrmechanismen. Spezielle auf Epithelzellen exprimierte Glykoproteine, die Muzine, spielen hierbei als integraler Bestandteil der mukösen Schutzschicht eine entscheidende Rolle (2, 9). Diese Schutzschicht dient der Epithelzelle einerseits als physikalische Barriere gegenüber Mikroorganismen und chemischen Einflüssen. Andererseits steht die muzinöse Oberfläche der Epithelzelle in ständigem Kontakt mit der lokalen Mikroflora, was zur Aufrechterhaltung des physiologischen Milieus auf Epithelien beiträgt. Um diese Funktionen zu gewährleisten, müssen die muzinösen Schutzschichten in der Lage sein, kontinuierlich und zugleich dynamisch auf lokale Veränderungen im Gewebe zu reagieren (1, 83-85).

Entzündungsreaktionen im Gewebe führen zu einer lokalen Immunantwort auf der Epithelzelle. Über verschiedene Mechanismen resultiert diese Immunantwort in einer biochemischen Modifikation epithelständiger Muzine. Die Veränderungen in der Molekülstruktur führen unter anderem zu einer Volumenzunahme und einer veränderten Beschaffenheit der muzinösen Schutzschicht, was der Epithelzelle einen verstärkten physikalischen Schutz bietet (1, 86). Darüber hinaus führen Veränderungen in der Muzin-Struktur dazu, dass sich neue intra- und extrazelluläre Molekül-Interaktionen ergeben. Weit verzweigte, nach extrazellulär gerichtete, Kohlenhydrat-Strukturen auf den Muzinen dienen als Oberflächenrezeptor und leiten Informationen aus der Umgebung, bzw. externe Stimuli, mittels Signaltransduktion in die Epithelzelle weiter. Über diese Signalwege werden die für die Reparatur- und

2. Literaturdiskussion

Überlebensmechanismen der Zelle essentiellen Vorgänge der Zell-Proliferation, -Differenzierung und -Apoptose koordiniert (85).

Die im Rahmen von Entzündungsprozessen ablaufenden Muzin-abhängigen Veränderungen spielen darüber hinaus eine entscheidende Rolle in der Entstehung epithelialer Tumoren. Es lassen sich hierbei die gleichen charakteristischen Veränderungen in der Molekülstruktur von Muzinen beobachten, was Einfluss auf die Tumorkontrolle durch das Immunsystem und somit auf das weitere Tumorwachstum hat (1, 87, 88). Für das Verständnis der komplexen, Muzin-abhängigen Vorgänge während der Tumorgenese ist eine Betrachtung des Aufbaus und der biologischen Funktion von Muzinen essenziell.

Die Grundstruktur von Muzinen

Muzine sind komplexe Glykoproteine, deren Grundstruktur aus einem mit Kohlenhydratketten verknüpften Protein-Rückgrat gebildet wird. Innerhalb des Protein-Rückgrats findet sich bei allen Muzinen eine charakteristische Proteindomäne. Diese besteht aus sich wiederholenden Aminosäuren-Sequenzen, mit einem hohen Anteil an Prolin, Threonin und Serin (*tandem Repeat*-, PTS-Domäne). Die Sequenzabfolgen und die Anzahl an *Repeats* pro PTS-Domäne sind hierbei sehr variabel, wodurch sich starke Unterschiede innerhalb der Proteindomänen verschiedener Muzin-Typen ergeben. Die Seitenketten der *tandem repeat*-Domäne bilden die Ansatzstellen für die posttranslationale Modifikationen des Proteinkerns in Form von O- bzw. N-glykosidischen Kohlenhydrat-Verknüpfungen (1, 89-91). Im ersten Schritt dieser Glykosylierungsprozesse wird ein N-Acetyl-D-galactosamin-Rest (D-GalNAc) an die Serin- und Threonin-Seitenketten der *tandem-repeat* Domäne angefügt. Katalysiert wird dieser Schritt durch eine Gruppe von Isoenzymen, den *Polypeptide-N-acetylgalactosaminyltransferasen*. Diese Glykosyltransferasen werden gewebe- bzw. organspezifisch exprimiert und reagieren sensibel auf Umgebungsreaktionen im jeweiligen Gewebe. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen entstehen so, je nach ortsständiger Transferasen-Aktivität, spezifische und charakteristische Veränderungen im Glykosylierungsmuster der Muzine (8, 92, 93).

Die klassische Struktur der so entstandenen O-glykosidischen Kohlenhydrateinheiten besteht aus drei Regionen: (i) Einer Kernregion, die aus einem an den Peptidseitenketten gebundenen *GalNAc-O*-Rest sowie meist einem zusätzlichen Monosaccharid (*GalNAc* oder *GlcNAc*) besteht, (ii.) einem zentral gelegenen Kohlenhydrat-Rückgrat, das als Verlängerung der

2. Literaturdiskussion

Kernregion dient und (iii.) einer peripheren Region, welche endständig-gebundene äußerst variable Oligosaccharidketten aufweist (8, 81). Auf Grund einer unterschiedlichen Glykosylierungsdichte - also der Anzahl O-glykosidisch angefügter Zuckerreste pro jeweiliger Serin- und Threonin-Seitenkette - ergibt sich für die periphere Region eine große Variabilität. Verstärkt wird diese noch durch posttranslationale Modifikationen der Kohlenhydratketten, bspw. mittels Acetylierung, Sulfatierung und weiterer Glykosylierung. Hierdurch ergeben sich für die endständigen Kohlenhydrat-Strukturen auf Muzinen große makromolekulare Unterschiede (in Größe, Gewicht und Reichweite) sowie Unterschiede in ihrer biochemischen Funktion und Eigenschaften (1, 85, 94).

Neben der Vielzahl an O-glykosidischen Kohlenhydrat-Strukturen enthalten Muzine zudem verschiedene N-glykosidische Glykane. Eine Verknüpfung dieser N-Glykane an die entstehende Proteinstruktur während der Biosynthese führt zu biochemischen Modifikationen des Moleküls und hat Einfluss auf Prozesse während der Biosynthese, wie bspw. der Faltung und Aggregation des Muzin-Proteins (95, 96).

Eine charakteristische Muzin-Proteindomäne kann bis zu 500 einzelner Aminosäuresequenz-Abfolgen (*repeats*) enthalten. Ein *Repeat* enthält wiederum, je nach Länge, 5-100 potentielle Glykosylierungsstellen. Für jedes Muzin-Molekül ergibt sich so eine enorme Vielzahl an O-glykosidischen Kohlenhydrateinheiten. Sie machen einen Großteil der molekularen Masse von Muzinen aus und definieren über ihre biochemischen Eigenschaften die räumliche Struktur, Eigenschaften und Funktionen der Muzine. Anhand gemeinsamer Charakteristika kann eine allgemeine Unterteilung der Muzine in zwei Hauptformen erfolgen (1):

Die sekretorischen Muzine

Die Gruppe der sekretorischen Muzine besteht aus den Gel-bildenden Unterformen MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 und MUC19 (97-101) sowie den nicht-Gel-bildenden Muzinen MUC7, MUC8 und MUC9 (102-104). Neben einer zentral gelegenen stark glykosylierten PTS-Domäne weisen sekretorische Muzine meist weitere charakteristische Proteinstrukturen auf; wie bspw. die vWF-Typ C- und D-, Cystin-Knoten- und CysD-Domäne (105, 106). Über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Wasserstoffverbindungen an den cysteinreichen Proteindomänen findet eine Zusammenlagerung einzelner sekretorischer Muzine zu großen Oligomeren statt. Im Golgi-Apparat unterliegen diese Makromoleküle zunächst einer

2. Literaturdiskussion

ausgeprägten O-Glykosylierung und werden anschließend posttranslational, bspw. durch Hydratation und Sialysierung, weiter modifiziert. Im Trans-Golgi-Netzwerk erfolgen dann die Akkumulation und Verpackung der fertigen Moleküle in Becherzell-Vesikeln (85, 105). Die Prozesse der Verpackung und Sekretion sind abhängig von pH-Wert-Veränderungen und der Calciumionen-Konzentration innerhalb der Granula. So können bspw. Entzündungsreaktionen im Gewebe, über einen steigenden pH-Wert und eine absinkende Ca^{2+} -Konzentration, die sofortige Freisetzung sekretorischer Muzine bewirken (107, 108). Auf Grund dieser biochemischen Vorgänge und der Fähigkeit zur Zusammenlagerung von polaren Makromolekülen sind die sekretorischen Muzine in der Lage, bei Bedarf eine ausgeprägte Volumenzunahme und damit Veränderungen in der Beschaffenheit der muzinösen Schutzschicht zu bewirken (85, 109).

Die membranständigen Muzine

Die membranständigen Muzine (MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 und MUC21) sind über eine Transmembrandomäne, die zudem einen kurzen zytoplasmatischen Anteil enthält, an der apikalen Zellmembran verankert. Weiterhin enthalten sie eine stark glykosylierte Ektodomäne (PTS-/ *tandem-repeat-Domäne*), die mit ihren verzweigten Kohlenhydrat-Strukturen weit über die Zelloberfläche hinausragt und einen Bestandteil der muzinösen Schutzschicht auf Epithelien bildet. Über spezielle Kohlenhydrat-Strukturen innerhalb der Ektodomäne sind membranständige Muzine zudem in der Lage, in Interaktion mit Nachbarzellen und dem molekularen Umfeld zu treten (1, 85, 110). Neben einer zytoplasmatischen, einer membranständigen und einer extrazellulären Domäne enthalten membranständige Muzine weitere charakteristische Peptid-Domänen. Eine dieser Domänen, die sich in fast allen membranständigen Muzinen wiederfindet, ist die SEA- (*sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin*-) Domäne. Die SEA-Domäne besitzt sowohl (auto-)proteolytische als auch Protein-bindende Eigenschaften, wodurch es innerhalb dieser Domäne zur Zusammenlagerung neuer nicht-kovalenter Molekül-Untereinheiten kommt. Die membranständigen Muzine erhalten hierdurch die Fähigkeit, bei Bedarf die nicht-kovalent gebundene extrazelluläre Untereinheit (Ektodomäne) in die muzinöse Gelschicht abzugeben. Nach Freisetzung der Ektodomäne verbleiben die membranständigen Untereinheiten an der Zellmembran verankert, wo sie als neu exprimierter Rezeptor für Liganden-Interaktionen auf der Epithelzelle dienen können (111, 112).

2. Literaturdiskussion

Einige membranständige Muzine besitzen eine weitere, nach außen gerichtete Juxtamembran-Domäne. Die Peptidsequenzen dieser Domänen weisen große Ähnlichkeit zu den Strukturen verschiedener regulatorischer Proteine, wie den EGF-Rezeptoren und Zytokinen, auf. Diese deshalb auch *EGF-like*-Domäne genannte Juxtamembran-Domäne spielt eine weitere wichtige Rolle in der Rezeptor-Liganden-Interaktion von Muzinen auf der Zelloberfläche (113-115). Zusätzlich zu ihrer Schutzfunktion können membranständige Muzine über diese Mechanismen als Mediator und Regulator von Signalwegen und Zell-Zell-Interaktionen, bspw. im Rahmen entzündlicher oder maligner Prozesse der Epithelzelle, dienen (1, 115, 116).

2.3.2 Muzine und Krebs

Der Verlust der Zellpolarität

Epithelien bilden eine schützende Schicht auf der Oberfläche verschiedener Organsysteme und innerhalb der Ausführungsgänge von Körperdrüsen. Die apikale Seite der Epithelzelle ist dem äußeren Umfeld, bzw. dem Lumen der Ausführungsgänge zugewandt. Sowohl die Sezernierung als auch die Expression der sekretorischen und membranständigen Muzine finden an der apikalen Zellmembran statt. Durch Entzündungs- und Stressreaktionen im Gewebe kommt es zu einem Verlust der Zellpolarität von Epithelien. Hierdurch werden verschiedene Proliferations- und Überlebensmechanismen der Epithelzellen aktiviert und die normalerweise strikt apikal exprimierten Muzin-Moleküle werden über die gesamte Zellmembran repositioniert, wodurch diese wiederum neue Zell-Zell-Interaktionen mit basolateral exprimierten Molekülen eingehen können (9).

Der Verlust der Zellpolarität kann über eine Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen in einer Auflösung von Zell-Zellkontakte und letztlich in einem vollständigen Verlust der epithelialen Eigenschaften einer Zelle resultieren. Dieser Übergang wird als epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet (117). Ausgelöst durch verschiedene Reize kann der Vorgang der EMT in der Ausbildung invasiv wachsender Tumorzellen mit stammzellartigen Charakter resultieren (9, 118). In Tumorgeweben mit einer dauerhaften EMT-Aktivierung können die membranständigen Muzine bspw. mit den basolateral exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen interagieren und scheinbar als Promotor eines zunehmenden Polaritätsverlusts und einer weiteren Tumorprogression fungieren (9, 119).

2. Literaturdiskussion

Der Einfluss von Muzinen auf die Signalwege der Tumorzelle

Im Unterschied zu den sekretorischen Muzinen haben membranständige Muzine einen entscheidenden Einfluss auf die zellulären Signalwege für Wachstums- und Überlebensprozesse der Zelle (1, 85). Eine vermehrte Expression der membranständigen Muzine auf epithelialen Tumoren führt zu einer verstärkten Aktivierung zellulärer Signalwege, was sich die Tumoren für die Proliferation und Progression zunutze machen (9).

Das auf Tumorzellen verstärkt exprimierte, membranständige Muzin MUC1 ist bspw. durch die Interaktion mit Rezeptor-Tyrosinkinasen in der Lage, EGF- und ERBB-Rezeptor-abhängige Signalwege der Onkogenese zu aktivieren (120). Im Gegensatz zu einem zellulären Polaritätsverlust der Epithelzelle, der auch im Rahmen von physiologischen Entzündungsreaktionen auftritt, scheint eine Interaktion zwischen MUC1 und Rezeptor-Tyrosinkinasen ausschließlich im Tumor stattzufinden (9).

Zusätzlich zu einer membranständigen Aktivierung ist die zytoplasmatische Untereinheit von MUC1 (MUC1-C) in der Lage, weitere Tumorprogression-begünstigende Signalwege, wie den WNT- β -Catenin-, p53- und NF- κ B-Signalweg, zu regulieren (9, 121, 122). Neben MUC1 konnte auch für MUC4, einem weiteren membranständigen Muzin, gezeigt werden, dass dieses in der Lage ist, in verschiedene Signalwege einzugreifen und hierdurch die Apoptose von Tumorzellen zu inhibieren. Darüber hinaus begünstigt eine Überexpression von MUC4 auf Tumorzellen das invasive Wachstum und die Entstehung von Metastasen (123-125).

Muzine als Tumor-targets

Aufgrund der charakteristischen Molekülmodifikationen und einer nachweisbaren Überexpression im Tumorgewebe sowie durch den Einfluss auf Tumorprogress-fördernde Signalwege stellen membranständige Muzine eine attraktive Zielstruktur (*target*) für potenzielle Antikörper und Tumor-Vakzine dar. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den tumorassoziierten Veränderungen im Glykosylierungsmuster, die aus einer gestörten Synthese des Muzin-Peptids auf Grund einer veränderten Glykosyltransferasen-Aktivität im Tumorgewebe resultieren. Diese aberranten Kohlenhydrat-Epitope werden auf der Tumorzelle exprimiert und können Einfluss auf die Tumor-Morphologie und -Aktivität haben (10, 126). Auf der Oberfläche von Tumorzellen des Mamma- und Kolonkarzinoms konnten bereits einige dieser spezifischen Kohlenhydrat-Epitope nachgewiesen und als valide Tumormarker beschrieben werden (9, 119).

2. Literaturdiskussion

In Bezug auf MUC1 konnten in verschiedenen Studien sowohl eine vermehrte Expression im Tumorgewebe als auch ein charakteristisches Glykosylierungsmuster im Mammakarzinom nachgewiesen werden. Eine erhöhte MUC1-Expression zeigte sich in etwa 90% aller Brustkrebs-Tumoren und war häufig mit einer prognostisch günstigeren Tumorbiologie und einem verminderten Risiko für Fernmetastasen assoziiert (127-129). Neben den Veränderungen im Glykosylierungsmuster konnte zudem ein prognostisch bedeutsamer Einfluss hinsichtlich des subzellulären Verteilungsmusters von MUC1 im Tumorgewebe nachgewiesen werden (85, 130).

2.4 MUC1

2.4.1 MUC1 in Krebs

Die beiden Untereinheiten von MUC1

MUC1 wird als einzelnes Polypeptid translatiert und anschließend durch Autoproteolyse an der SEA-Domäne in zwei Untereinheiten (MUC1-C und MUC1-N) gespalten. Die Untereinheiten bilden anschließend wieder einen stabilen nicht-kovalent gebundenen Heterodimer-Komplex auf der Zellmembran (131, 132). Die in der Zellmembran verankerte MUC1-C-Untereinheit besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem zytoplasmatischen Anteil. Über die transmembranöse Domäne von MUC1-C wird die MUC1-N-Untereinheit an der apikalen Zellmembran verankert und kann hier in die muköse Schutzschicht von Epithelien sezerniert werden. Nach Freisetzung der terminalen Untereinheit bleibt die MUC1-C-Untereinheit zellmembrangebunden und fungiert als potentieller Rezeptor auf der Epithelzelle (119, 133).

In malignen Brustdrüsenzellen kommt es zu einem Verlust der apikalen/basalen Zellpolarität, was darin resultiert, dass der MUC1-C/MUC-N-Komplex über die gesamte Zellmembran exprimiert wird (134). MUC1-N, das auf der Oberfläche von Tumorzellen abgesondert wird, kann sich in stark erhöhter frei zirkulierender Form im Blutplasma von Brustkrebspatientinnen nachweisen lassen (135). Die normalerweise apikal exprimierte MUC1-C-Untereinheit kann auf Grund des Zell-Polaritätsverlusts in neue Interaktionen mit basolateral exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen treten (119). Zusätzlich zu den Veränderungen im subzellulären

2. Literaturdiskussion

Expressionsmuster lassen sich in über 90% der invasiven Mammakarzinome zudem verstärkte Expressionen von MUC1 nachweisen, was aus den genetischen Veränderungen und einer fehlregulierten Transkription des Glykoproteins im Tumorgewebe resultiert (127, 128, 130).

Die onkogene Wirkung von MUC1-C

Wie bereits dargelegt, geht eine aberrante Expression von MUC1 im Tumorgewebe mit einer verstärkten Bindung und Aktivierung basolateral exprimierter Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs), wie EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), einher. Eine glykosylierte Seitenkette der extrazellulären Domäne von MUC1-C dient hierbei als Brücke für den neu gebildeten MUC1-C/RTKs-Komplex (136). Verschiedene EGFR-abhängige Signalwege, die eine maligne Transformation der Tumorzellen begünstigen können, werden durch diese Bindung von MUC1-C aktiviert (116, 119). Zudem ist MUC1-C auch über die zytoplasmatische Domäne in der Lage, in weitere Proliferations- und Überlebensmechanismen der Tumorzellen einzugreifen. Durch eine Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren dient MUC1-C als Induktor unter anderem der eigenen Genexpressionen, was sich in einer nachweisbaren Erhöhung der MUC1-mRNA und einem Anstieg der MUC1-Proteinsynthese im Tumorgewebe widerspiegelt (119, 137, 138).

In verschiedenen Arbeiten konnten weitere MUC1-induzierbare Gene identifiziert werden, die mitunter eine Zellproliferation- und Tumorprogress-fördernde Wirkung zeigten. Die Prozesse der (Auto-)Induktion korrelieren hierbei mit der intrazellulären Akkumulation von MUC1-C, die wiederum unmittelbar mit dem Ausmaß der Expression auf der Tumorzelle zusammenhängt (139). Im Rahmen der intrazellulären Akkumulierung von MUC1-C findet eine Zusammenlagerung einzelner MUC1-C-Moleküle zu Homodimeren statt. Die Dimerisierung gelingt durch kovalente Bindungen innerhalb einer charakteristischen Cystein-Glutamin-Cystein- (CQC-) Sequenz der MUC1-C-Domäne. Das CQC-Motiv von MUC1-C dient daher verschiedenen neu entwickelten zellmembrangängigen Therapeutika als Angriffspunkt in der Krebstherapie (140, 141). Zusätzlich zu einem Weitertransport von MUC1-C in den Zellkern findet ein Transport zu den Mitochondrien statt. Gebunden an der äußeren Mitochondrien-Membran ist MUC1-C in der Lage, Apoptose-Signale der Zelle zu unterdrücken und so das Überleben der Tumorzelle zu begünstigen (142).

2. Literaturdiskussion

2.4.2 MUC1 als Tumorantigen

Die Zugänglichkeit von MUC1 auf der Tumorzelle

Neben einem möglichen Eingriff in die onkogenen Mechanismen von MUC1-C auf zellulärer Ebene, dienen immunogene Strukturen innerhalb der endständigen tandem-repeat-Domäne von MUC1-N und innerhalb der extrazellulären Domäne von MUC1-C verschiedenen neu entwickelten Antikörpern als mögliche Angriffspunkte (143, 144). Wie bereits erwähnt, wird die nicht-kovalent gebundene MUC1-N-Untereinheit auf der Tumorzelloberfläche abgesondert und kann im Blutplasma von Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden. Die frei zirkulierenden MUC1-N-Moleküle stellen eine potentielle Barriere für die Zugänglichkeit systemisch verabreichter Anti-MUC1-Antikörper dar, da diese bereits vor Erreichen der Zielstrukturen auf der Tumorzelloberfläche im Blutplasma „abgefangen“ werden können (119, 135, 145). Die membranständige MUC1-C-Untereinheit hingegen bleibt dauerhaft auf der Zelloberfläche gebunden. Aus diesem Grund stellen die hier enthaltenen immunogenen Kohlenhydrat-Strukturen zugängliche und damit potenziell geeignetere MUC1-Epitope als therapeutische Zielstrukturen im Tumorgewebe dar (146).

Die Entstehung tumorassoziierter Kohlenhydrat-Antigene

Die extrazelluläre Domäne von MUC1 beinhaltet eine Vielzahl O-glykosidisch gebundener Kohlenhydrat-Strukturen, die weit über die Zelloberfläche hinausragen und häufig endständige Sialinsäure-Reste aufweisen (9). Eine verminderte Glykosyltransferasen-Aktivität im Tumorgewebe führt zu einer unvollständigen Glykosylierung von MUC1 auf Tumorzellen. Dadurch kommt es zu der Entstehung neuer und verkürzter tumorassoziierter Kohlenhydrat-Antigene (*tumor-associated carbohydrate-antigens, TACA*) (10). Die Grundstruktur der physiologisch exprimierten MUC1-Glykane wird aus einem O-glykosidisch an Serin oder Threonin gebundenen Mono- oder Disaccharid-Rest gebildet (Core-2-O-Glykan-Ser/Thr). Durch eine verminderte Aktivität der Glykosyltransferase Core-2-b1,6-N-Acetylglucosamin-transferase findet eine normale Synthese dieser Core-2-O-Glykan-Strukturen im Tumor häufig nicht statt. Die für die endständige Sialylierung verantwortlichen Sialyltransferasen (α 2,3- und α 2,6-Sialyltransferase-I) hingegen werden im Tumorgewebe häufig verstärkt exprimiert. Dies führt zu einer übermäßigen Sialylierung der verkürzten O-Glykane, mit einer daraus resultierenden biochemischen Modifizierung des gesamten MUC1-Moleküls (81, 146). Beide tumorassozierten Veränderungen, eine verminderte Glykosylierung einerseits und eine

2. Literaturdiskussion

verstärkte Sialylierung andererseits, münden in der Entstehung charakteristischer tumorassoziierter MUC1-Kohlenhydratantigene. Anhand ihrer Grundstrukturen lassen sich diese in vier Gruppen unterteilen (10):

1. Das *Thomsen-nouveau*-Antigen (**Tn**; GalNAc- α 1-O-Ser/Thr), das aus einem an Serin- oder Threonin gebundenen einzelmem GalNAc-Kohlenhydrat besteht.
2. Das Thomsen-Friedenreich-, oder auch *Core-1*-Antigen (**T**; Gal β 1-3GalNAc- α 1-O-Ser/Thr), bei dem ein weiterer Galaktose-Rest an das O-glykosidisch gebundene GalNAc angefügt wird.
3. und 4.: Die beiden sialysierten Varianten **STn**- und **ST**-Antigen, die jeweils ein zusätzliches Sialinsäure-Derivat (*Neu5Ac*) an dem Glykan-Rest eines *Thomsen-nouveau*- oder *Thomsen-Friedenreich*-Antigen aufweisen (10).

Die neu entstandenen Kohlenhydratstrukturen haben Einfluss auf die räumliche Struktur und die biochemischen Eigenschaften des gesamten MUC1-Moleküls. Durch eine verminderte Synthese der normalerweise weit verzweigten Kohlenhydratstrukturen liegt das im Gesunden unzugänglich „abgeschirmte“ Proteinrückgrat von MUC1 im Tumorgewebe hingegen frei. Es ist dadurch einerseits zugänglich für den Abbau durch extrazelluläre Proteasen und bietet andererseits einen Ansatzpunkt für synthetisch hergestellte MUC1-Antikörper. Neben dem Proteinrückgrat stellen jedoch auch die neu entstandenen (sialysierten) Kohlenhydrat-Epitope auf MUC1 potenzielle Zielstrukturen dar (147). Die Identifizierung eines solchen spezifischen sialysierten Kohlenhydrat-Epitops von MUC1 im Mammakarzinom, dem in dieser Arbeit untersuchten *TA-MUC1*, führte bereits zu der Entwicklung eines hiergegen gerichteten anti-Tumor-Vakzins und schließlich zu der Synthese des monoklonalen anti- *TA-MUC1*-Antikörpers *GGSK-1/30* (14).

2.4.3 Die Identifizierung des neuen tumorassozierten Glykopeptids TA-MUC1

Die Entwicklung spezifischer Tumor-Vakzine

Durch die Identifizierung tumorassoziierter Kohlenhydrat-Antigene gelang es, MUC1-spezifische T-Zellen aus dem Serum von Brustkrebspatientinnen zu isolieren (148). In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine gegen tumorassoziertes MUC1 gerichtete T-Zell-Immunantwort in der Lage ist, die Entstehung neuer Tumorzellen zu verhindern und eine Tumorregression zu bewirken, ohne hierbei eine gegen gesunde Zellen gerichtete Autoimmunantwort auszulösen (80, 149). Bisher ließ sich eine so induzierte T-Zell-

2. Literaturdiskussion

Immunantwort im Mammakarzinom nicht beobachten. Insbesondere im frühen Tumorstadium machen sich Tumorzellen unterschiedliche immunsuppressive Mechanismen der Zelle zu Nutze, um eine tumorspezifische Immuntoleranz zu generieren, die unter anderem in der Unterdrückung einer effektiven T-Zell-Immunantwort resultiert (150, 151).

Durch den Einsatz tumorspezifischer Vakzine, soll das Immunsystem angeregt werden, Mechanismen der Immuntoleranz zu umgehen und entartete selbst-Antigene als Fremd zu erkennen, um so Tumorzellen mit Hilfe der eigenen Abwehrmechanismen zu bekämpfen. Eine so induzierte Immunantwort kann dabei unterschiedliche humorale und zelluläre Abwehrmechanismen beinhalten (152):

1. Eine Aktivierung zytotoxischer CD8⁺-T-Zellen, die in der Lage sind, Tumorantigen-exprimierende Tumorzellen zu binden und direkt zu zerstören.
2. Die Aktivierung verschiedener CD4⁺-T-Zellen, die in der Lage sind, das Ausmaß, die Dauer und die Effektivität der ausgelösten Immunantwort zu modulieren.
3. Die Aktivierung von B-Zellen, was eine Produktion von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern im Sinne einer humoralen Immunantwort bewirkt.

Die Identifizierung von TA-MUC1

Auf Grund der Tatsache, dass die im Tumorgewebe verändert-exprimierten Glykosyl- und Sialyltransferasen in ihrer Funktion nie vollständig gestört sind, ist es nachvollziehbar, dass sich neben den aberranten Kohlenhydrat-Strukturen vereinzelt auch normale unveränderte Glykane auf MUC1-Molekülen im Tumor wiederfinden. Es ist daher möglich, dass der Einsatz von MUC1-spezifischen Antikörpern in der Immuntherapie in einer potenziell schwerwiegenden Autoimmun-Reaktion resultiert, da sich die jeweiligen MUC1-Epitope der verwendeten Antikörper auch auf MUC1-Molekülen gesunder Epithelzellen wiederfinden (14). Da sich „reine“ tumorassoziierte MUC1-Epitope nur schwer aus Tumorzellen isolieren lassen, müssen diese in synthetischen Verfahren hergestellt werden (14, 153). Doch auch die synthetisch hergestellten MUC1-Glykopeptide werden vom Immunsystem zunächst als körpereigene, nicht-immunogene Strukturen erkannt, weshalb sie in ihrer Grundform für die Entwicklung wirksamer Tumor-Vakzine und letztlich zur Generierung spezifischer anti-MUC1-Antikörper ungeeignet sind (154). Um die Mechanismen der Immuntoleranz zu umgehen, müssen die synthetisierten Glykopeptid-Epitope innerhalb des Vakzins mit einem Immunsystem-stimulierenden Partner kombiniert werden. Das Ausmaß der durch das Vakzin

2. Literaturdiskussion

induzierten selektiven Immunantwort ist dabei abhängig von seinem jeweiligen Glykopeptid-Epitop (14).

In einer Zusammenarbeit zwischen dem Institut für organische Chemie und dem Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz wurden drei neue MUC1-spezifische Tumorstoffimpfungen entwickelt, die gegen verschiedene Glykopeptid-Strukturen von tumorassoziierten MUC1 gerichtet sind (14). Drei verschiedene synthetische MUC1-(Glyko-)Peptide dienten als Immunantwort-definierendes B-Zell-Epitop innerhalb des Impfstoffs. Ein Tetanus-Toxoid (TTTox) wurde als immunogen wirksamer Träger verwendet. Das Tetanus-Toxoid enthält potenzielle T-Zell-Epitope (Th-Zell-Epitope) die in der Lage sind, eine effektive T-Helferzell-Antwort zu induzieren, was wiederum in einer humoralen Immunantwort und in der Ausreifung Antikörper-produzierender B-Zellen resultiert. Th- und B-Zell-Epitop wurden von einem flexiblen *Spacer*-Molekül innerhalb des Impfstoffs voneinander getrennt, was eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Komponenten und eine mögliche Konformationsänderung verhindert.

Die synthetisierten MUC1-B-Zell-Epitope enthielten jeweils eine definierte Sequenz der *tandem-repeat*-Struktur von MUC1, die hier um zwei weitere Aminosäuren (Pro und Ala) auf eine 22-Aminosäuren-lange Peptid-Sequenz verlängert und weiter modifiziert wurde. Das B-Zell-Epitop des ersten anti-TA-MUC1-**Vakzins (V1)** bestand aus einer verlängerten 27-mer Peptid-Sequenz mit einem glykosidisch gebundenen GalNAc-Rest am Serin 22 (Tn-Antigen/GalNAc- α 1-O-Ser22). Das **Vakzin (V2)**, das später zur Generierung des Antikörpers GGSK-1/30 führte, enthielt die 22-mer Basissequenz und einen sialysierten GalNAc-Rest an der Serin-Seitenkette in Position 17 (STn-Antigen/ Neu5Ac-GalNAc- α 1-O-Ser17). Zur Darlegung der Bedeutsamkeit des glykosylierten Anteils als immunogene Struktur, wurde zudem ein drittes **Vakzin (V3)** hergestellt, welches lediglich die nicht-glykosylierte 22-Aminosäuren lange Peptid-Sequenz enthielt.

Mit den verschiedenen Vakzinen immunisierte man dann *BALB/c*-Mäuse und beschrieb die durch das jeweilige MUC1-B-Zell-Epitop ausgelöste spezifische Immunantwort. Anhand jeder der drei Vakzine gelang es, große Mengen (Glyko)Peptid-Epitop-spezifische Antikörper zu generieren. Mittels der so gewonnenen Antikörper-Seren wurden anschließend MUC1-positive Brustkrebszellen (T47D-Zellen) inkubiert (14). Die durch das **Vakzin-3** induzierten

2. Literaturdiskussion

Antikörper, die gegen das nicht-glykosylierte, reine Peptid-Epitop von MUC1 gerichtet waren, wiesen hierbei so gut wie keine spezifische Tumorzell-Bindung auf. **Vakzin-2**-Antikörper, die gegen ein sialyliertes Glykopeptid, bestehend aus der gleichen Peptidsequenz wie **V3** gerichtet waren, wiesen hingegen eine starke T47D-Zell-Bindungsrate auf.

Durch diesen Vergleich konnte man beweisen, dass eine zusätzliche Glykosylierung des B-Zell-Epitops obligatorisch für die Induktion einer Immunantwort gegen tumorassoziiertes MUC1 ist. Interessanterweise zeigten **Vakzin-1**-induzierte Antikörper, die ebenfalls gegen ein Glykopeptid-Epitop mit einer längeren Peptidsequenz und einer kürzeren Glykan-Struktur (Tn-Antigen an Ser22) gerichtet waren, zwar ebenfalls eine positive, jedoch deutlich schwächere Tumorzell-Bindung. Es schien also, dass sowohl die Länge der Peptidsequenz und die Expression verschiedener Glykanstrukturen als auch das Verhältnis dieser beiden Komponenten innerhalb des B-Zell-Epitops entscheidend für die Induktion einer anti-MUC1-Immunantwort sind (14).

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse bzgl. einer durch das **V2**-Glykopeptid-Epitop ausgelösten Immunantwort gegen MUC1, wurde der gegen das **V2**-Epitop gerichtete monoklonale IgG-Antikörper GGSK-1/30 mittels Hybridom-Technik synthetisiert. Zum Nachweis einer tumorspezifischen Expression seines Glykopeptids TA-MUC1 wurde zunächst die Antikörperbindung von GGSK-1/30 im gesunden Brustdrüsengewebe beurteilt. GGSK-1/30 zeigte dabei keinerlei Bindung von unverändert glykosylierten MUC1 auf gesunden Epithelzellen. Das GGSK-1/30-Epitop TA-MUC1 bewies damit eine tumorspezifische Expression, bei einer zugleich nachweisbaren hohen Bindungsaffinität im Tumorgewebe (14). Mittels synthetisch hergestellter MUC1-Glykopeptid-Vakzine, bestehend aus einem immunstimulierenden Th-Zell-Epitop und einer immunselektiven Glykopeptid-B-Zell-Komponente, ließen sich hohe Titer MUC1-spezifischer Antikörper induzieren. Verschiedene Faktoren, wie die Länge der Peptidsequenz, das jeweilige gebundene Kohlenhydrat-Antigen, die Position der glykosidischen Bindung am Peptid sowie das Verhältnis der Komponenten zueinander waren dabei ausschlaggebend für die Wirksamkeit des Vakzins.

Die durch das MUC1-B-Zell-Epitop TA-MUC1 ausgelöste effektive und tumorspezifische Immunantwort liegt in der spezifischen Struktur des Glykopeptid-Epitopes begründet. TA-MUC1 scheint die Struktur von verändert glykosylierten MUC1-Molekülen auf Tumorzellen exakt widerzuspiegeln. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30 lässt sich TA-

2. Literaturdiskussion

MUC1 sehr sensitiv und exklusiv im Tumorgewebe nachweisen (14). TA-MUC1 scheint einen geeigneten Tumormarker im Brustkrebsgewebe darzustellen, dessen potenzieller diagnostischer und therapeutischer Nutzen es in diesen und weiteren Studien zu evaluieren gilt.

2.5 Zielsetzung der Dissertation

Biochemische Veränderungen im Tumorgewebe bewirken die Entstehung aberranter Glykosylierungsmuster des Glykoproteins MUC1 auf Brustkrebszellen. Die Identifizierung eines neuen tumorassoziierten MUC1-Epitops TA-MUC1 führte zur Entwicklung des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30. Anhand eines immunhistochemischen Nachweisverfahrens durch GGSK-1/30 wurde in dieser Arbeit die Expression von TA-MUC1 im Mammakarzinom untersucht. Ziel war es, die Eignung von TA-MUC1 als Tumormarker und therapeutische Zielstruktur im Mammakarzinom anhand des Expressionsmusters im Brustkrebsgewebe und durch Korrelations- und Überlebenszeitanalysen zu beurteilen. Dabei wurden sowohl die Gesamtexpression als auch die subzelluläre Lokalisation von TA-MUC1 im Tumorgewebe berücksichtigt und als unabhängige Prognostikatoren untersucht. Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit lag auf dem Kollektiv triple-negativer-Brustkrebspatientinnen, da insbesondere für das TNBC noch immer limitierte Therapieoptionen zur Verfügung stehen und der potenzielle Einsatz des TA-MUC1-Antikörpers GGSK-1/30 als neue therapeutische Möglichkeit hier von besonderer Bedeutung war.

3. Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

I. Geräte

Table 5: *Verwendete Geräte mit Hersteller*

Geräte	Hersteller
Dampfgarer MultiGourmet	Braun GmbH, Kronberg im Taunus
Kamera (DFC290)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Laborwaage	
Mikroskop (22EB)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop (DMRB)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe (accu-jet® pro)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Vortex-Schüttler VF2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen im Breisgau
Wärme und Trockenschrank (Heraeus Function Line UT6)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

II. Verbrauchsmaterialien

Table 6: *Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller*

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Dako Pen (S2002)	Agilent Technologies Denmark ApS, Glostrup, Dänemark
Einweg-Pipetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Menzel™ Deckgläser (24 x 32 mm, 24 x 50 mm, 24 x 60 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Objekträger (FLEX IHC Microscope Slides, Code-Nr.: K8020)	Agilent Technologies Denmark ApS, Glostrup, Dänemark
Objekträger Menzel (Superfrost plus)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen (10 µ, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Polypropylen Röhrchen (5 ml, 15 ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (1 ml, 5 ml)	Greiner Bio One International GmbH, A-4550 Kremsmünster, AUT

3. Material und Methoden

III. Gebrauchsmaterialien

Tabelle 7: *Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Hersteller*

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Deckglaspinzette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Edelstahlpinzette (flach und spitz)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Färbetrog aus Glas mit Halterung	Carl Roth GmbH + Co. KG
Laborflaschen	Carl Roth GmbH + Co. KG
Messzylinder (Duran®, 250 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Objektträger-Halterung (48 Plätze)	Eppendorf AG, Hamburg
Trichter	Vitlab GmbH, Großostheim

IV. Chemikalien

Tabelle 8: *Verwendete Chemikalien mit Ref.-Nr. und Hersteller*

Chemikalie	Referenznummer	Hersteller
DAKO REAL™ Antibody Diluent	S2022	Agilent Technologies Denmark ApS, Glostrup, Dänemark
Ethanol 99,8% (vergällt mit IPA, MEK und Bitrex reinst)	127194.1212	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mayer's Hämlaunlösung	1092490500	Merck KGaA, Darmstadt
Mikroskopie-Einschlussmittel		Hirtz & Co. KG, Köln
Rinderserumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumin)	A2153-100G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Spüllösung (Ampuwa®)	1088813	Fresenius Kabi Deutschland GmbH®, 61346 Bad Homburg
Wasserstoffperoxid 30% (ROTIPURAN® p.a., ISO, stabilisiert)	8070.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
Xylol Isomerengemisch	131769.1612	AppliChem GmbH, Darmstadt

3. Material und Methoden

V. Kits

Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/ DAB+,
Rabbit/ Mouse - K5007 (Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK)

Enthält:

- i. Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) (100 ml)
- ii. Dako REAL™ Substrate Buffer (250 ml)
- iii. Dako REAL™ DAB+ Chromogen (5 ml, 50x konzentriert)

VI. Puffer und Lösungen

PBS-Puffer:

0,2 g KCl
0,2 g KH₂PO₄ (wasserfrei)
8 g NaCl
0,9 g Na₂HPO₄ (wasserfrei)
Add 1 l Aqua dest.
pH = 7,4 einstellen

Puffer low-pH für Demaskierung:

Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 (10x) - S1699 (Dako Denmark A/S, Glostrup, DNK)

VII. Antikörper

Tabelle 9: Verwendeter Primärantikörper

Antikörper	Klon	Konzentration	Hersteller
GGSK-1/30	1/30	0,02 µg/ml	Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz

3. Material und Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektiv und Datenerhebung

Das ausgewählte Kollektiv bestand aus 241 Brustkrebspatientinnen, die im Rahmen eines erstdiagnostizierten Mammakarzinoms im Zeitraum von 2009 bis 2016 an der Universitätsmedizin operiert wurden. Für jede Patientin lagen Gewebeproben im Sinne pathologisch aufbereiteter Schnellschnitte sowie asservierte Vollblut- und Plasmaproben vor. Ein Biobank-Ethikantrag für die Material- und Datennutzung wurde zuvor genehmigt. Patientinnen mit primär metastasiertem Mammakarzinom (*MI-Status*) wurden nicht miteingeschlossen. Darüber hinaus erfolgte keine weitere Eingrenzung oder Vorauswahl hinsichtlich sonstiger Tumor- oder Patientenmerkmale.

Zur Follow-Up-Erhebung wurden elektronische Patientenakten, archivierte Tumor-Boards und Pathologie-Berichte hinsichtlich klinischer Daten (Erstdiagnose- und OP-Daten, Überlebenszeiträumen, Auftreten von Metastasen und Rezidive, erfolgte Therapien etc.) und histopathologischer Tumormerkmale (Hormonrezeptorstatus, Tumorhistologie, TNM-Stadien etc.) ausgewertet. Nach Bewilligung eines Antrages konnte zudem Einsicht in das Krebsregister Rheinland-Pfalz genommen werden, wodurch es möglich war, zuvor nicht erfasste Überlebenszeiträume und Todesfälle zu ergänzen.

3.2.2 Immunhistochemie

Untersuchte Proben

Bei den untersuchten Patienten-Proben handelte es sich um in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Brustkrebsgewebe, bereitgestellt durch das Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz. Zur weiteren Untersuchung wurden die Paraffinblöcke mittels Rotationsmikrotom in einer Dicke von 2 µm zugeschnitten und im Wasserbad auf die Objektträger aufgebracht. Nach dem Antrocknen auf einer Wärmeplatte wurden die Schnitte dann bei 37 °C über Nacht in einem Brutschrank inkubiert.

Als Positivkontrolle für jeden Färbe-Durchgang dienten MCF7-Brustkrebszellen, die MUC1 in hohem Maße auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (155). Eine Negativkontrolle erfolgte anhand gesunder Brustgewebeschnitte. Zudem wurde in jedem Färbe-Durchgang ein Pendant-Schnitt des untersuchten Tumorblocks lediglich mit Substrat-Puffer anstelle des Primärantikörpers *GGSK-1/30* inkubiert, was als technische Negativkontrolle diente.

3. Material und Methoden

Entparaffinierung

Um das auf den Objektträgern aufgetragene Tumorgewebe und die hier exprimierten Antigene für die weiteren Schritte zugänglich zu machen, wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Hierfür erfolgte eine Inkubation mit Xylol gefolgt von einer Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe:

<i>Xylol</i>	<i>10 min</i>
<i>Xylol</i>	<i>10 min</i>
<i>Xylol</i>	<i>10 min</i>
<i>Ethanol (99,8%)</i>	<i>2 min</i>
<i>Ethanol (99,8%)</i>	<i>2 min</i>
<i>Ethanol (96%)</i>	<i>2 min</i>
<i>Ethanol (70%)</i>	<i>2 min</i>

Im Anschluss wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und hier bis zur weiteren Verarbeitung in diesem belassen.

Antigendemaskierung

Eine Fixierung des Gewebes in Formalin (*Formaldehyd*) führt über eine Ausbildung von Hydroxymethylgruppen und *Schiffschen*-Basen zu einer molekularen Quervernetzung von Proteinen. Die Antigenität des Proteins wird verändert und potenzielle Epitope werden für eine immunhistologische Untersuchung mittels Antikörper unzugänglich (156). Dieser Prozess kann durch eine Antigendemaskierung mittels enzymatischer Vorbehandlung oder Hitze-induziert teilweise oder vollständig rückgängig gemacht werden (157, 158). In dieser Arbeit wurde eine Hitze-Demaskierung gewählt und die Schnitte in einer pH 6-Citratpuffer-Lösung für 30 Minuten bei 100 °C in einem Dampfgerat erhitzt. Anschließend wurden die abgekühlten Schnitte in Aqua dest. gewaschen.

Hemmung der endogenen Enzymaktivität

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität und zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung erfolgte eine Behandlung der Schnitte mit 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte erneut in Aqua dest. gewaschen. Um eine optimale Benetzung der Antikörper für diesen und die nachfolgenden Schritte zu ermöglichen, wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt und der Tumorgewebeschnitt mittels Fettstiftes umrandet.

3. Material und Methoden

BSA-Block

Zur Absättigung freier Bindungsstellen und um eine optimale Antikörper-Bindung zu gewährleisten erfolgte eine zusätzliche Inkubation der Schnitte mit 3% BSA-Block für 30 min. In zuvor durchgeführten Testfärbungen zeigte sich dadurch eine deutlich verbesserte Antikörperbindung.

Spezifische Färbung

Die nachfolgende immunhistologische Färbung erfolgte im Sinne einer indirekten Nachweismethode des gesuchten Antigens *TA-MUC1* in einem Zwei-Schritt-Verfahren. Als Primärantikörper diente hierbei der monoklonale Antikörper *GGSK-1/30*. Für die nachfolgenden Schritte wurde ein Dako REAL™ EnVision™-Kit verwendet. Bei dem verwendeten Zweitantikörper handelte es sich um ein Peroxidase-konjugiertes Polymer, das auch Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-Immunglobuline enthält (159).

Die Reaktion wurde mit dem ebenfalls im Kit enthaltenen Dako REAL™ DAB+ Chromogen sichtbar gemacht. Das Färbeprotokoll stellte sich zusammengefasst wie folgt dar:

- | | |
|--|-----------|
| 1. GGSK-1/30 (0,02 µg/ ml) | 30 min |
| 2. PBS | 3 x 2 min |
| 3. Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) | 30 min |
| 4. PBS | 3 x 2 min |
| 5. Dako REAL™ DAB+ Chromogen, 1:50 in Substratpuffer | 5 min |

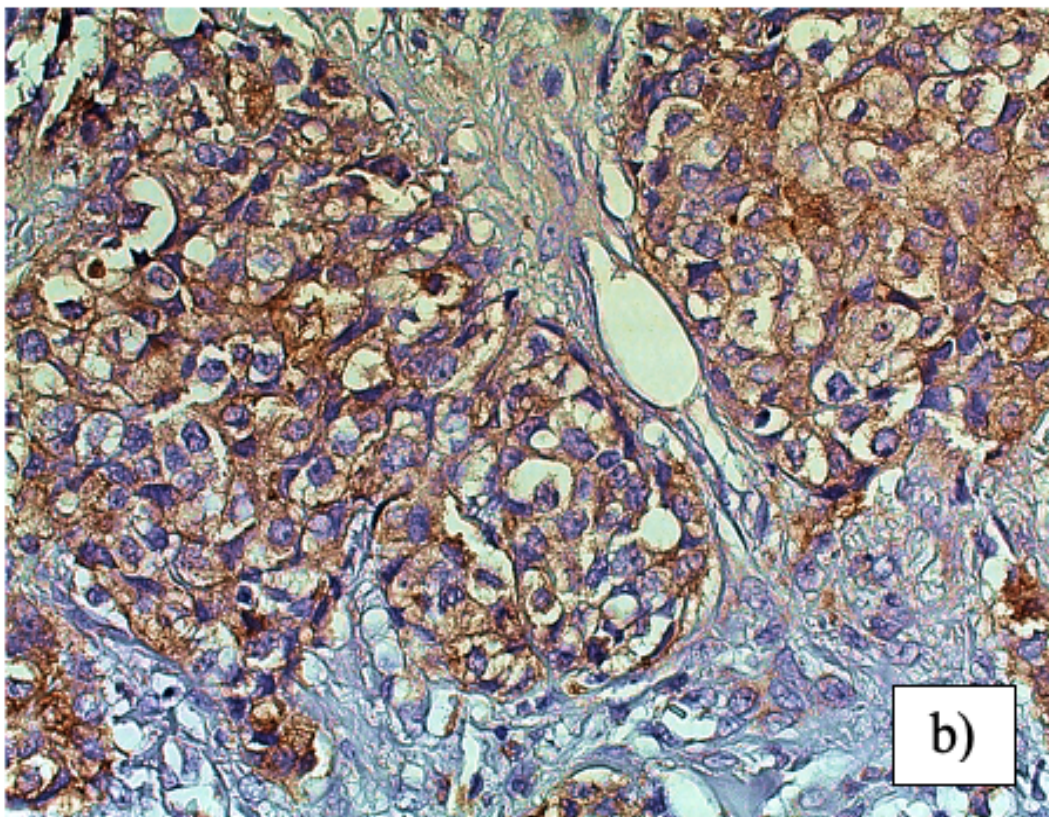
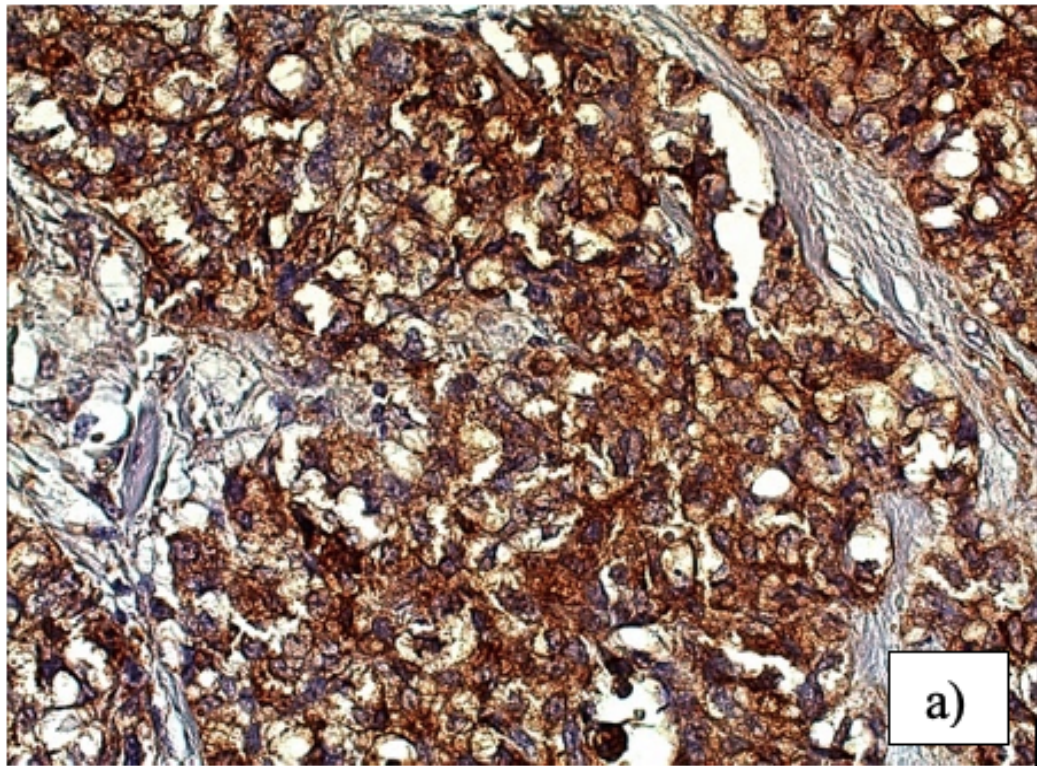
Nach diesen Schritten wurden die Tumorschnitte aus der Kammer in Färbetröge umgesetzt und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

GGSK-1/30-Färbung

GGSK-1/30 ist ein mittels Hybridom-Technik synthetisch hergestellter monoklonaler IgG1-Antikörper, der gegen ein spezifisches Glykopeptid-Epitop auf MUC1 gerichtet ist. Ausgehend von der ursprünglichen *in vitro* eingesetzten Konzentration von 1 µg/ ml (*Verdünnung 1:10000*), wurden die Tumorschnitte in mehreren Testläufen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen gefärbt und hinsichtlich der geeignetsten Färbeintensität beurteilt. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Jörg Jäkel, einem erfahrenen gynäkologischen Pathologen, wurde eine Konzentration von 0,02 µg/ml (*Verdünnung 1:500000*) als geeignetste Antikörperkonzentration definiert.

Nachfolgend sind immunhistochemische Färbungen des gleichen Tumorpräparats mit unterschiedlichen GGSK-1/30-Verdünnungen dargestellt (Abb. 1).

3. Material und Methoden



3. Material und Methoden

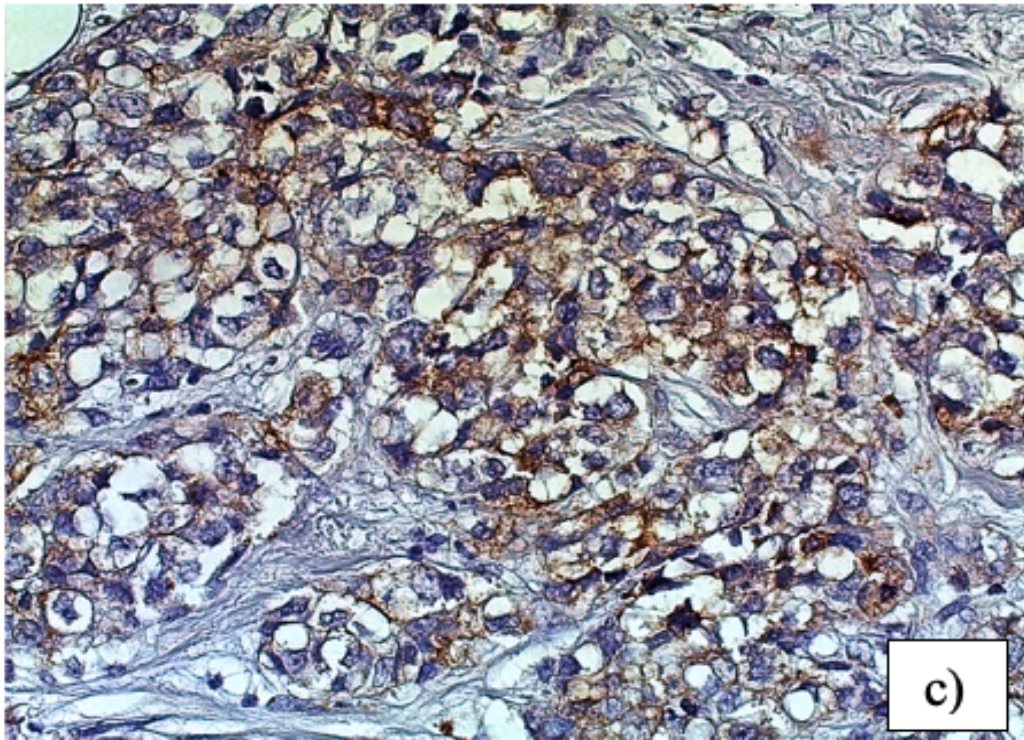


Abbildung 1: Beispiele von immunhistochemischen Färbungen in unterschiedlicher Antikörper-Konzentration.

Dargestellt sind Bildausschnitte von immunhistochemischen Färbungen des gleichen Tumorpräparats in unterschiedlicher Verdünnung des Primärantikörper GGSK-1/30.

Konzentration: a) 1 $\mu\text{g/ml}$, b) 0,02 $\mu\text{g/ml}$, c) 0,01 $\mu\text{g/ml}$

Gegenfärbung und Einbettung

Zur Gegenfärbung im Gewebe erfolgte eine Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin. Hierfür wurden die Schnitte für 5 min in Mayer's Hämalaunlösung (1:5 in Wasser verdünnt) gefärbt und im Anschluss erneut für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Im letzten Schritt folgte die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe gefolgt von Xylol:

<i>Ethanol (70%)</i>	<i>2 min</i>
<i>Ethanol (96%)</i>	<i>2 min</i>
<i>Ethanol (99,8%)</i>	<i>2 min</i>
<i>Ethanol (99,8%)</i>	<i>2 min</i>
<i>Xylol</i>	<i>5 min</i>
<i>Xylol</i>	<i>5 min</i>
<i>Xylol</i>	<i>5 min</i>

3. Material und Methoden

Abschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Deckgläsern eingeschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die mittels GGSK-1/30 nachgewiesene TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe wurde von Herrn Dr. med. Jörg Jäkel aus dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin-Mainz und zwei weiteren geschulten Gutachtern an einem Leitz-Lichtmikroskop (*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar*) unabhängig voneinander evaluiert. Für die Bewertung der Tumorschnitte wurde ein semiquantitativer Score im Sinne des Immunoreactivity Scores (IRS) nach Remmele und Stegner gewählt (160). Der prozentuale Anteil positiv gefärbter Tumorzellen (0 = keine Färbung, 1 = $\leq 10\%$; 2 = 11-50 %, 3 = 51-80 %, 4 = $\geq 80\%$) und die vorherrschende Färbeintensität (0 = keine, 1 = schwach, 2 = moderat und 3 = stark) werden hierbei multipliziert und ergeben einen immunoreactivity Score (IRS) von 0-12.

Neben einer semiquantitativen Auswertung mittels IRS erfolgte auch eine qualitative Auswertung hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1. Unterschieden wurde hierbei zwischen einer rein membranständigen (*m*), einer rein zytoplasmatischen (*c*), einer gemischten, überwiegend membranständigen (*mc*) und einer gemischten, überwiegend zytoplasmatischen (*cm*) TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe.

Sofern im Tumorschnitt enthalten, wurden auch Carcinoma in situ-Anteile (DCIS oder LCIS) separat hinsichtlich der Gesamtexpression (IRS) und der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 beurteilt.

Im Folgenden sind beispielhafte GGSK-1/30-Färbungen einiger Tumorschnitte mit unterschiedlicher Färbeintensität und verschiedenen Expressionsmustern von TA-MUC1 dargestellt (Abb. 2-5). Weiterhin finden sich Beispiele der Positivkontrollen mit MCF7-Brustkrebszellen und Negativkontrollen mit gesunden Brustdrüsengewebe (Abb. 6 und 7).

3. Material und Methoden

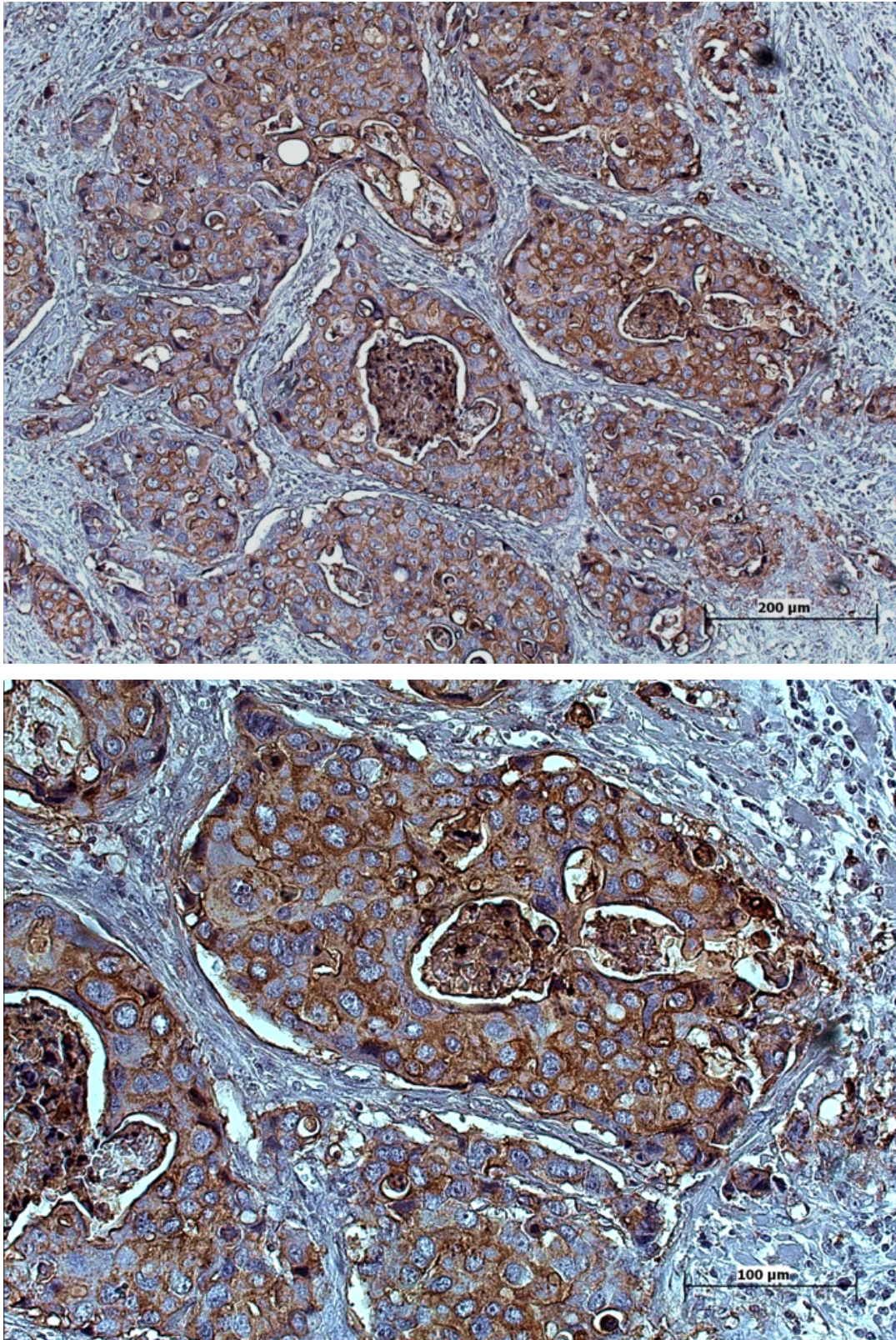


Abbildung 2: Beispiel: gemischt, überwiegend membranständiges Expressionsmuster (mc)

3. Material und Methoden

Ausschnitt eines Tumorschnitts mit gemischter, überwiegend membranständiger TA-MUC1-Expression (mc), Anteil positiv gefärbter Tumorzellen $\geq 80\%$ (4) Färbeintensität moderat (2) = IRS von 8; a) 100x, b) 200x

3. Material und Methoden

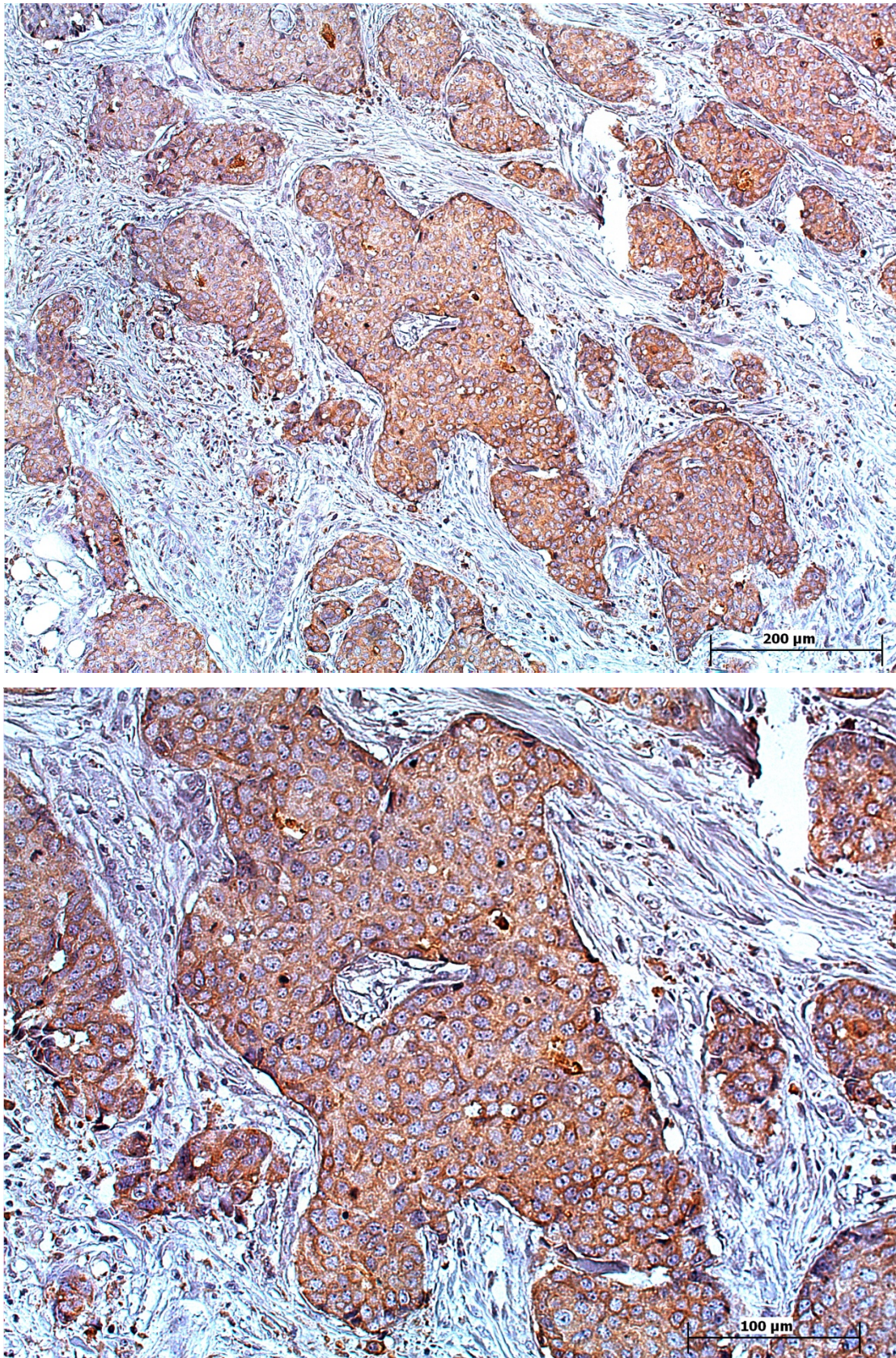


Abbildung 3: Beispiel: gemischt, überwiegend zytoplasmatisches Expressionsmuster (cm)

3. Material und Methoden

Ausschnitt eines Tumorschnitts mit gemischter, überwiegend zytoplasmatischer TA-MUC1-Expression (cm), Anteil positiv gefärbter Tumorzellen im gesamten Schnitt 51 – 80 % (3) Färbeintensität stark (3) = IRS von 9; a) x200, b) x400

3. Material und Methoden

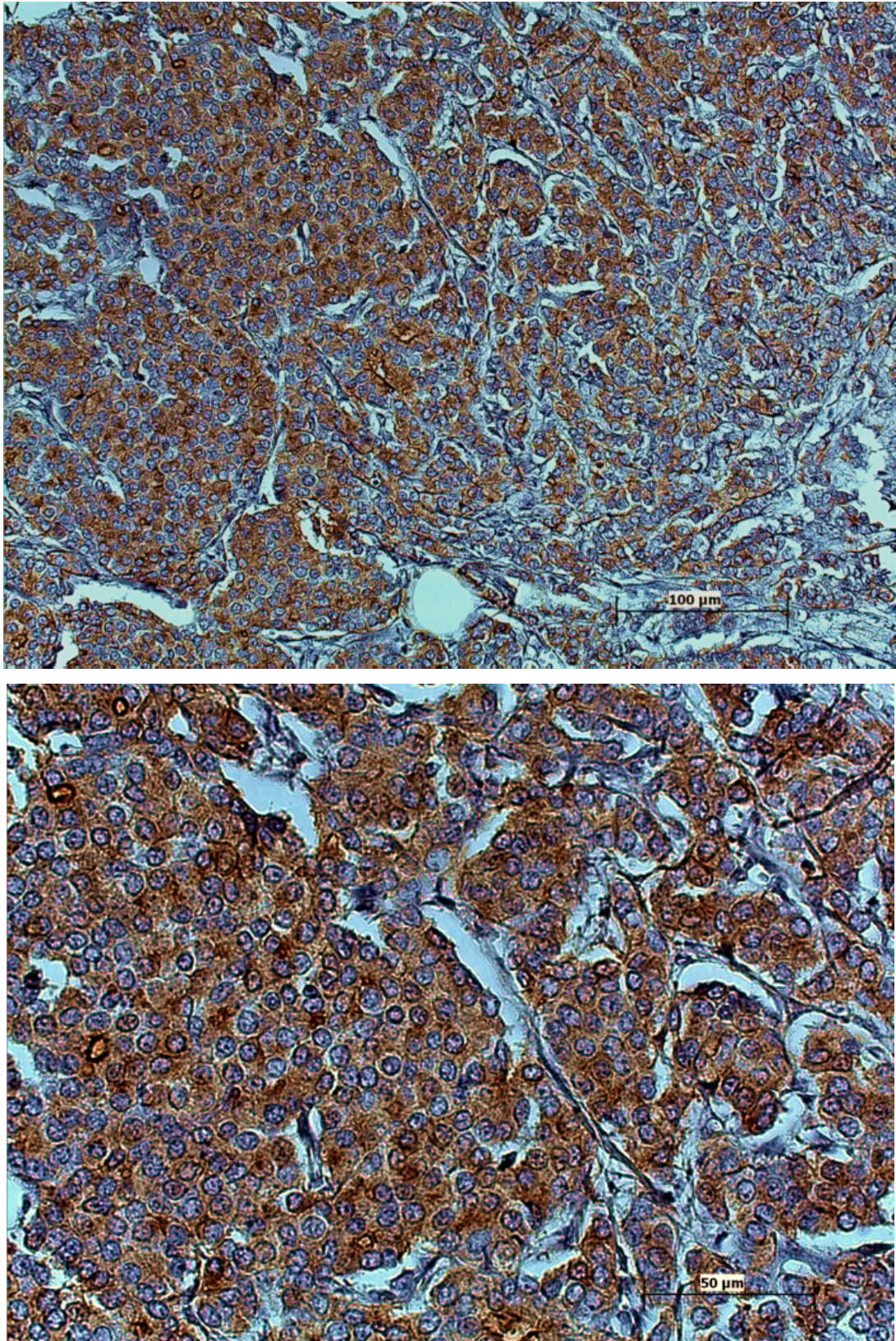


Abbildung 4: Beispiel: rein zytoplasmatisches Expressionsmuster (c)

3. Material und Methoden

Ausschnitt eines Tumorschnitts mit ausschließlich zytoplasmatischer TA-MUC1-Expression (c), Anteil positiv gefärbter Tumorzellen im gesamten Schnitt 11 – 50 % (2) Färbeintensität stark (3) = IRS von 6; a) x200, b) x400

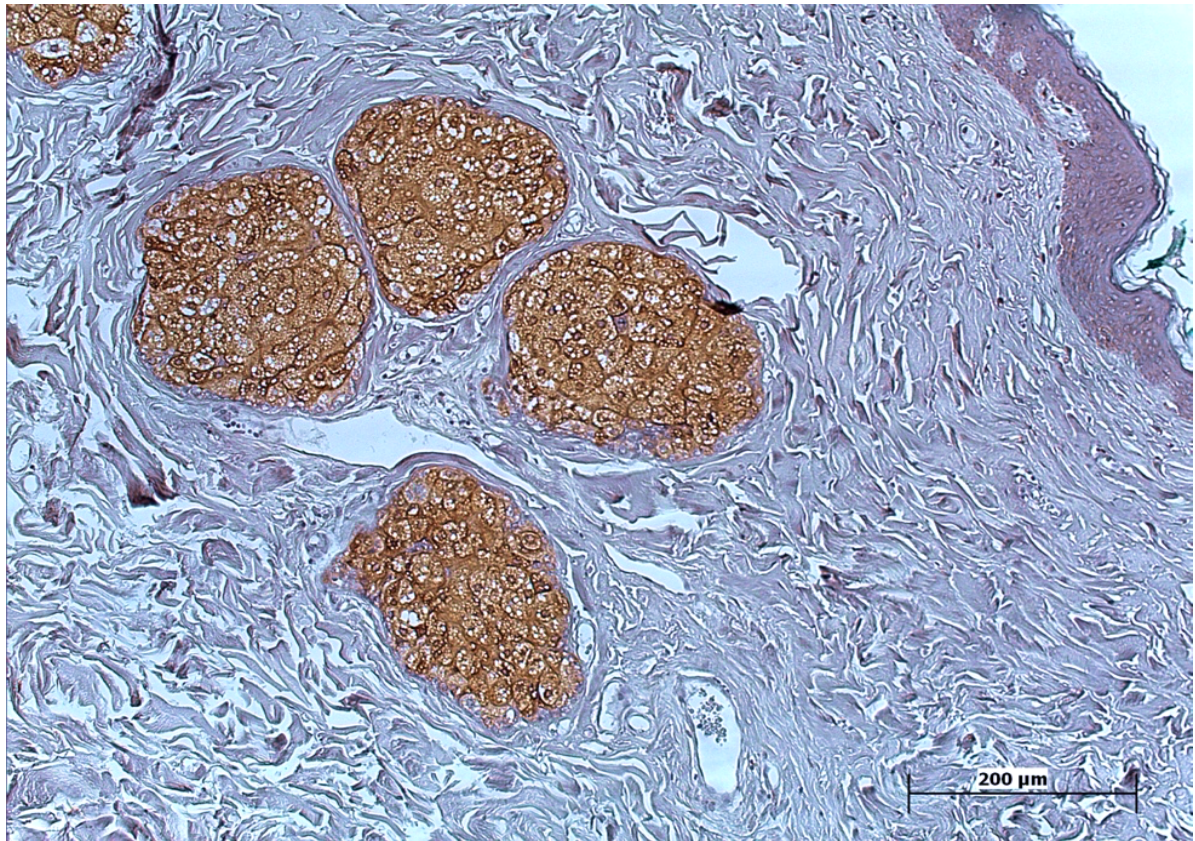
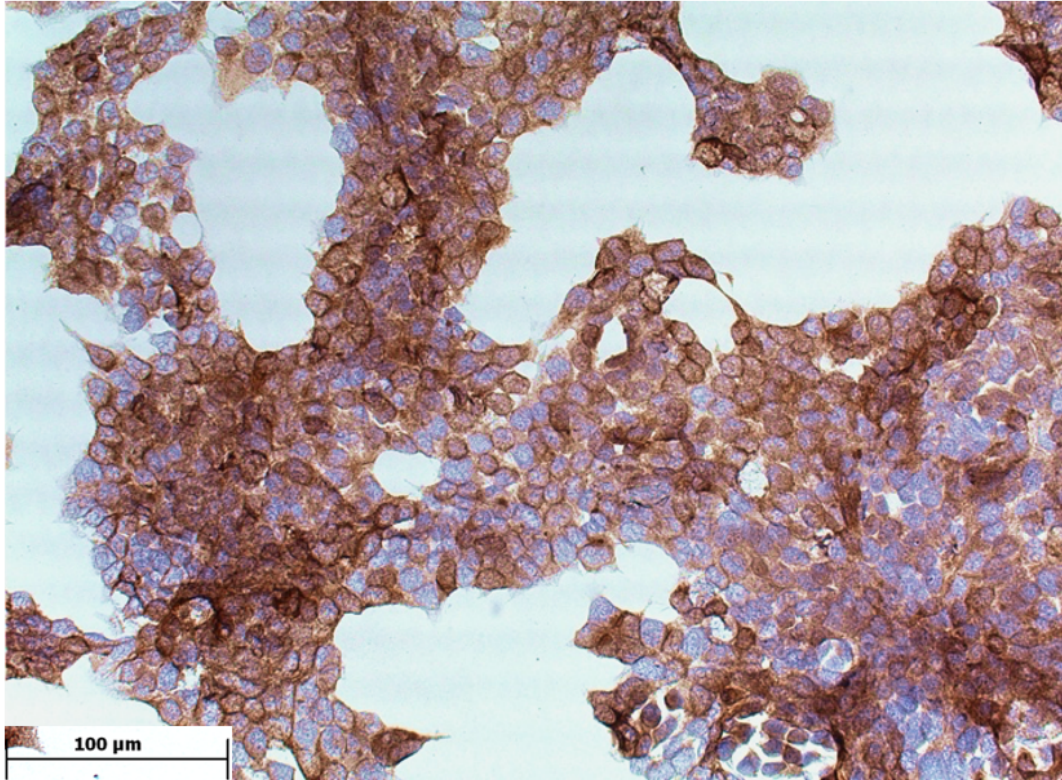


Abbildung 5: Beispiel Duktales Carcinoma in situ (DCIS)

Ausschnitt eines positiv gefärbten Carcinoma in situ im Tumorschnitt. Anteil positiv gefärbter Tumorzellen $\geq 80\%$ (4) Färbeintensität stark (3) = IRS von 12; (x100-fache Vergrößerung)

3. Material und Methoden



*Abbildung 6: Beispiel Positiv-Kontrolle.
Positivkontrolle mit MCF7-Brustkrebs-Zelllinie (x200-fache Vergrößerung).*

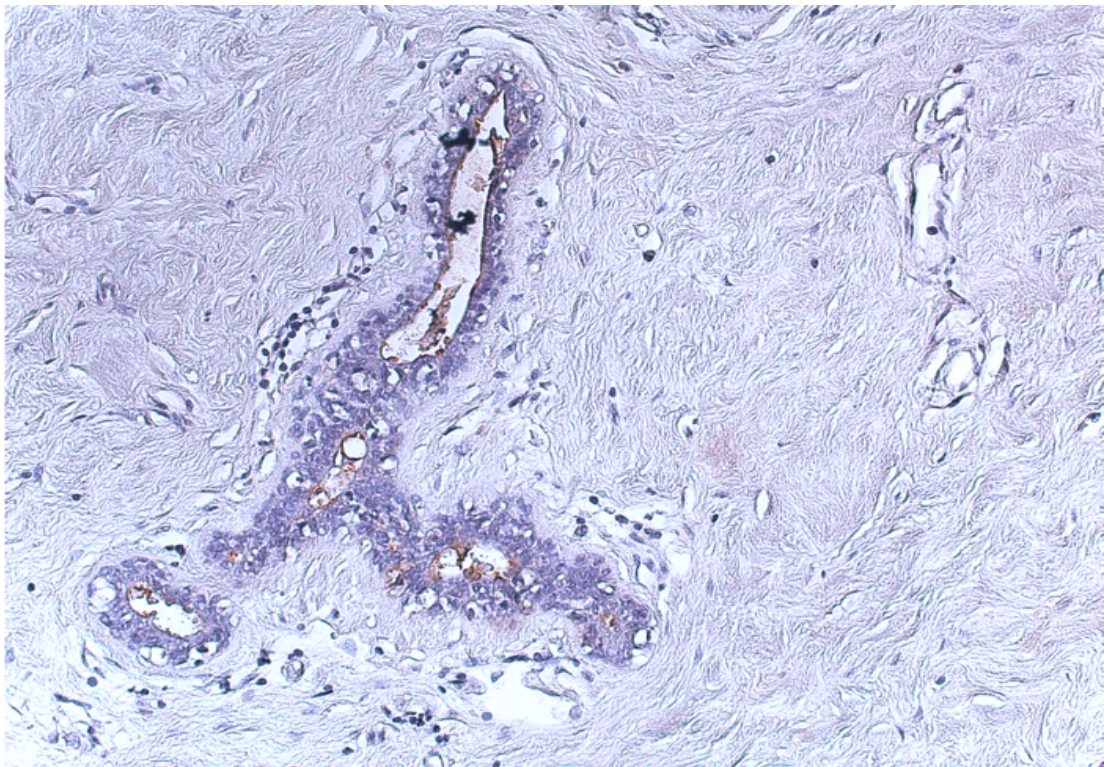


Abbildung 7: Beispiel Immunhistochemische-Negativkontrolle.

3. Material und Methoden

Negativkontrolle mit gesundem Brustdrüsengewebe. Eine spezifische Zellfärbung von gesunden Brustdrüsenzellen mit GGSK1/30 ist nicht erkennbar. Es zeigt sich eine unspezifische Färbereaktion mit Sekret im Lumen der Ausführungsgänge.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit IBM®-SPSS®-Statistics, Version 23.0, durchgeführt. Im ersten Teil erfolgte eine deskriptive Analyse der im Rahmen des Follow-Up erhobenen klinischen und pathologischen Daten. Für kategoriale Variablen wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten, für stetige Variablen der Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung und 95%-Konfidenzintervall angegeben. P-Werte kleiner als 0,05 werden als statistisch signifikant angegeben. Im Rahmen eines explorativen Studiendesigns erfolgte die Interpretation der p-Werte jedoch vor dem Hintergrund einer statistischen Auffälligkeit. Für das Gesamtüberleben⁶, das metastasenfrem Überleben⁷ (MFS) und das krankheitsfreie Überleben⁸ (DFS) lag der Kaplan-Meier-Schätzer in der gesamten Beobachtungszeit über 50%. In diesem Fall war die mediane Überlebenszeit nicht zu bestimmen. Die 5- und 10-Jahres-Überlebensraten wurden anhand von Überlebenstabellen ermittelt.

Mittels nichtparametrischer statistischer Tests (Mann-Whitney-U- oder Kruskal-Wallis-Test⁹) wurde im zweiten Teil die Verteilung der TA-MUC1-Expression über die kategorialen Follow-Up-Variablen untersucht. Die Ergebnisse wurden in Boxplot-Diagrammen dargestellt. Bei Variablen mit mehr als zwei Ausprägungen erfolgte ein paarweiser Vergleich, bei dem die nicht-adjustierten p-Werte angegeben wurden. Anhand von Kreuztabellen wurde die Verteilung der TA-MUC1-Expression anhand von Median-Gruppen dargestellt. Zur Untersuchung der Verteilung wurden hierfür Hypothesentests (Chi-Quadrat- und Likelihood-Quotienten-Test¹⁰) durchgeführt. Als statistisches Zusammenhangsmaß wurde der jeweilige Phi-Koeffizient¹¹ oder Cramérs-V angegeben. Zur weiteren Spezifizierung der signifikanten Zusammenhänge erfolgte

⁶ Zeit von Erstdiagnose (ED) bis Zeitpunkt des Todes - oder Ende des Beobachtungszeitraums.

⁷ Zeit von ED bis zum Auftreten einer Fernmetastase - oder Ende des Beobachtungszeitraums

⁸ Zeit von ED bis zum Auftreten einer Fernmetastase u./o. Rezidiv - oder Ende des Beobachtungszeitraums

⁹ Kruskal-Wallis-Test bei mehr als zwei Merkmalsausprägungen der untersuchten Variablen.

¹⁰ Likelihood-Quotienten-Test bei Werten < 5 in über 20% der Zellen.

¹¹ Phi-Koeffizient bei 2x2-Kreuztabellen.

ein auf den standardisierten Residuen basierender post-hoc-Chi²-Test mit Bonferroni-Korrektur der p-Werte (161). Durch die selektive Korrektur wurde hierbei lediglich zum lokalen Signifikanzniveau α getestet, das globale Signifikanzniveau wurde nicht gehalten.

Im letzten Teil wurden anhand des Kaplan-Meier-Schätzers Ereigniszeitanalysen für das Gesamtüberleben, das MFS und das DFS durchgeführt. Die Überlebenszeiten wurden hierbei mittels Log-Rank-Test verglichen. Zensierte Patienten¹² wurden in die Analysen eingeschlossen. In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurde im Falle einer gleichmäßigen Überlegenheit in den Überlebenszeitkurven¹³ im Anschluss der Einfluss kategorialer Variablen auf das Gesamtüberleben, das MFS und das DFS überprüft. Die Entscheidung zum Einschluss der jeweiligen Variablen basierte auf den Ergebnissen univariater Analysen sowie logischer klinischer Überlegungen. Als Methode wurde eine Rückwärts-Selektion mit Modellprüfung mittels Likelihood-Ratio-Statistik gewählt (Rückwärts LR). Für alle Ereigniszeitanalysen erfolgte vorab ein Ausschluss der Fälle ohne Follow-Up-Informationen (*lost-to-Followup*).

¹² Patienten ohne Eintreten eines Ereignisses während des gesamten Beobachtungszeitraums

¹³ Entspricht einem proportionalen Hazard

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Patientenbezogene Daten:

Im Rahmen des Follow-Up wurden die klinischen und tumorbezogenen Daten für das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv erhoben (Tabelle 10). In sieben Fällen konnten neben den Informationen aus Pathologie- und Tumorboard-Berichten bei Erstdiagnose keine zusätzlichen Daten im weiteren Krankheitsverlauf generiert werden (*lost-to-Follow-Up*). Die Follow-Up-Rate betrug 97,1% (234/241). Der mittlere Follow-Up-Zeitraum lag bei 5,9 Jahren (SD \pm 2,3 Jahre, 95% - KI_M: 5,6–6,2). Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurden 35 Sterbefälle dokumentiert. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate betrug 92,3%. Die 10-Jahres-Überlebensrate lag bei 85%. Das mittlere Patientenalter bei Erstdiagnose betrug 60,3 Jahre (SD_M: \pm 12,7 Jahre, 95%-KI_M 58,7-61,9).

Tabelle 10: Follow-Up: Patientenbezogen-Daten

*ED: Erstdiagnose; OS: overall survival. MFS: metastasis free survival. DFS: disease free survival; *: nicht bestimmbar*

		Häufigkeit (n)	Anteil (%)
Patientenstatus	lebt	199	82,6
	verstorben	35	14,5
	lost-to-follow-Up	7	2,9
	Rate	<i>M</i> \pm SD (Jahre)	95 % - KI _M
Alter bei ED		60,3 (\pm 12,7)	58,7 – 61,9
Gesamtüberleben		* ¹⁴	
5-Jahres-OS	92,3%		
10-Jahres-OS	85,0%		
MFS		*	
5-Jahres-MFS	92,7%		
10-Jahres-MFS	90,2%		
DFS		*	

¹⁴ Mediane Überlebenszeit ist nicht zu bestimmen. Bis zur maximalen Beobachtungszeit ist für weniger als die Hälfte der Patientinnen ein Ereignis eingetreten (Kaplan-Meier-Schätzer > 50 %)

4. Ergebnisse

5-Jahres-DFS	88,8%	
10-Jahres-DFS	85,8%	
Follow-Up-Zeitraum (Jahre)	5,9 (\pm 2,3)	5,6 – 6,2
Follow-Up-Rate	97,1%	

Tumorbezogene-Daten:

Eine histopathologische Einteilung der Tumorschnitte erfolgte anhand der aktuellen AWMF S3-Leitlinie des Mammakarzinoms (162). 44,8% der untersuchten Tumoren wiesen ein pT1-Stadium auf, 46,5% waren als pT2 klassifiziert und in 7,9% zeigte sich ein bereits fortgeschrittenes pT3-Stadium. Ein Großteil der Patientinnen (64,7%) wies bei Diagnosestellung einen negativen Lymphknotenstatus auf. In 34,9% der Tumoren zeigte sich ein positiver Lymphknotenbefall, wobei in 17,4% der Fälle ein pN1- und in jeweils 6,6% ein pN2- bzw. pN3-Stadium vorlag. Die überwiegende Mehrheit der Tumoren wies ein höheres Tumorgrading auf (G2=46,5%; G3=37,3%); nur in 15,4% der Fälle lag ein besser differenziertes G1-Stadium vor. In 74,3% der Tumorschnitte ließen sich, neben Anteilen eines invasiven Karzinoms, zusätzliche Anteile eines duktales (DCIS) oder lobulären Carcinoma in situ (LCIS) nachweisen. Der Anteil des *triple-negativen* Mammakarzinom-Subtyps (TNBC) am Gesamtkollektiv lag bei 17%. Alle weiteren histopathologischen Tumordaten sind im Folgenden dargestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Follow-Up: Tumorbezogene-Daten

NST: Invasives Karzinom ohne speziellen Typ; CIS: Carcinoma in Situ; ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; (): prozentualer Anteil nicht bestimmbar.*

		n	%
Histologie	NST	189	78,4
	lobulär	31	12,9
	gemischt	12	5,0
	muzinös	6	2,5
	tubulär	2	0,8
	kribiform	1	0,4
Lokalisation	unifokal	199	82,6
	multifokal	42	17,4
Grading	G1	37	15,4
	G2	112	46,5
	G3	90	37,3

4. Ergebnisse

	Gx	2	0,8
pT	pT1	108	44,8
	pT2	112	46,5
	pT3	19	7,9
	pTx	2	0,8
pN	pN0	156	64,7
	pN1	52	21,6
	pN2	16	6,6
	pN3	16	6,6
	pNx	1	0,4
M	M0	234	97,1
	Mx	7	2,9
Weitere Klassifikation	L1	63	26,1
	V1	12	5,0
	Pn1	12	5,0
Residual	R0	225	93,4
	R1	16	6,6 %
CIS		179	74,3 %
ER-positiv		183	75,9 %
PR-positiv		164	68,0 %
HER2-positiv		26	10,8 %
TNBC		42	17,4 %
Intrinsische Subtypen	Luminal A	46	(*) ¹⁵
	Luminal B	25	
Weitere Risikogruppen	Risiko 1 ¹⁶	173	71,8 %
	Risiko 2 ¹⁷	12	5,0 %
	Risiko 3 ¹⁸	14	5,8 %

Klinische-Daten:

Alle im Kollektiv untersuchten Brustkrebspatientinnen wurden im Rahmen einer Erstdiagnose eines Mammakarzinoms an der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der Universitätsmedizin Mainz operiert. Im weiteren Verlauf wurden 25 Lokalrezidive (10,4%) und 23 Fernmetastasen (9,5%) dokumentiert.

¹⁵ Luminal A und B wurde nur für die Patienten bestimmt, bei denen ein Ki-67-Wert zu bestimmen war (n=96)

¹⁶ Hormonrezeptor positiv (ER und/ oder PR) und Her2-negativ

¹⁷ Hormonrezeptor positiv (ER und/ oder PR) und Her2-positiv

¹⁸ Hormonrezeptor negativ und Her2-positiv

4. Ergebnisse

Tabelle 12: Follow-Up: Daten zum klinischen Verlauf

Therapie		Anzahl (n)	Anteil (%)
Fernmetastasen		23	9,5
Rezidiv	<u>Gesamt</u>	<u>25</u>	10,4
	Lokalrezidiv 1	16	
	Lokalrezidiv 2	4	
	Lymphknoten-Rezidiv	5	
Nachresektion		42	17,4

Überleben und Prognose:

Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurden 35 Todesfälle dokumentiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 92,3%. Die 10-Jahres-Überlebensrate betrug 85%. Bei einem Vergleich der Überlebenszeitkurven verschiedener Merkmalsgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede in Bezug auf das Alter bei Erstdiagnose (≤ 55 J vs. >55 J), das T-Stadium (T1 vs. T2/ T3), den Lymphknotenstatus (N0 vs. N1-N3) und das krankheitsfreie Überleben (Event; nein vs. ja) (Tabelle 13)

Tabelle 13: Follow-Up: Überleben- und Prognose-Daten

Variable	n	Überleben		p-Wert (Log Rank)
		5 Jahre	10 Jahre	
Gesamtkollektiv	234	92,3	89,3	
Alter				0,004
≤ 55	90	95,6	—	
>55	144	90,3	79,9	
Histologie				ns
kein NST	51	90,2	—	
NST	183	92,8	85,2	
T-Status				0,001
T1	103	96,1	94,2	
T2 + T3	129	89,1	—	
N-Status				0,001
N0	150	95,3	90,7	
N1-N3	83	86,7	—	
Grading				0,051
G1 + G2	144	95,1	—	
G3	88	87,5	79,5	

4. Ergebnisse

Event ¹⁹				< 0,001
nein	201	95,5	91,0	
ja	33	72,7	—	

4.2 TA-MUC1-Expression im Mammakarzinom

TA-MUC1-Expression im Tumor und im gesunden Brustdrüsengewebe

Von den 241 untersuchten Mammakarzinom-Schnitten des Gesamtkollektivs ließen sich in vier Fällen keine invasiven Tumorzellen und lediglich Anteile nicht-invasiver Karzinomvorstufen (DCIS o. LIN) nachweisen. In 92,4% (n=219/237) der invasiven Mammakarzinome konnte eine eindeutig positive TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden (IRS>2). In den übrigen, als negativ bewerteten Tumorschnitten (n=18; 7,6%) war eine schwache Färbeintensität (IRS 1-2) bzw. keine sichtbare Färbereaktion im Tumorgewebe nachweisbar. Der Median der Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe lag bei einem IRS von 8. 43,5% der Tumoren wiesen eine TA-MUC1-Expression unterhalb (IRS 0-6) und 56,5% oberhalb des Medians (IRS 8-12) auf (*Abb. 8*).

Im Gewebe gesunder Brustdrüsenschnitte war keinerlei sichtbare TA-MUC1-Expression nachweisbar.

¹⁹ Fernmetastase und/ oder Rezidiv im Verlauf des Beobachtungszeitraums

4. Ergebnisse

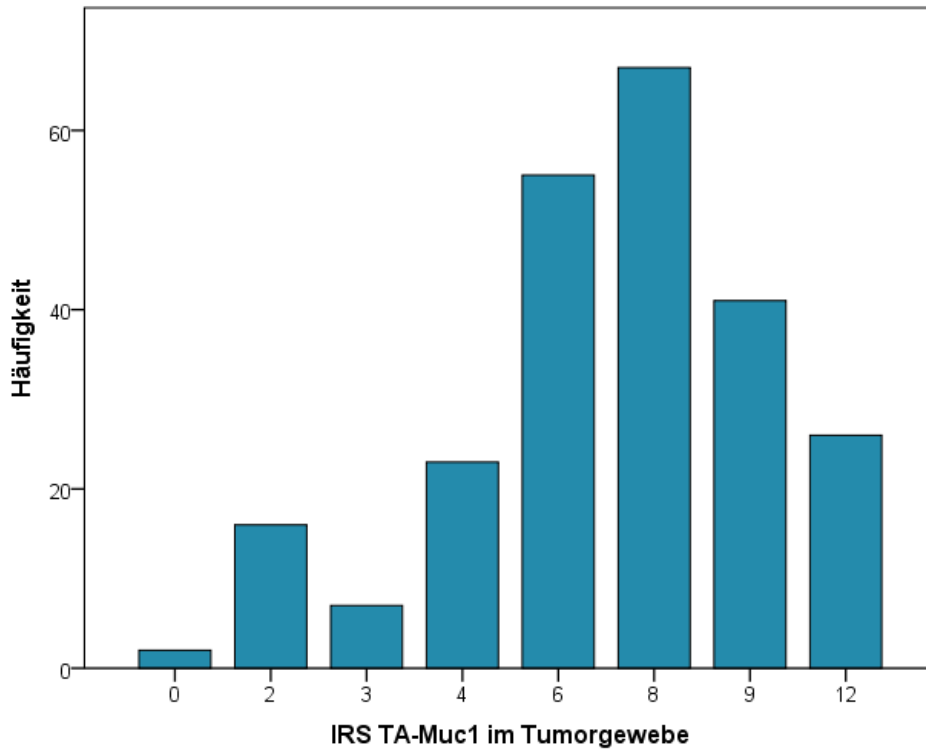


Abbildung 8: Verteilung der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe.

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe. Eine Bewertung der TA-MUC1-Expression erfolgte anhand des IRS (IRS 0 bis 12). Da auf Grund der Berechnung des IRS (Färbeintensität (0-3) multipliziert mit Anteil positiven Zellen (0-4)) Werte von 1, 5 oder 7 nicht möglich sind, sind diese in der Skalierung nicht dargestellt. Mit einem Median von 8 ließ sich in einer Mehrzahl der Tumorschnitte eine ausgeprägte, eindeutig positive TA-MUC1-Expression nachweisen. Weniger als 8% der Tumoren zeigten eine negative TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe (IRS 0-2).

Verteilung der subzellulären Lokalisation im Tumorgewebe

Neben der Gesamtexpression von TA-MUC1 wurde zudem das subzelluläre Verteilungsmuster im Tumorgewebe beurteilt. Hierbei erfolgte eine Unterteilung in vier subzelluläre Expressionsmuster: rein membranständig (*m*), rein zytoplasmatisch (*c*), gemischt, mit überwiegend zytoplasmatischen-Anteilen (*cm*) und gemischt, mit überwiegend membranständigen Anteilen (*mc*).

Am häufigsten zeigte sich eine gemischte, überwiegend zytoplasmatische TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe (*cm*=73,8%). Weniger häufig ließ sich ein membranständig-betontes Expressionsmuster nachweisen (*mc*=13,5%). Nur in 11,8% der Fälle wurde TA-

4. Ergebnisse

MUC1 rein zytoplasmatisch exprimiert. Eine rein membranständige Expression *m*, ohne zytoplasmatische Anteile (*m*), war in keinem der Tumorschnitte nachweisbar (Abbildung 9).

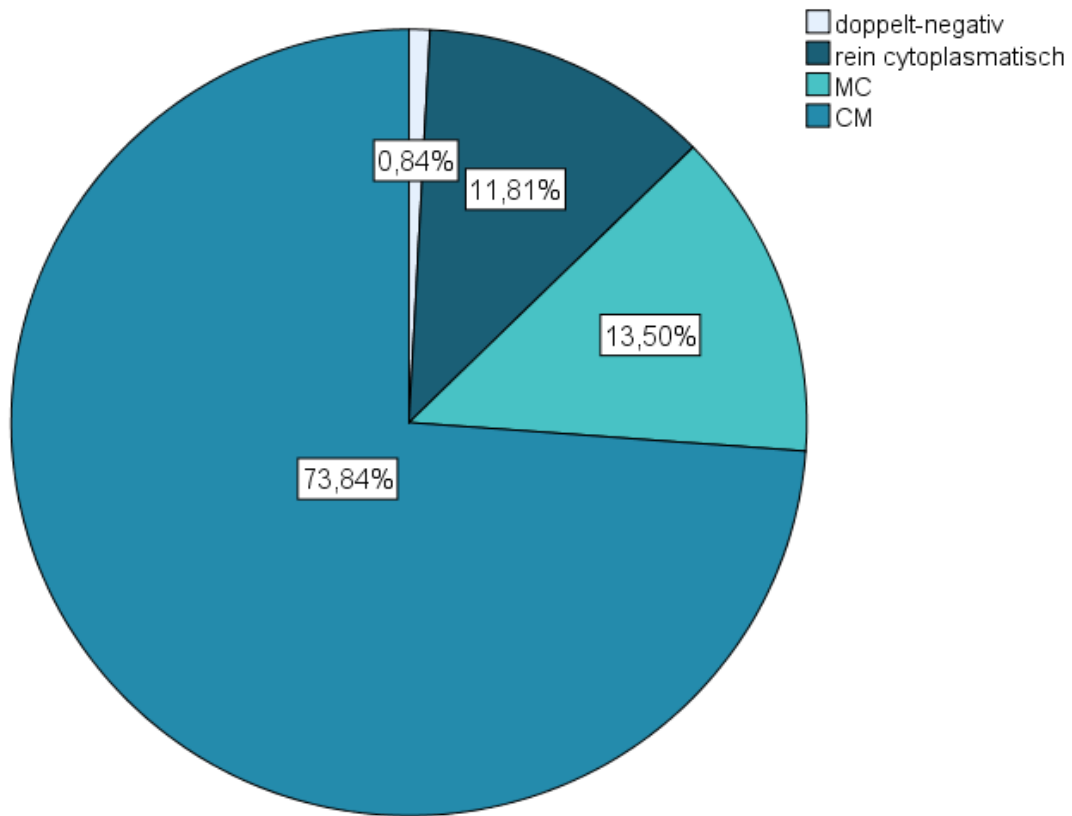


Abbildung 9: Verteilung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 im Tumorgewebe.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der subzellulären Expressionsmuster von TA-MUC1 im Gesamtkollektiv ($n=237$). In einer Mehrzahl der Tumorschnitte zeigte sich eine gemischte, zytoplasmatisch-betonte TA-MUC1-Expression (*cm*). In den übrigen Tumoren war TA-MUC1 etwa zu gleichen Anteilen gemischt, überwiegend membranständig (*mc*) oder rein zytoplasmatisch exprimiert (*c*). In zwei Tumorschnitten war keine sichtbare TA-MUC1-Expression nachweisbar (*doppelt-negativ*)

TA-MUC1-Expression im duktalem Carcinoma in situ

In 88 Tumorproben konnten, neben invasiven Tumorzellen, auch Anteile nicht-invasiver Karzinomvorstufen im Sinne eines duktalem Carcinoma in situ (DCIS) nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

In 92% der untersuchten DCIS zeigte sich eine eindeutig positive TA-MUC1-Expression (IRS >2). Der Median der Gesamtexpression lag bei einem IRS von 6. Etwa 57% wiesen eine TA-MUC1-Expression unterhalb des Medians auf (IRS ≤4). Rund 43% zeigten eine Expression oberhalb des Medians (IRS 6-12) (Abb. 10). In Bezug auf die subzelluläre Lokalisation ließ sich in mehr als 80% der DCIS ein gemischtes, überwiegend zytoplasmatisches Expressionsmuster nachweisen (cm). Rund 6% zeigten eine überwiegend membranständige Expression (mc) und in etwa 14% wurde TA-MUC1 rein zytoplasmatisch exprimiert (c) (Abb. 11).

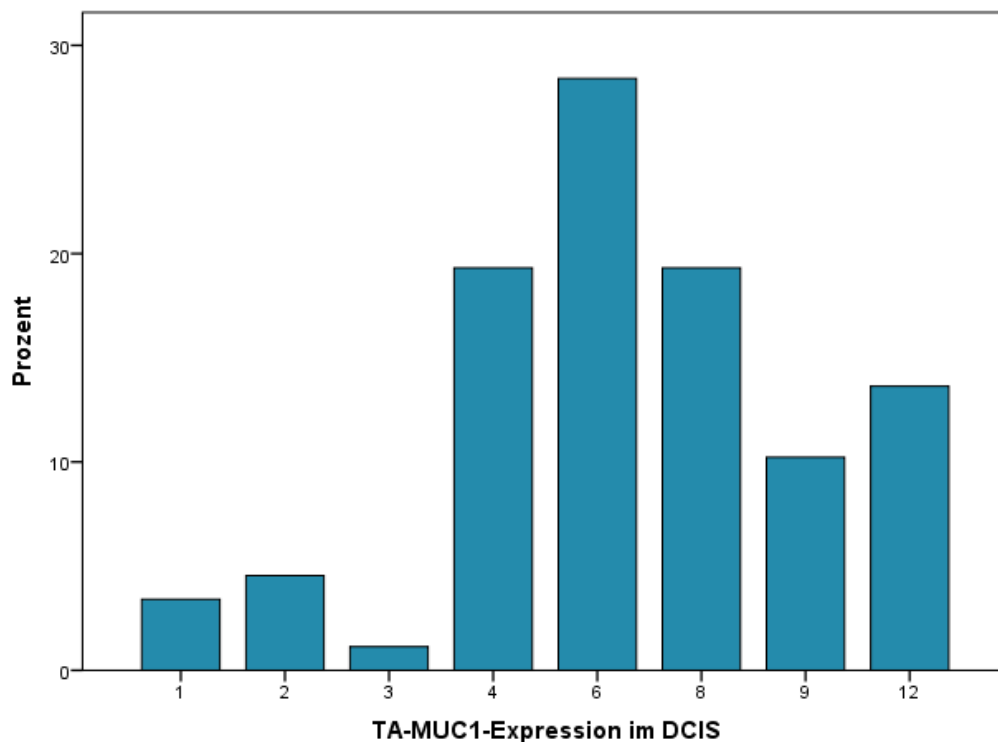


Abbildung 10: Verteilung der TA-MUC1-Expression im DCIS.

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der Gesamtexpression von TA-MUC1 im DCIS anhand des IRS. Bei einem Median von 6 ließ sich in einer Mehrzahl der DCIS eine eindeutig ausgeprägte TA-MUC1-Expression nachweisen. Nur 8% der DCIS zeigten eine negative TA-MUC1-Expression (IRS 1-2).

4. Ergebnisse

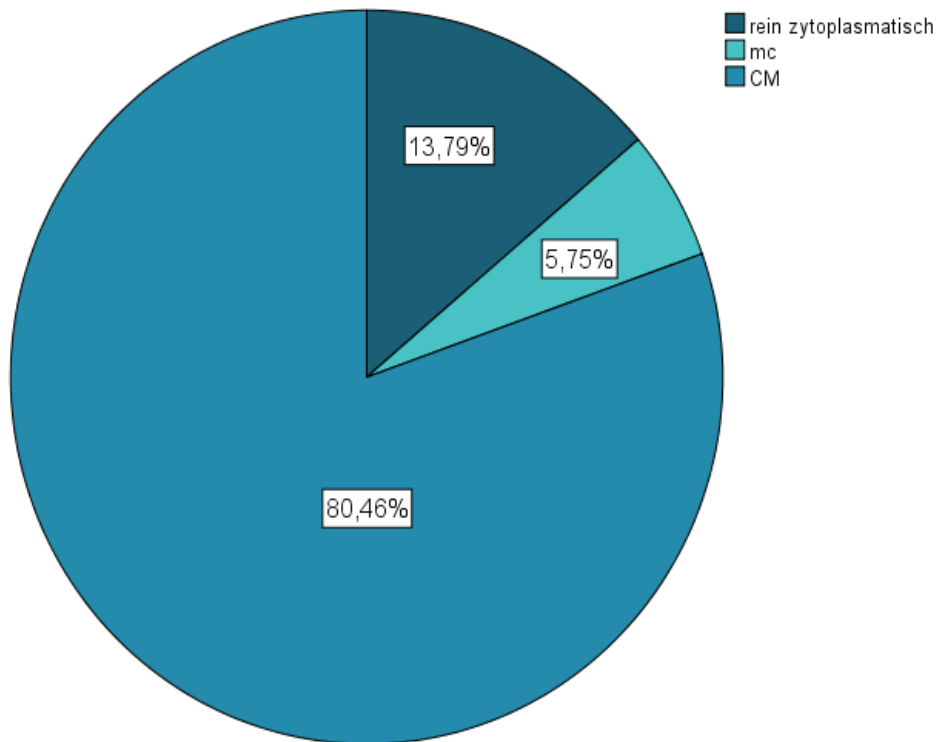


Abbildung 11: Verteilung des subzellulären-Expressionsmusters von TA-MUC1 im DCIS.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der subzellulären Expressionsmuster von TA-MUC1 im DCIS. In einer überwiegenden Mehrzahl der Tumorschnitte zeigte sich eine gemischte, zytoplasmatisch-betonte TA-MUC1-Expression (cm). Weit weniger häufig wurde TA-MUC1 rein zytoplasmatisch im DCIS exprimiert (c) und nur selten ließ sich eine überwiegend membranständige Lokalisation nachweisen (mc).

4. Ergebnisse

4.3 Korrelation zwischen der Gesamtexpression von TA-MUC1 und histopathologischen Tumormerkmalen

Anhand von Korrelationsanalysen wurden die Zusammenhänge zwischen der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe und histopathologischen Tumormerkmalen untersucht. Hierbei wurde zunächst die Verteilung der mittels GGSK-1/30 ermittelten Färbeintensität (resp. IRS) zwischen den verschiedenen Merkmalsgruppen verglichen. Zudem wurde das Kollektiv anhand des Medians in zwei Vergleichsgruppen unterteilt und die Verteilung der Merkmalsausprägungen innerhalb der beiden Gruppen gegenübergestellt. Anhand der Ergebnisse ließen sich Rückschlüsse zum Verhalten von TA-MUC1 im Mammakarzinom in Abhängigkeit von histopathologischen Tumormerkmalen herstellen.

TA-MUC1-Expression in Bezug auf den histologischen Subtyp

In den Analysen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe und der Tumorhistologie (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$).

Die niedrigste Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe wiesen muzinöse Karzinome auf. Invasiv-lobuläre-Karzinome zeigten die höchste Gesamtexpression. Im paarweise-Vergleich mit NST-Karzinomen ließ sich eine signifikant höhere TA-MUC1-Expression für Tumoren vom invasiv-lobulären Typ nachweisen ($p = 0,045$). Zudem zeigte sich auch beim Vergleich von invasiv-lobulären Karzinomen mit Tumoren vom muzinösen Typ ein signifikanter Unterschied mit stärkerer TA-MUC1-Expression in lobulären Karzinomen ($p < 0,001$). Muzinöse Karzinome hingegen wiesen eine signifikant niedrigere Gesamtexpression als NST-Karzinomen auf ($p = 0,002$) (*Abb. 12*).

Im zweiten Schritt wurde die Verteilung der Median-Gruppen innerhalb der histologischen Subtypen betrachtet. Mittels Hypothesentests ließen sich dabei ebenfalls signifikante Zusammenhänge zwischen der TA-MUC1-Expression und der Tumorhistologie nachweisen (Chi²-Test: $p = 0,004$; ϕ_c : 0,235). Im Post-hoc-Test war der signifikante Unterschied in der Gruppe der muzinösen Karzinome nachweisbar. Innerhalb dieser Gruppe zeigte sich weniger häufig als erwartet eine TA-MUC1-Expression oberhalb und häufiger als erwartet eine Gesamtexpression unterhalb des Medians (post-hoc-Chi²: $p = 0,047$).

Weiterhin ließ sich in der Verteilung der Median-Gruppen erkennen, dass TA-MUC1 innerhalb der Gruppe der lobulären Karzinome häufiger oberhalb des Medians exprimiert wurde als innerhalb der Vergleichsgruppen (*Abb. 13*).

4. Ergebnisse

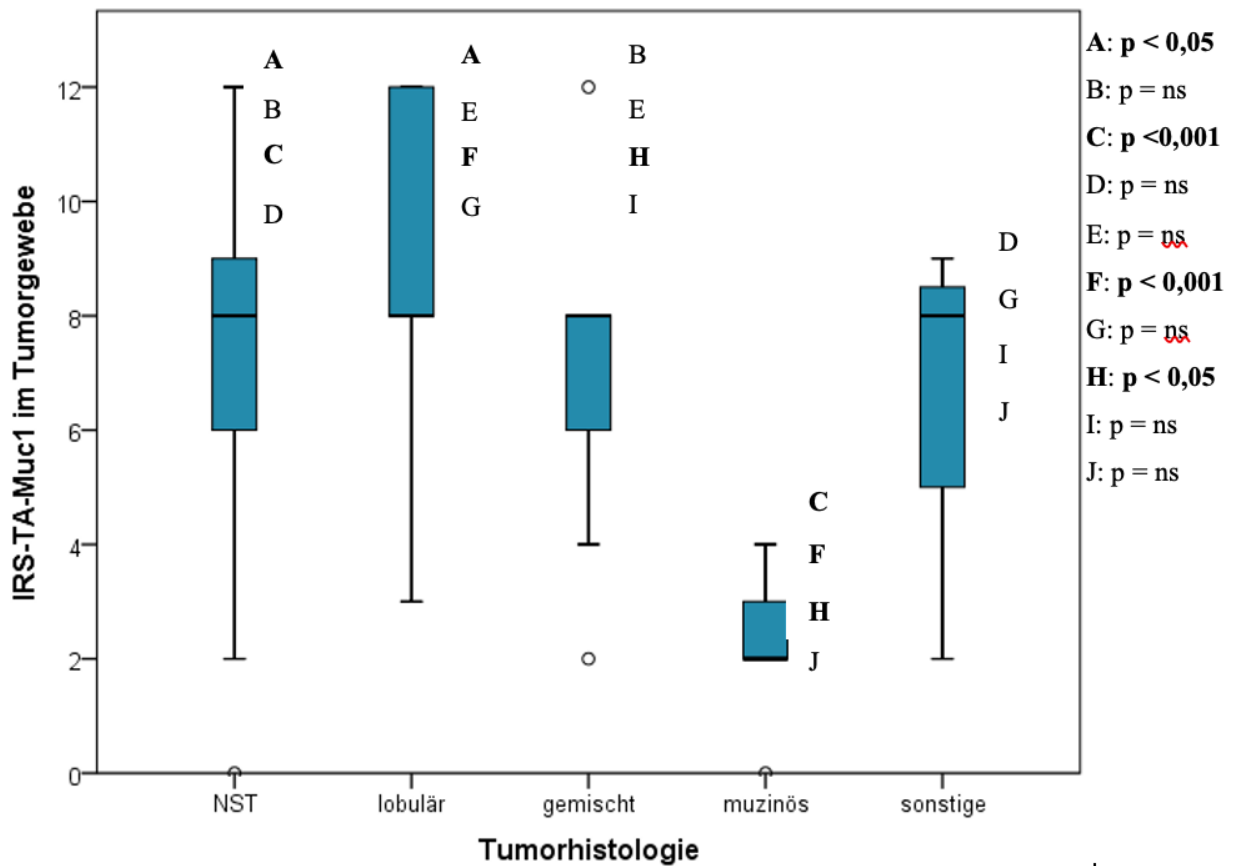


Abbildung 12: Verteilung der TA-MUC1-Expression über die Tumorphistologie.

Box-Plot-Diagramm mit Median, 75%- und 25%-Perzentile, Minimum/ Maximum und Ausreißern.

Dargestellt ist die Verteilung der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe in Abhängigkeit der histologischen Subtypen. Muzinöse Tumoren zeigten die niedrigste, lobuläre Karzinome die höchste Gesamtexpression im Tumorgewebe. Zwischen den histologischen Subtypen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Verteilung der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe. Die Ergebnisse des paarweise-Vergleichs sind als adjustierte p-Werte angegeben (A-J).

4. Ergebnisse

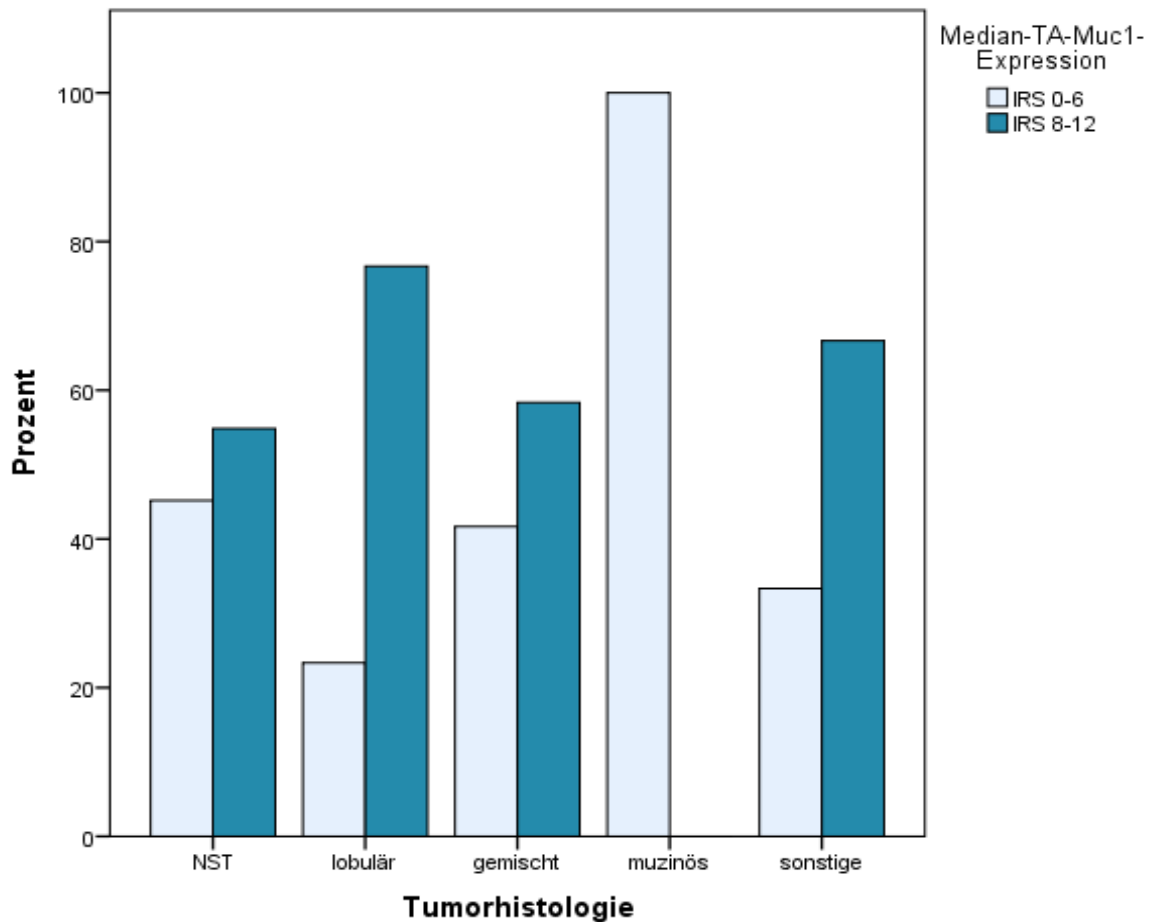


Abbildung 13: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Tumoren unterschiedlicher Histologie.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Median-Gruppen in Abhängigkeit der histologischen Subtypen. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Gesamtprozentsatz für jede Tumorhistologie-Gruppe (x-Achsen-Kategorie). Innerhalb der Gruppe von invasiv-lobulären Tumoren zeigte sich in ca. 80% der Fälle eine TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians. Muzinöse Tumoren hingegen wiesen in allen untersuchten Proben eine Gesamtexpression unterhalb des Medians auf.

TA-MUC1-Expression in Bezug auf das Tumor-Grading

In den Analysen ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe und dem Differenzierungsgrad (*Grading*) nachweisen ($p=0,001$). Tumoren im G2- und G3-Stadium wiesen die stärkste TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe auf.

Im Paarweise-Vergleich zeigten G1-Tumoren eine signifikant schwächere Gesamtexpression als Tumoren des G2-Stadiums ($p=0,002$). Auch im Vergleich von G3- mit G2-Tumoren zeigte

4. Ergebnisse

sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der TA-MUC1-Expression ($p=0,038$) (Abb.14). Mittels Chi-Quadrat-Tests ließen sich ebenfalls signifikante Unterschiede in der Verteilung der Mediengruppen-Zugehörigkeit in Abhängigkeit vom Grading-Stadium nachweisen (Chi²-Test: $p=0,002$; $\phi_c: 0,229$). Im Post-Hoc-Test war hierbei ein signifikanter Unterschied in der Gruppe der G2-Tumoren nachweisbar. Diese wiesen häufiger als erwartet eine TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians und weniger häufig als erwartet eine Expression unterhalb des Medians auf (post-hoc-Chi²=0,007). G1-Tumoren zeigten innerhalb ihrer Gruppe zudem prozentual häufiger eine Expression unterhalb des Medians als die Vergleichsgruppen (Abb. 15).

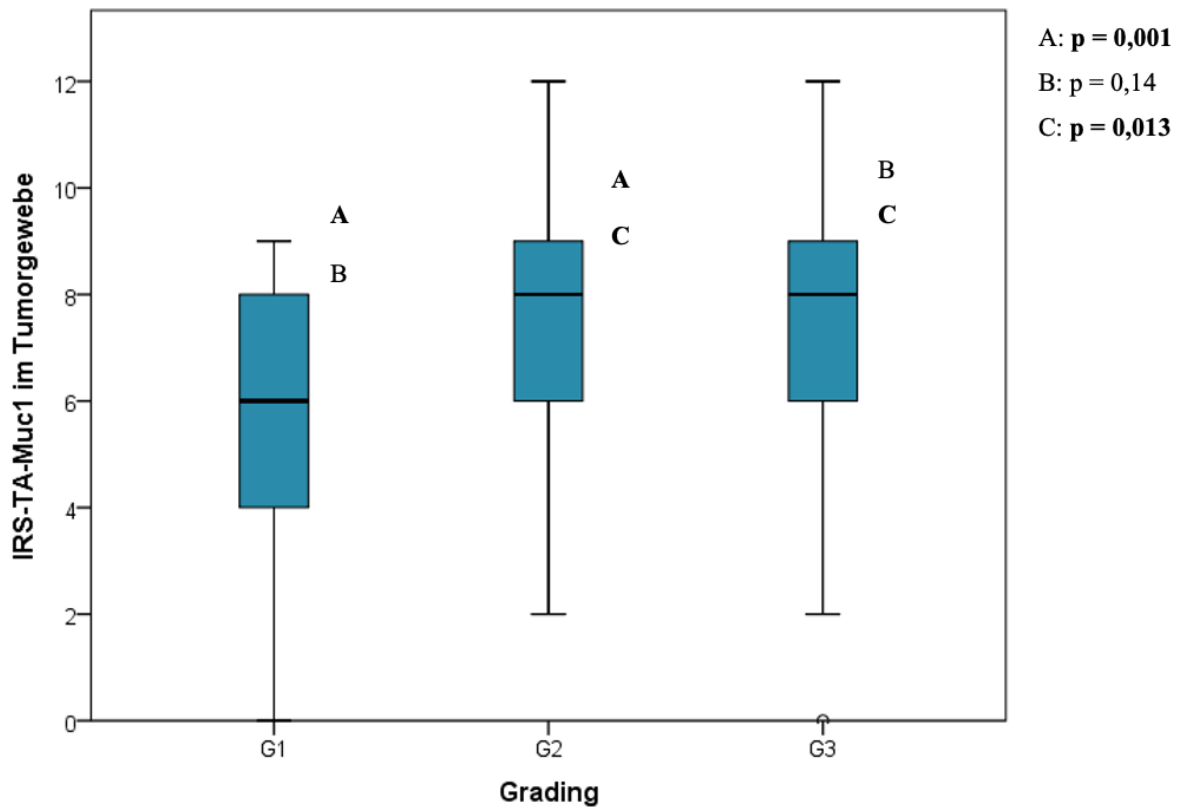


Abbildung 14: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit der Grading-Stadien. Box-Plot-Diagramm mit Median, 75%- und 25%-Perzentile sowie Minimum/ Maximum. Dargestellt ist die Verteilung der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe unterteilt nach Grading-Stadien. G1-Tumoren wiesen eine signifikant niedrigere TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe auf als Tumoren im G2-Stadium. Auch im Vergleich von G2- mit G3-Tumoren zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der IRS-Werte.

4. Ergebnisse

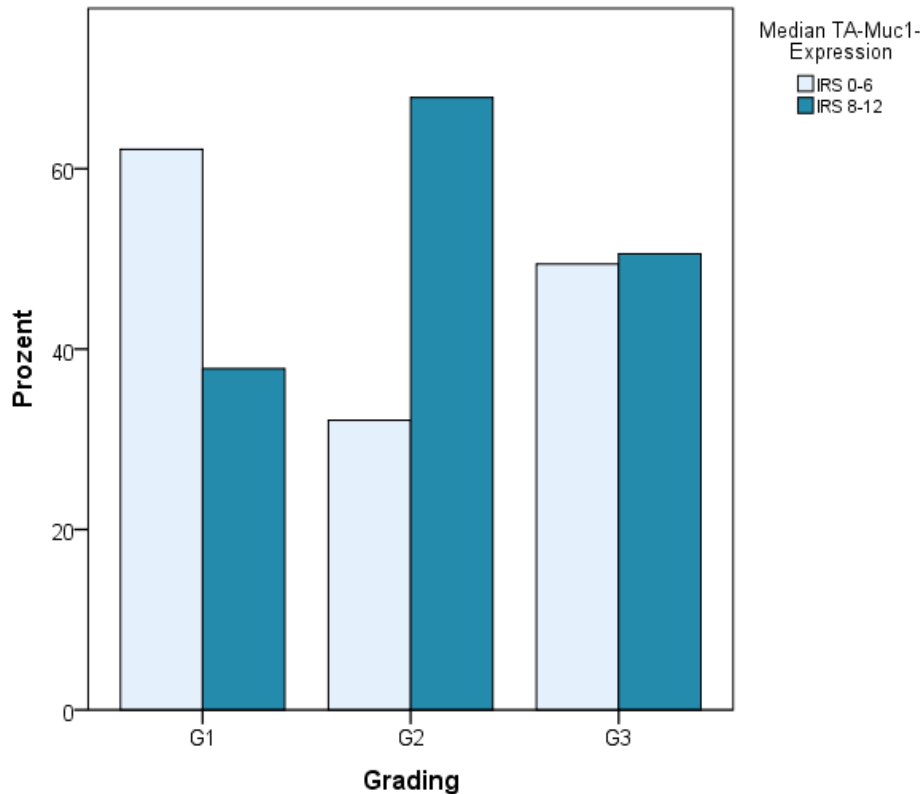


Abbildung 15: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Abhängigkeit der Grading-Stadien.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Mediengruppen innerhalb der jeweiligen Grading-Stadien. Über 60% der G1-Tumoren wiesen eine TA-MUC1-Expression unterhalb des Medians auf, wohingegen fast 70% der G2-Tumoren eine Expression oberhalb des Medians zeigten. In der Gruppe von G3-Tumoren wurde TA-MUC1 etwa gleich häufig unterhalb wie oberhalb des Medians exprimiert.

TA-MUC1-Expression in Bezug auf den Progesteronrezeptor-Status

In Progesteronrezeptor (PR)-positiven Tumoren wurde TA-MUC1 stärker exprimiert als im Tumorgewebe PR-negativer Tumoren (Abb. 16). In den Varianzanalysen zeigte hierbei eine statistisch nicht auffällige Korrelation (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,051$). Dennoch erfolgte eine genauere Betrachtung der Zusammenhänge mit nachfolgendem Chi-Quadrat-Test, in dem sich ein statistisch auffälliger Unterschied in der Verteilung des PR-Status in Abhängigkeit der Mediengruppen-Zugehörigkeit nachweisen ließ (Chi²-Test: $p=0,017$; ϕ_p : 0,155). (Abb. 17).

4. Ergebnisse

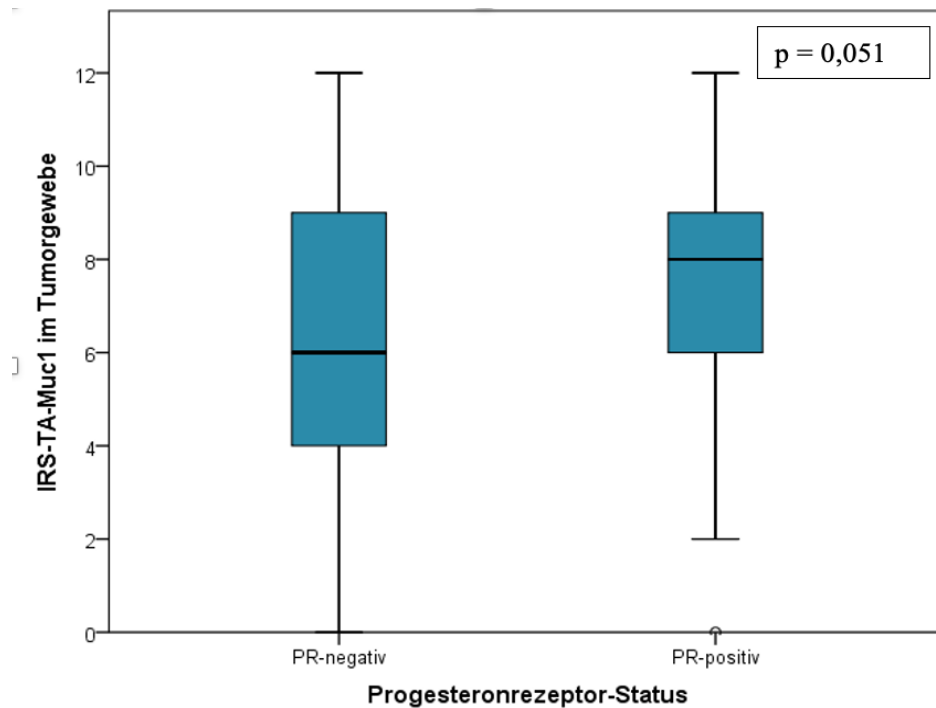


Abbildung 16: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit des Progesteronrezeptor-Status.

Box-Plot-Diagramm mit Median, 75%- und 25%-Perzentile und Minimum/ Maximum. PR-positive Tumoren wiesen eine höhere TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe auf als Tumoren mit negativen PR-Status. Bei einem Signifikanzwert von 0,051 war dieser Unterschied bei einem Signifikanzniveau von 0,05 statistisch nicht signifikant.

4. Ergebnisse

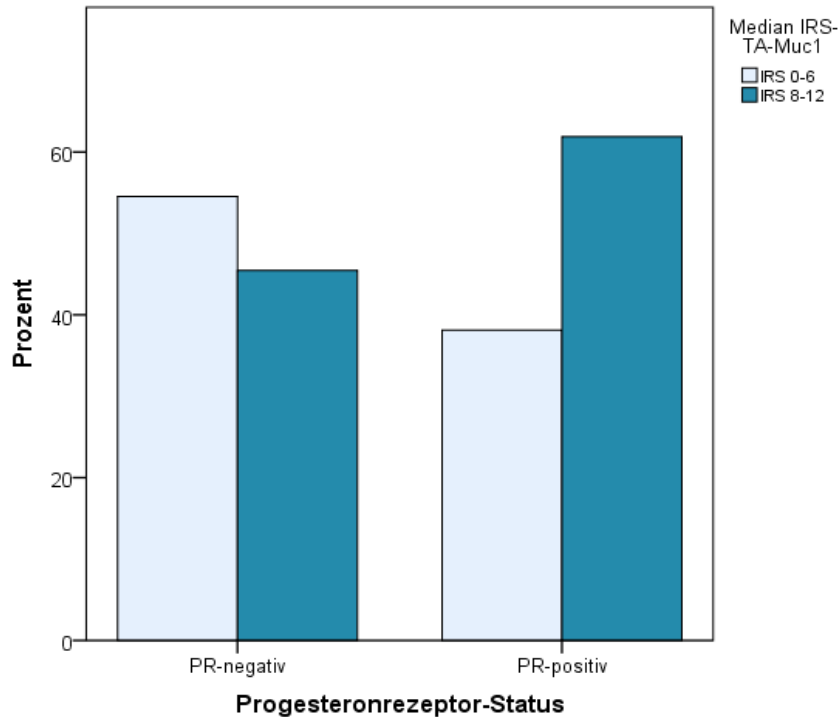


Abbildung 17: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Abhängigkeit vom Progesteronrezeptor-Status.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung innerhalb der beiden Gruppen (PR-neg. u. PR-pos.). PR-positive-Tumoren zeigten in über 60% der Fälle eine TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians. In der Gruppe der PR-negativen-Tumoren wurde TA-MUC1 häufiger unterhalb des Medians exprimiert.

4.4 Korrelation zwischen der subzellulären Expression von TA-MUC1 und histopathologischen Tumormerkmalen

Neben der Gesamtexpression wurde die Bedeutung des subzellulären Verteilungsmusters von TA-MUC1 im Tumorgewebe beurteilt. Zunächst wurde der Zusammenhang zwischen der Gesamtexpression und der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 betrachtet. Im Anschluss erfolgten Korrelationsanalysen mit histopathologischen Tumormerkmalen.

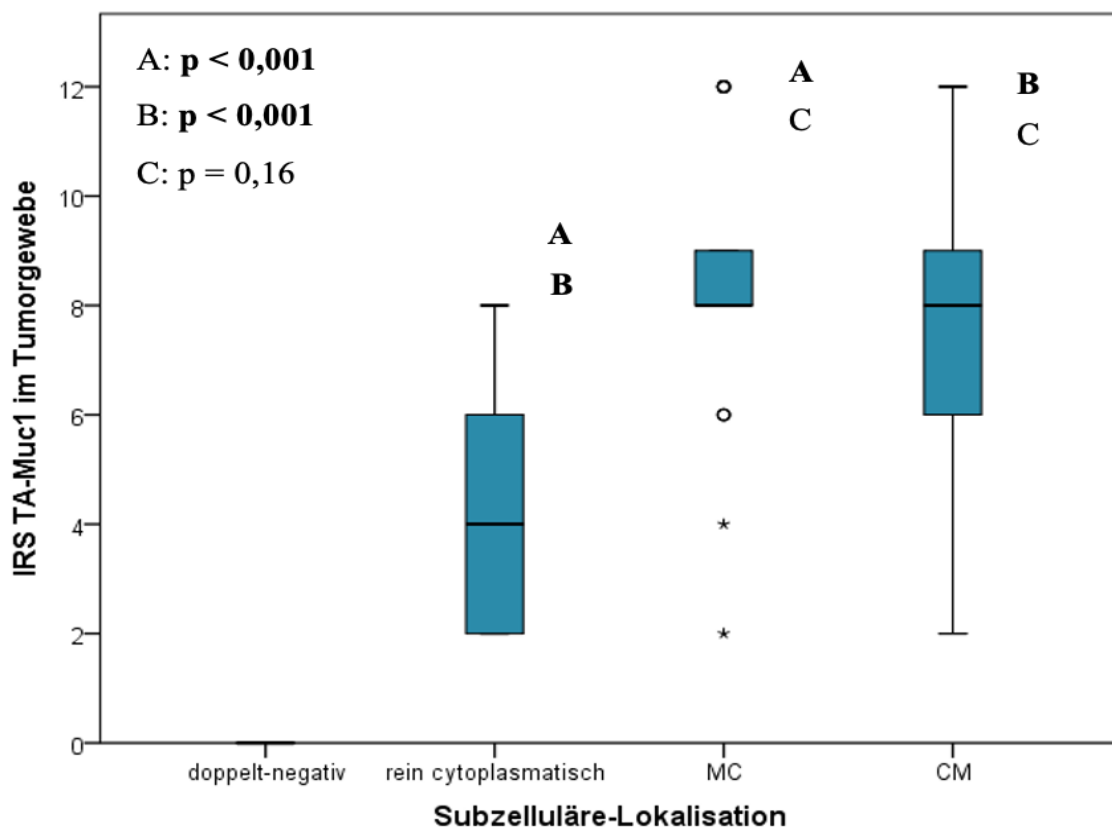
TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation

Tumoren mit einem zytoplasmatischen Expressionsmuster zeigten die niedrigste Gesamtexpression im Tumorgewebe.

4. Ergebnisse

In den Korrelationsanalysen ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem subzellulären Verteilungsmuster und der Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe nachweisen (Kruskal-Wallis: $p < 0,001$) (Abb. 18). Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster wiesen eine signifikant niedrigere Gesamtexpression von TA-MUC1 auf als MC- und CM-Tumoren ($p < 0,001$) (Abb. 18). Auch in einer Gegenüberstellung der subzellulären Gruppen zeigten sich in allen drei Vergleichen signifikante Unterschiede in der Verteilung der Gesamtexpression von TA-MUC1 (C vs. restliche: $p < 0,001$; mc vs. restliche: $p = 0,002$; CM vs. restliche: $p = 0,036$) (Abb. 19-21).

Zusätzlich ließen sich signifikante Unterschiede in der Verteilung der Mediangruppen-Zugehörigkeit in Abhängigkeit des subzellulären Verteilungsmusters nachweisen (Chi²-Test: $p < 0,001$; ϕ_p : 0,337). Im Post-Hoc-Chi²-Test zeigte sich dabei eine Signifikanz in der *cyt*- und *mc*-TA-MUC1-Gruppe. Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster wiesen häufiger als erwartet eine Expression unterhalb und weniger häufig als erwartet oberhalb des Medians auf (post-hoc-Chi² < 0,001). In der *mc*-Gruppe wurde TA-MUC1 häufiger als erwartet oberhalb und weniger häufig als erwartet unterhalb des Medians exprimiert (post-hoc-Chi² = 0,005) (Abb. 22).



4. Ergebnisse

Abbildung 18: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters.

Box-Plot-Diagramm mit Median, 75%- und 25%-Perzentile, Minimum/ Maximum und Ausreißern (°, °, *, *). Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster wiesen eine signifikant schwächere Gesamtexpression von TA-MUC1 auf als mc- und cm-TA-MUC1-Tumoren.

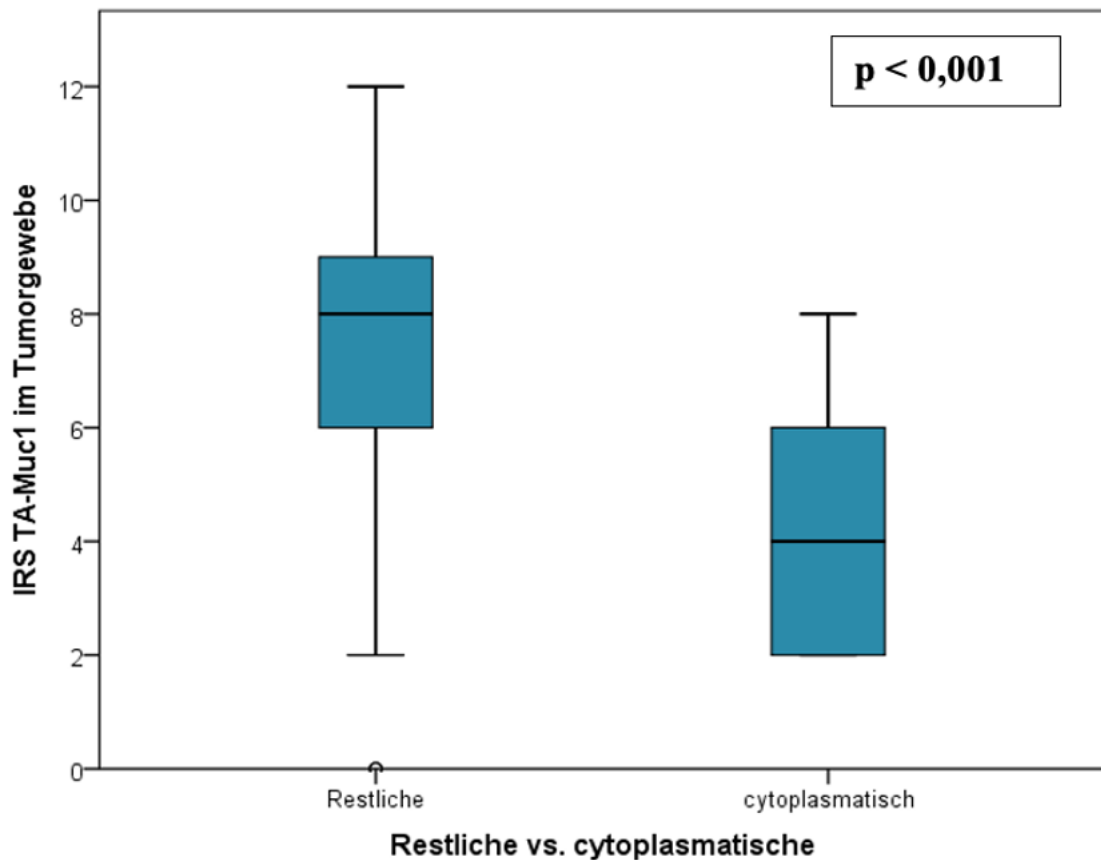


Abbildung 19: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster.

Box-Plot-Diagramm mit Median, 75%- und 25%-Perzentile, Minimum/ Maximum und Ausreißern (°).

TA-MUC1 wurde in Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster signifikant schwächer exprimiert als in Tumoren der Vergleichsgruppe ($p < 0,001$).

4. Ergebnisse

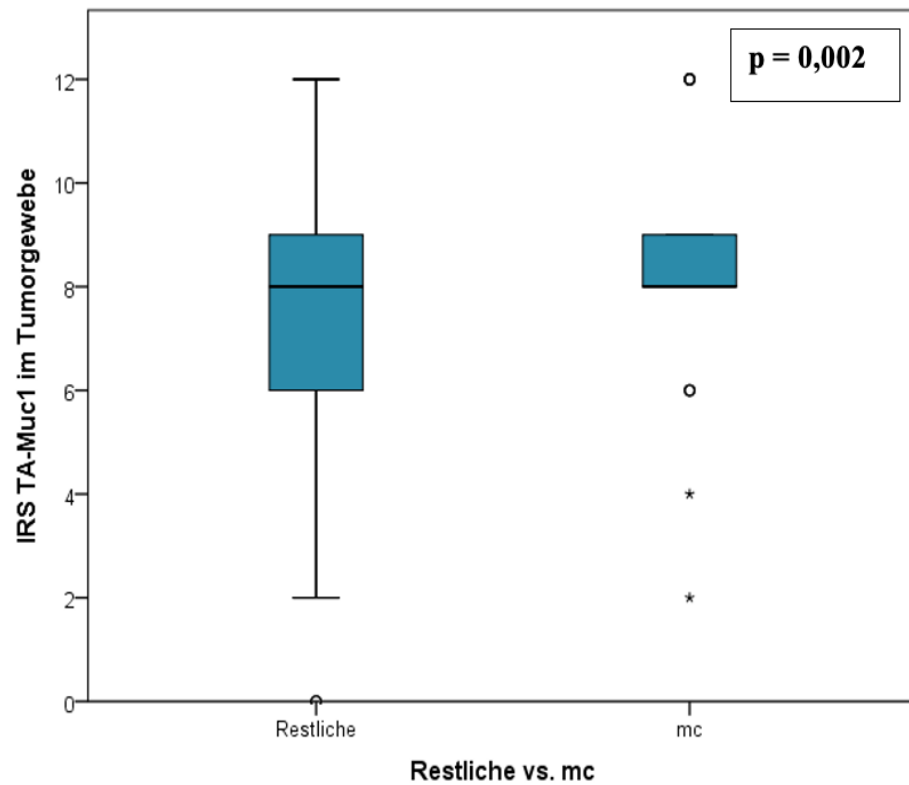


Abbildung 20: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Tumoren mit überwiegend membranständigem Expressionsmuster.

Box-Plot-Diagramm mit Median, 75%- und 25%-Perzentile, Minimum/ Maximum und Ausreißern (°, *).

4. Ergebnisse

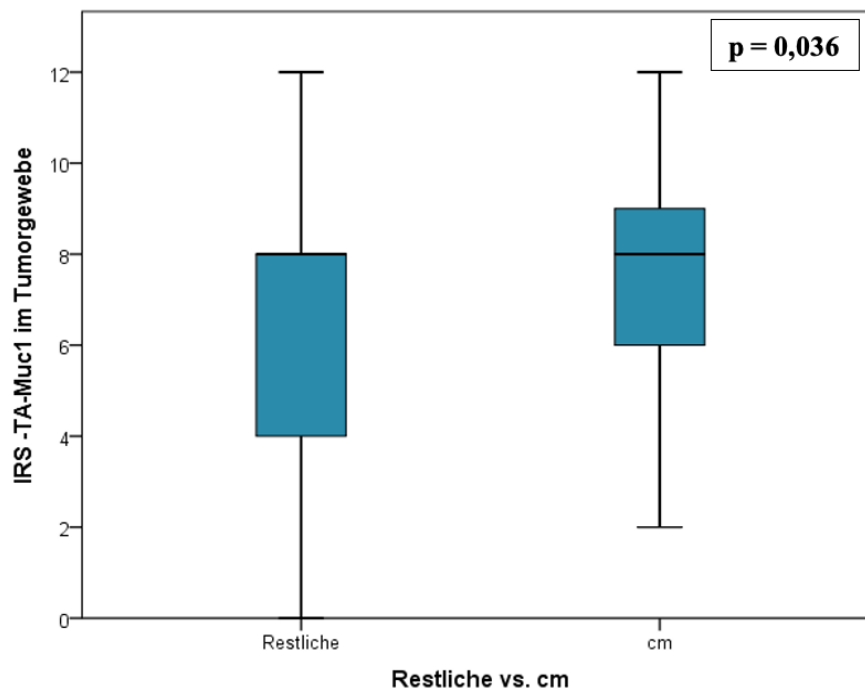


Abbildung 21: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Tumoren mit überwiegend zytoplasmatischem Expressionsmuster.

Box-Plot-Diagramm mit Median, 75%- und 25%-Perzentile und Minimum/ Maximum.

TA-MUC1 wurde in cm-Tumoren stärker exprimiert als in Tumoren mit anderem Expressionsmuster.

4. Ergebnisse

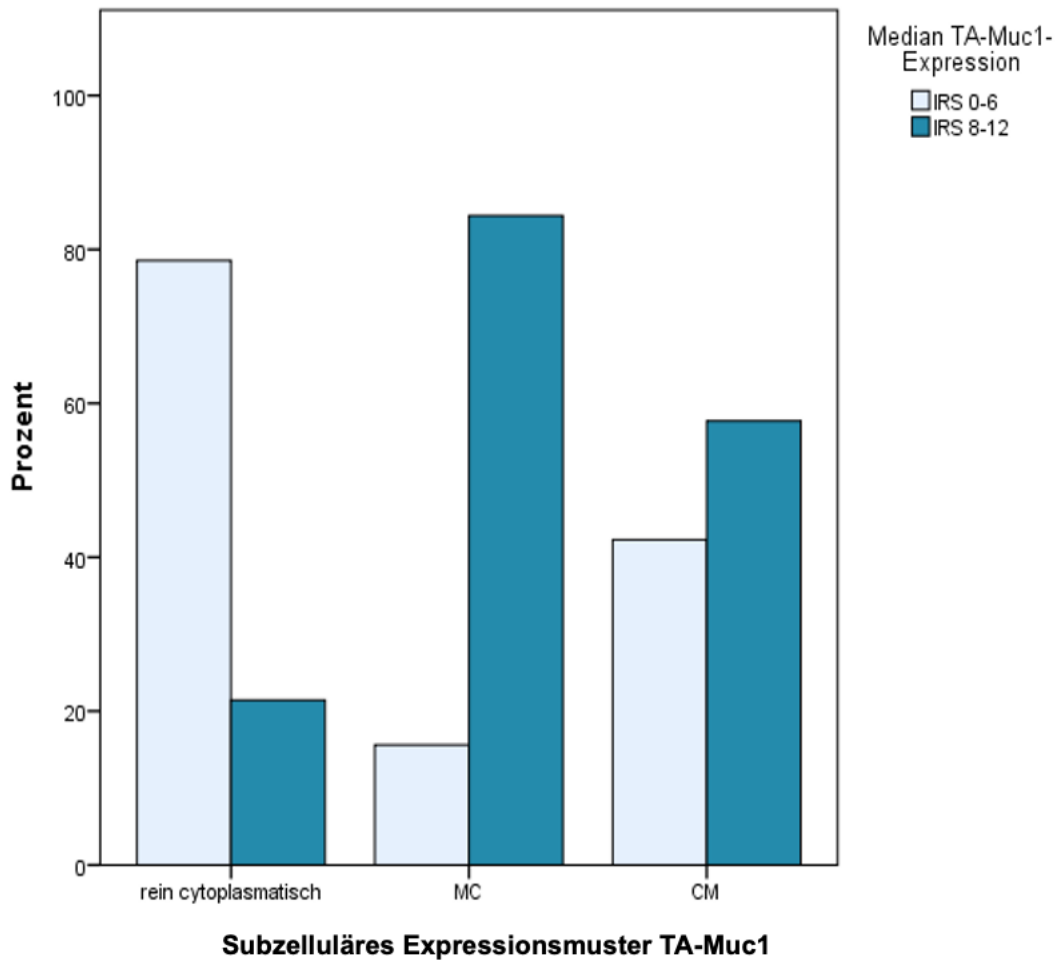


Abbildung 22: Verteilung der Median-Gruppen von TA-MUC1 in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung innerhalb der subzellulären Gruppen. Mc-TA-MUC1-Tumoren zeigten in über 80% der Fälle eine Gesamtexpression oberhalb des Medians. Tumoren mit rein zytoplasmatischer Lokalisation wiesen in rund 80% der Fälle eine TA-MUC1-Expression unterhalb des Medians auf.

Zusammenhang zwischen subzellulärer Lokalisation von TA-MUC1 und der Tumorhistologie

In den Analysen ließ sich ein signifikanter Unterschied im subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1 in Abhängigkeit der Tumorhistologie nachweisen (Chi²-Test: $p=0,006$; ϕ_v : 0,261). Im anschließenden Post-Hoc-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Gruppe der invasiven Karzinome ohne speziellen Typ (NST) und in der Gruppe der muzinösen Tumoren. NST-Tumoren wiesen häufiger als erwartet ein gemischtes, überwiegend zytoplasmatisches Expressionsmuster (*cm*) auf (post-hoc-Chi²=0,03). Tumore vom muzinösen Subtyp zeigten

4. Ergebnisse

hingegen weniger häufig als erwartet ein *cm*-Expressionsmuster (post-hoc- $\chi^2=0,02$) und häufiger als erwartet ein rein zytoplasmatisches Verteilungsmuster (post-hoc- $\chi^2<0,001$) (Abb. 23).

Nach Unterscheidung der Tumoren in NST- und nicht-NST-Karzinome zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der subzellulären Expressionsmuster (Chi²-Test: $p=0,025$; $\phi_v: 0,208$). NST-Tumoren wiesen häufiger als erwartet ein *cm*-Verteilungsmuster auf (post-hoc- $\chi^2: p=0,008$). In Tumoren der Vergleichsgruppe (nicht-NST) hingegen ließen sich häufiger ein zytoplasmatisches oder überwiegend membranständiges Expressionsmuster nachweisen (Abb. 24).

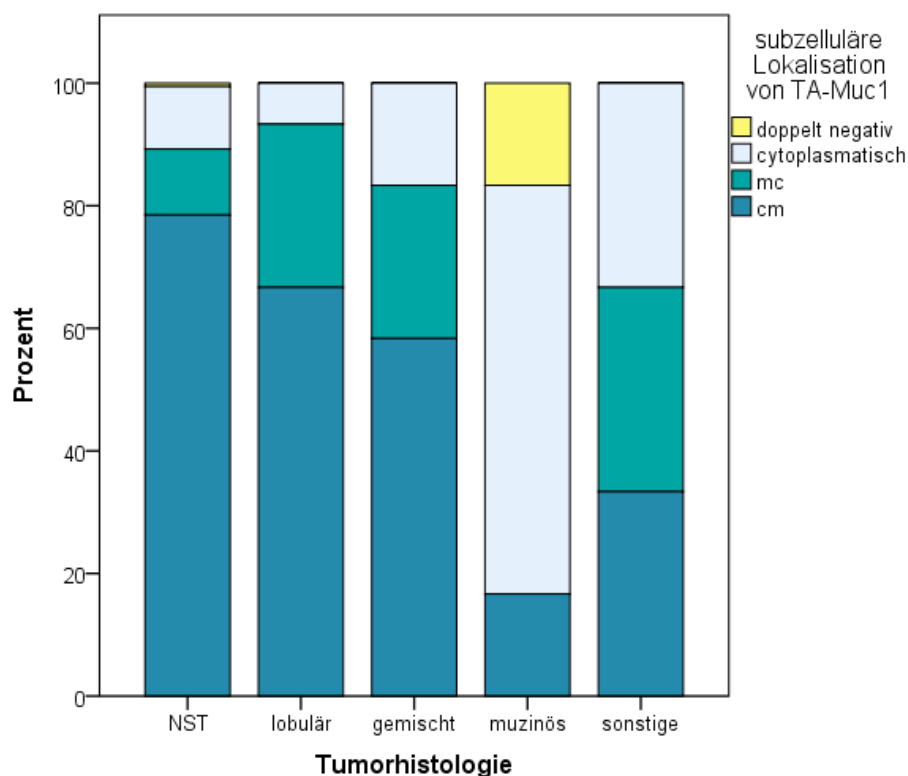


Abbildung 23: Verteilung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 in Abhängigkeit der Tumorhistologie.

Dargestellt ist die prozentuale Verteilung innerhalb der jeweiligen Tumorhistologie-Gruppen. Muzinöse Tumoren wiesen häufig ein rein cytoplasmatisches Verteilungsmuster auf. NST-Tumoren hingegen zeigten in fast 80% der Fälle eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation (*cm*).

4. Ergebnisse

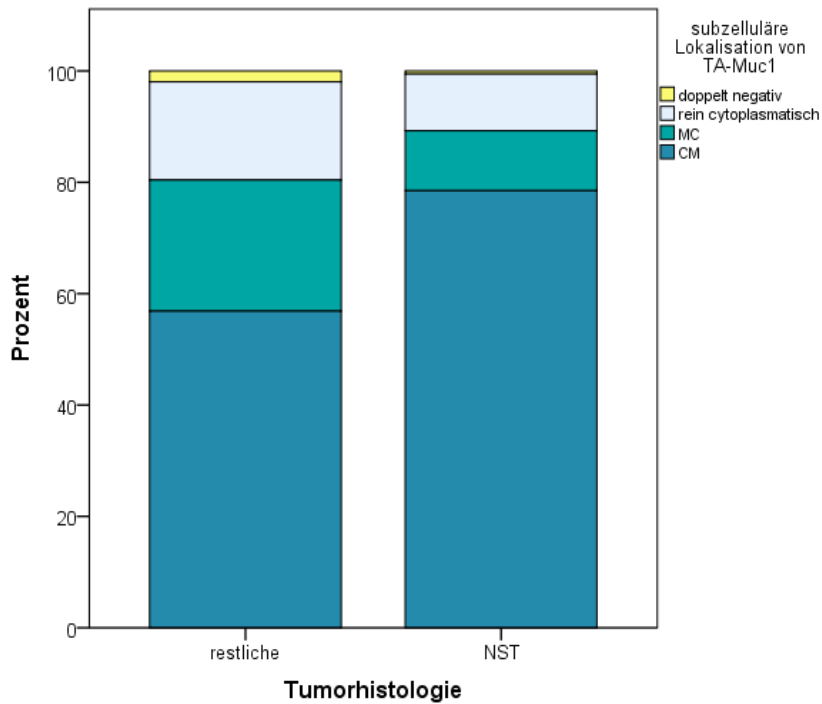


Abbildung 24: Vergleich des subzellulären-Expressions-musters von NST- und nicht-NST-Tumoren

NST-Tumoren wiesen häufiger ein überwiegend zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf (cm). Tumoren der Vergleichsgruppe zeigten häufiger eine überwiegend membranständige TA-MUC1-Lokalisation (mc).

4. Ergebnisse

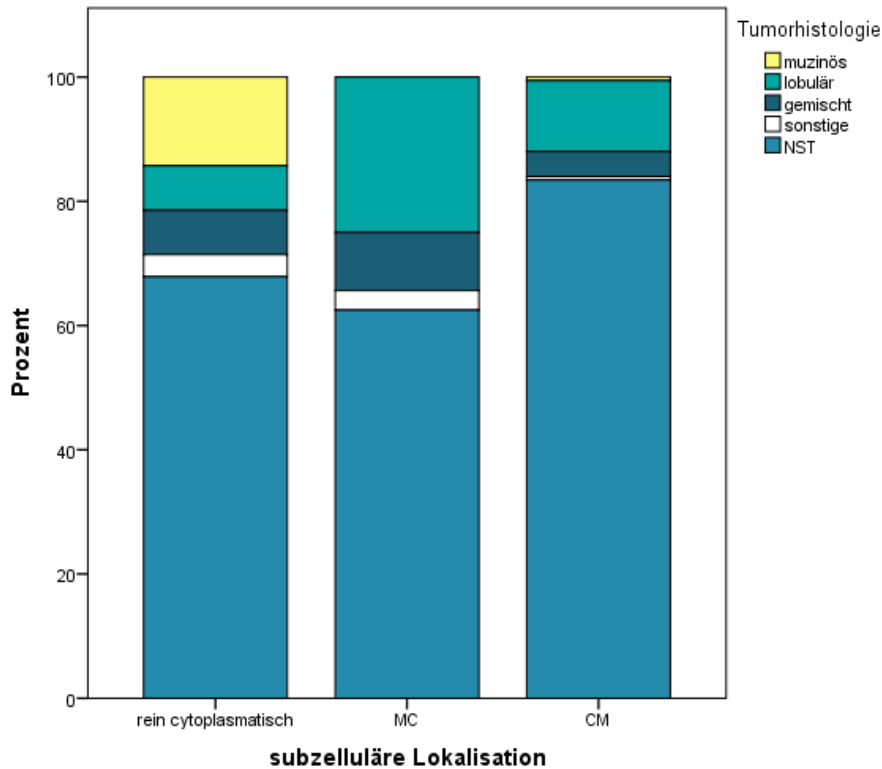


Abbildung 25: Verteilung der histologischen Subtypen nach subzellulärem-Expressionsmuster. Tumoren mit zytoplasmatischen Expressionsmuster waren häufiger vom muzinösen Subtyp. Tumoren mit überwiegend membranständigen Verteilungsmuster (mc) hingegen zeigten häufiger ein invasiv-lobuläres Karzinom.

Zusammenhang zwischen subzellulärer TA-MUC1-Lokalisation und Lymphknotenstatus

Anhand des subzellulären Verteilungsmusters ließ sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus im Tumorgewebe nachweisen (*c vs. restliche*: Chi²-Test: $p=0,024$; $\phi_p: 0,171$) (Abb. 28). Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster wiesen prozentual häufiger einen negativen Lymphknotenstatus auf als Tumoren der anderem subzellulären Verteilungsmuster (Abb. 29).

4. Ergebnisse

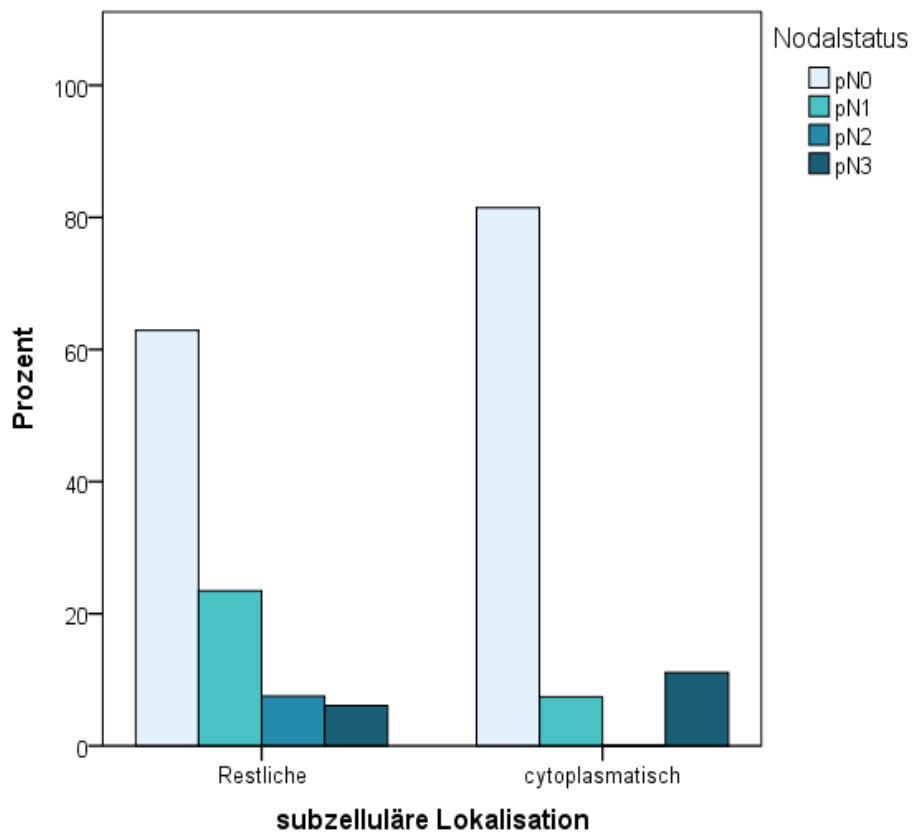
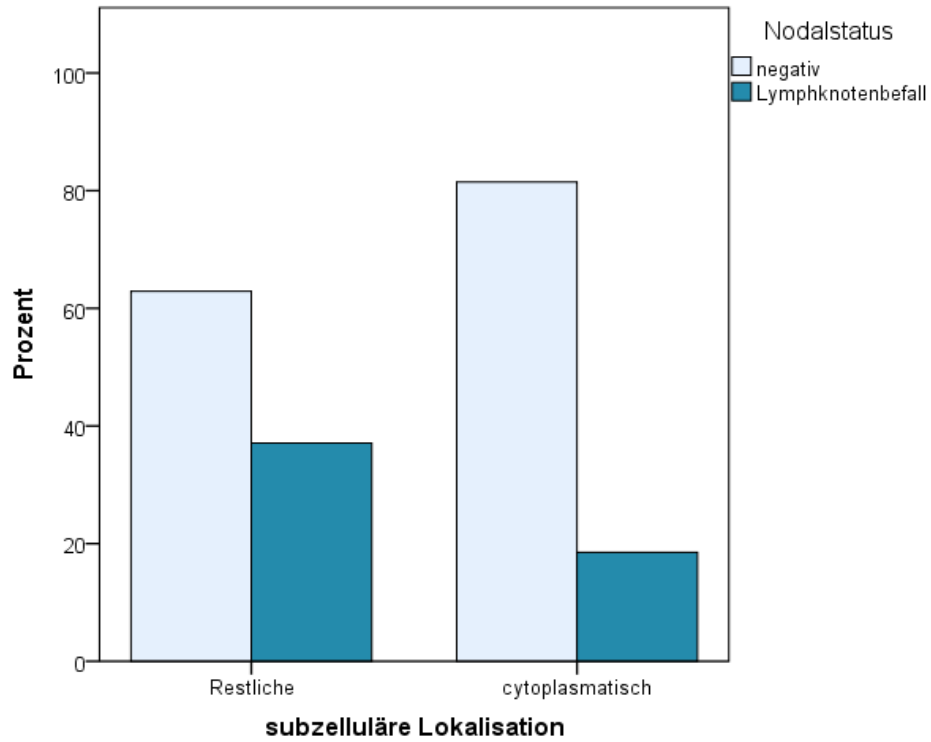


Abbildung 26: Verteilung des Nodal-Status in Tumoren mit zytoplasmatischem Expressionsmuster und der Vergleichsgruppe.

4. Ergebnisse

Tumoren mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster wiesen häufiger einen negativen Lymphknotenbefall im Tumorgewebe auf als Tumoren mit gemischten subzellulären Expressionsmuster (cm, mc).

Zusammenhang zwischen subzellulärer TA-MUC1-Lokalisation und dem HER2-Rezeptorstatus

Im Gesamtkollektiv wiesen 26 Tumoren (10,8%) einen positiven HER2/neu-Rezeptorstatus auf. Ein Großteil der untersuchten Tumorschnitte (n=215; 89,2%) war HER2-negativ.

Es zeigte sich ein tendenziell signifikanter Zusammenhang zwischen dem subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1 und dem HER2-Rezeptorstatus im Tumorgewebe (Chi²-Test: p=0,058; ϕ_p : 0,140). Tumoren mit überwiegend membranständiger TA-MUC1-Expression (mc) waren hierbei häufiger HER2-positiv als Tumoren der übrigen subzellulären Verteilungsmuster (c, cm).

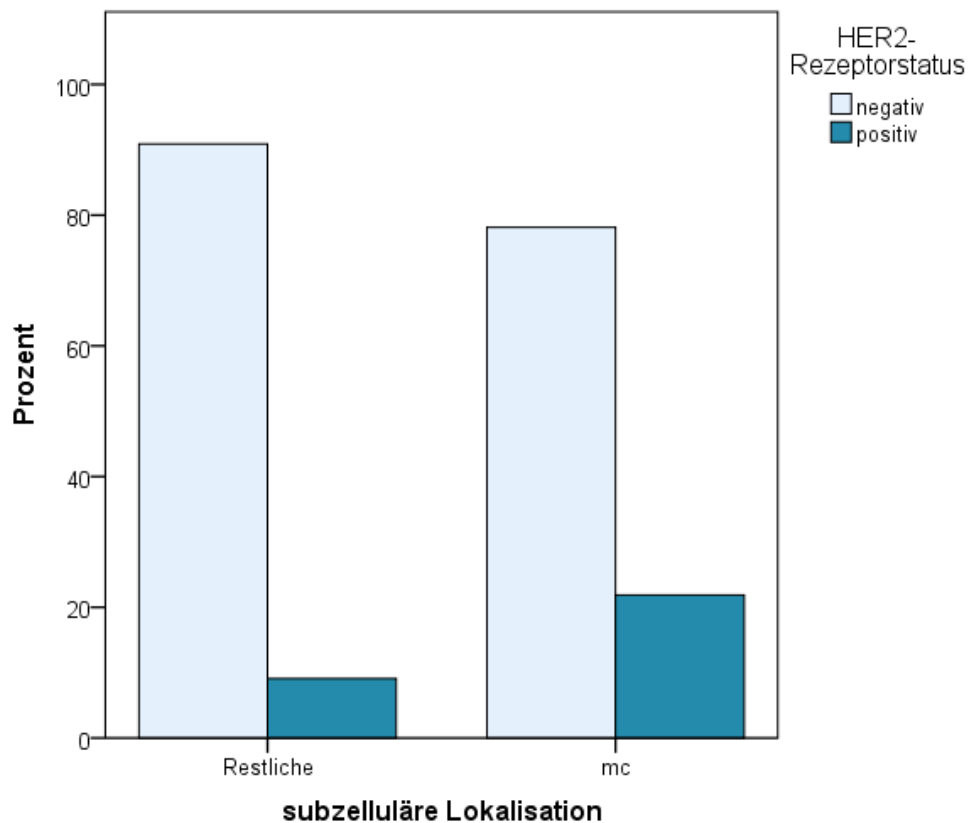


Abbildung 27: Verteilung des HER2-Rezeptorstatus in Abhängigkeit des subzellulären-Expressionsmusters. (mc vs. restliche).

4. Ergebnisse

mc-Tumoren waren prozentual häufiger HER2-Rezeptor-positiv als Tumoren der Vergleichsgruppe.

Zusammenhang zwischen subzellulärer TA-MUC1-Lokalisation und dem molekularen Subtyp

Anhand der Expression des ER-, PR- und HER2/neu-Rezeptorstatus im Tumorgewebe erfolgte eine Unterteilung der Tumoren in vier Gruppen: Risikogruppe 1: Hormonrezeptor (HR-) positiv²⁰ und HER2/neu-negativ. Risikogruppe 2: HR-positiv und HER2/neu-positiv. Risikogruppe 3: HR-negativ und HER2/neu-positiv. Risikogruppe 4: HR-negativ und HER2/neu-negativ²¹. Weiterhin wurden solche Tumoren, für die während des Follow-Up jeweils ein Ki67-Wert ermittelt werden konnte, in die molekularen Subtypen *Luminal A* (HR-positiv, HER2-negativ und niedriger KI-67) oder *Luminal B* (HR-positiv, HER2-negativ/positiv und hoher KI-67) unterteilt.

In den Analysen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1 und dem molekularen Subtyp nachgewiesen werden. Tumoren mit einem gemischten, überwiegend zytoplasmatischen Expressionsmuster waren signifikant seltener dem molekularen Subtyp *Luminal A* zuzuordnen als Tumoren der übrigen Expressionsmuster (*cm vs. Restliche*: Chi²-Test: p=0,039; ϕ_p : 0,210). (Abb. 31).

Tumoren mit überwiegend membranständigen Verteilungsmuster (*mc*) konnten hingegen signifikant häufiger der Risikogruppe 2 zugeordnet werden als Tumoren der Vergleichsgruppe (*mc vs. Restliche*: Chi²-Test: p=0,012; ϕ_p : 0,192) (Abb. 32).

²⁰ ER- und/ oder PR-Rezeptor

²¹ Entspricht dem triple-negativen-Mammakarzinom (TNBC; ER-, PR- und HER2/neu-negativ).

4. Ergebnisse

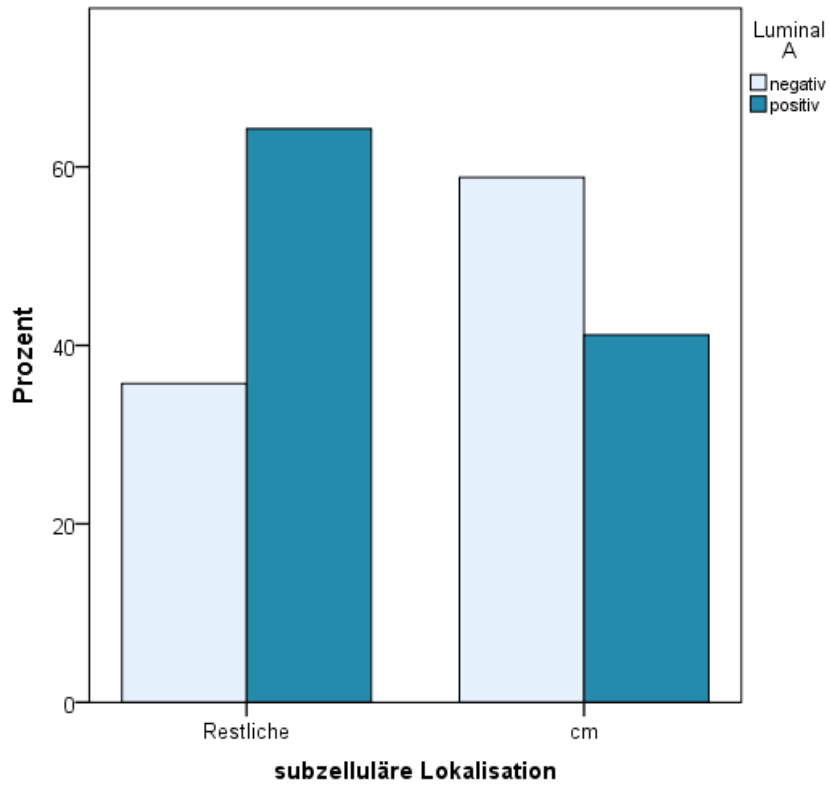


Abbildung 28: Verteilung der Risikogruppe „Luminal A“ in Abhängigkeit des subzellulären-Expressionsusters.

Cm-Tumoren waren häufiger dem intrinsischen Subtyp“ Luminal A“ zuzuordnen als Tumoren der Vergleichsgruppe.

4. Ergebnisse

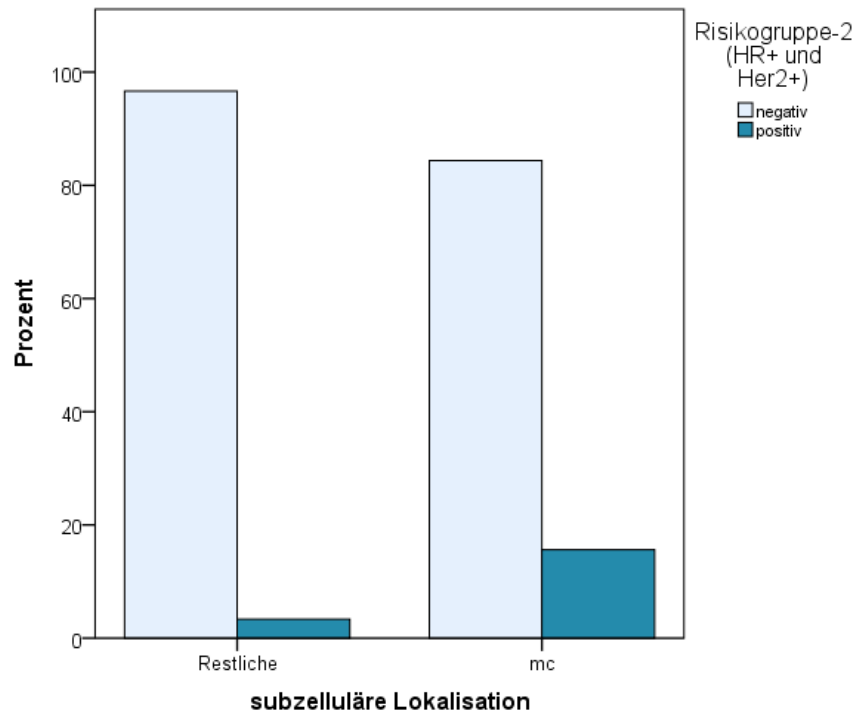


Abbildung 29: Verteilung der Risikogruppe 2 unterschieden nach subzellulärem-Expressionsmuster.

MC-Tumoren waren prozentual häufiger der Risikogruppe-2 zuzuordnen als Tumoren der Vergleichsgruppe.

Zusammenhang zwischen subzellulärer TA-MUC1-Lokalisation und der Tumorfokalität

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1 und der Tumor-Fokalität (Chi²-Test: $p=0,014$; $\phi_p: 0,167$). Tumoren mit zytoplasmatischen Expressionsmuster (*c*) wiesen häufiger als erwartet eine unifokale und weniger häufig als erwartet eine multifokale Herdexpression auf post-hoc-Chi²=0,038) (Abb. 34).

4. Ergebnisse

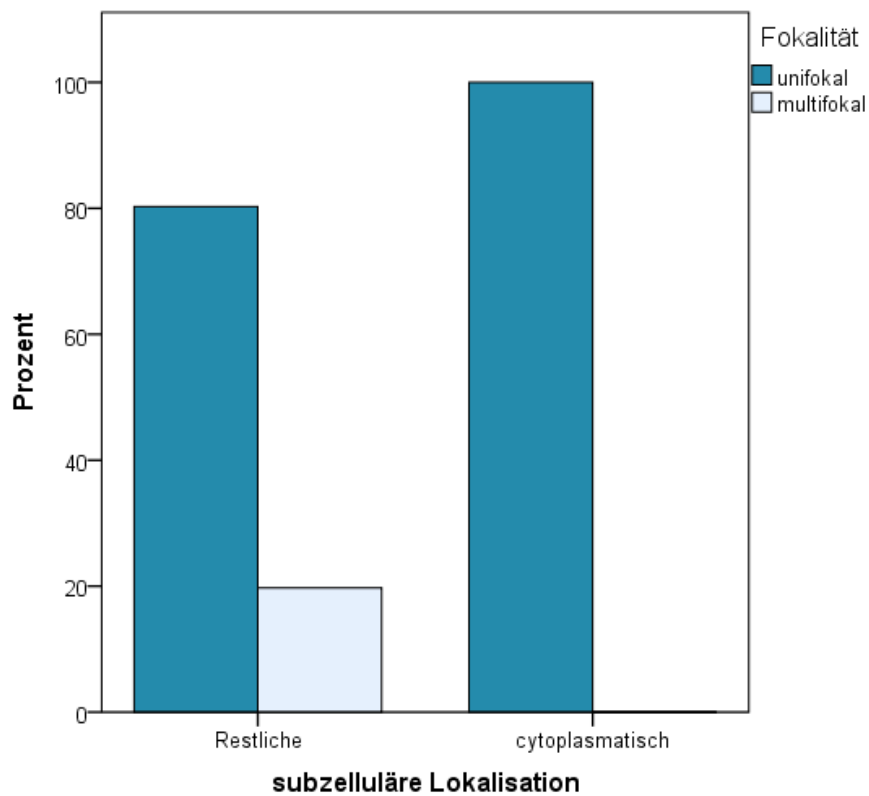


Abbildung 30: Verteilung der Herdexpression (unifokal vs. multifokal) nach subzellulärem.-
Expressionsmuster.

Innerhalb der Gruppe von zytoplasmatischen Tumoren zeigten sich ausschließlich unifokale
Herdexpression.

4. Ergebnisse

4.5 TA-MUC1 in Bezug auf die Prognose des Mammakarzinoms

4.5.1 Einfluss von TA-MUC1 auf das Gesamtüberleben

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das Gesamtüberleben

In den Ereigniszeitanalysen mittels Kaplan-Meier-Schätzer wurde der Einfluss der TA-MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben von Brustkrebspatientinnen untersucht. Zunächst wurden hierfür die 3-,5- und 10-Jahres-Überlebensraten (JÜR) bestimmt. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Überlebenszeitkurven mittels Log-Rank-Test. Für die Analysen zur Gesamtexpression von TA-MUC1 erfolgte eine Einteilung des Kollektivs in Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression unterhalb (IRS 0-6) und oberhalb (IRS 8-12) des Medians. 100 Patientinnen wiesen hierbei eine Gesamtexpression unterhalb und 130 Patientinnen oberhalb des Medians auf.

Die 3-JÜR für die Gruppe *<Median* betrug 93%, die 5-JÜR 90% und die 10-JÜR 86%. Für die Gruppe *>Median* lag die 3-JÜR bei 97% und die 5-JÜR bei 94%, das 10-Jahres-Überleben konnte nicht bestimmt werden (Tabelle 14). Die mediane Überlebenszeit war für beide Gruppen nicht zu ermitteln²². Zum Ende des Beobachtungszeitraums wiesen Patientinnen der Gruppe *>Median* eine längere Überlebenszeit auf als die Vergleichsgruppe. Jedoch zeigte sich für keine der beiden Gruppen eine gleichmäßige Überlegenheit über den Beobachtungszeitraum (Abb. 32).

Tabelle 14: Vergleich der Überlebensraten in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression

Variable	n	Überlebensrate (%)		
		3-JÜR	5-JÜR	10-JÜR
mAK-GGSK-1/30				
< Median	100	93	90	86
≥ Median	130	97	94	—

²² Bis zur maximalen Beobachtungszeit (10 Jahre) ist für weniger als die Hälfte der Patientinnen ein Ereignis (Tod) eingetreten.

4. Ergebnisse

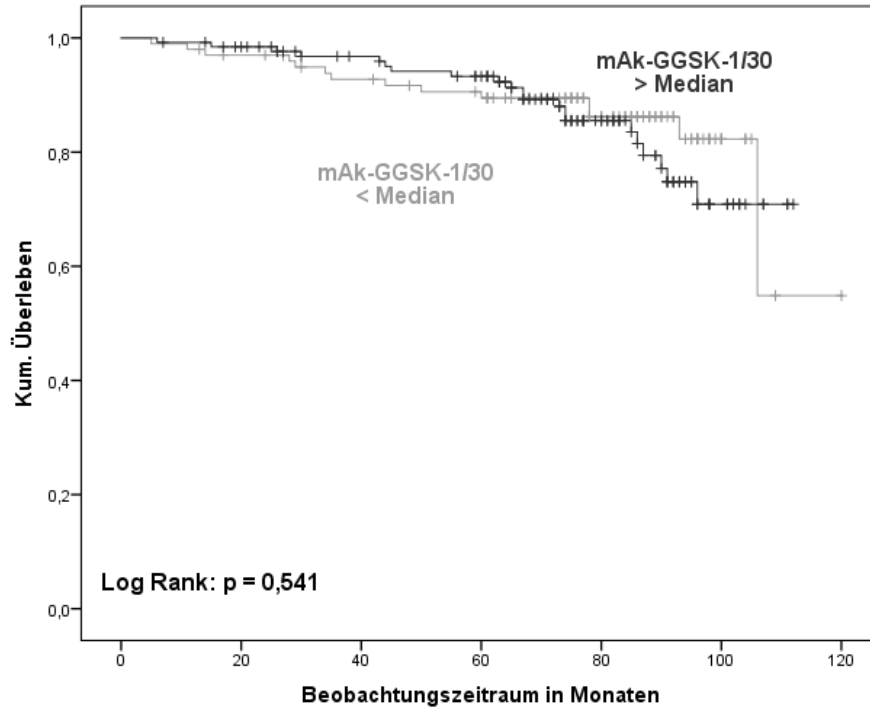


Abbildung 31: Überlebenszeitkurven (Gesamtüberleben) in Abhängigkeit von der TA-MUC1-Expression.

Im Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven für Patientinnen mit einer Expression unterhalb ($mAk-GGSK-1/30 < Median$) und oberhalb des Medians ($mAk-GGSK-1/30 > Median$) zeigte sich für keine der beiden Gruppen eine gleichmäßige Überlegenheit.

In den multivariaten Cox-Regressionsanalysen ergab sich für die TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben. Ein höheres Patientenalter bei Erstdiagnose (≥ 55 Jahre), eine Risikoläsion im Sinne eines Carcinoma in situ im Tumorschnitt (CIS=ja), die Tumorgöße (pT2-pT3) und ein positiver Lymphknotenbefall (pN1-pN3) waren mit einem unabhängigen signifikant erhöhten Sterberisiko assoziiert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Multivariate-Cox-Regression: Vergleich der Sterberaten unterschiedlicher Einflussfaktoren

Variable	[HR Exp (B)]	95%-KI		p-Wert
		untere	obere	
Alter (< 55 vs. ≥ 55 Jahre)	4,85	1,81	12,99	0,002
Histologie (kein nst vs. Nst)				ns
Grading (G1-G2 vs. G3)				ns
pT (pT1 vs. pT2 – pT3)	3,18	1,27	7,95	0,013
pN (pN0 vs. pN1 – pN3)	2,58	1,23	5,41	0,012

4. Ergebnisse

CIS (nein vs. Ja)	3,00	1,09	8,33	0,034
ER (neg. vs. Pos.)	0,44	0,18	1,05	0,064
PR (neg. vs. Pos.)				ns
Her2 (neg. vs. Pos.)	0,13	0,02	1,02	0,052
GGSK-1/30 (< Median vs. ≥ Median)				ns

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das Gesamtüberleben unterteilt nach subzellulärem Verteilungsmuster

Im zweiten Schritt wurde das Gesamtkollektiv anhand des subzellulären Verteilungsmusters im Tumorgewebe in drei Subgruppen unterteilt (*cyt*-GGSK-1/3-, *mc*-GGSK-1/30- und *cm*-GGSK-1/30-Patientinnen). Innerhalb dieser Gruppen wurde erneut der Einfluss der TA-MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben betrachtet. Im Kollektiv von Patientinnen mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster (*cyt*-mAK-GGSK-1/30; n=28) wurde TA-MUC1 in 11 Fällen unterhalb und in 17 Fällen oberhalb des Medians exprimiert. Für die Gruppe <Median betrug die 3- und 5-JÜR die 100%, die 10-JÜR konnte nicht bestimmt werden. Für die Gruppe ≥Median lag die 3- und 5-JÜR bei 88%, die 10-JÜR lag bei 82 % (Tabelle 16).

Im *cyt*-mAK-GGSK-1/30-Kollektiv zeigten Patientinnen mit einer Expression unterhalb des Medians eine gleichmäßig bessere Überlebenszeit als Patientinnen der Vergleichsgruppe. Der Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war statistisch nicht signifikant (Log-Rank: 0,179) (Abb.33).

Im *mc*-GGSK-1/30-Kollektiv (n=31) wurde TA-MUC1 in fünf Fällen unterhalb und in 26 Fällen oberhalb des Medians exprimiert. Die 3- und 5-JÜR für die Gruppe <Median lag bei 60%, für die Gruppe ≥Median betrug die 3-JÜR 100% und die 5- JÜR lag bei 96%. Die 10-JÜR konnte in beiden Gruppen nicht bestimmt werden. Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians zeigten im *mc*-Kollektiv ein signifikant besseres Gesamtüberleben als Patientinnen mit einer Expression unterhalb des Medians (Log-Rank: p=0,047) (Abb.34). Patientinnen mit überwiegend zytoplasmatischen Verteilungsmuster (*cm*-GGSK-1/30-Kollektiv) (n=169) zeigten in 71 Fällen eine Expression unterhalb und in 98 Fällen eine Expression oberhalb des Medians. Für die Gruppe <Median betrug die 3-JÜR 94% und die 5-JÜR 92%. In der Gruppe ≥Median lag die 3-JÜR bei 97% und die 5-JÜR bei 94%. Für keine der beiden Gruppen zeigte sich eine Überlegenheit im Verlauf der Überlebenszeitkurven (Log-Rank-Test: 0,398) (Abb. 35).

4. Ergebnisse

Tabelle 16: Vergleich der Überlebensraten in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression, unterteilt nach subzellulärem-Verteilungsmuster

Variable	n	Überlebensrate (%)		
		3-JÜR	5-JÜR	10-JÜR
cyt.-mAK-GGSK-1/30				
< Median	11	100	100	—
≥ Median	17	88	88	82
mc-mAK-GGSK-1/30				
< Median	5	60	60	—
≥ Median	26	100	96	—
cm-mAK-GGSK-1/30				
< Median	71	94	92	—
≥ Median	98	97	94	—

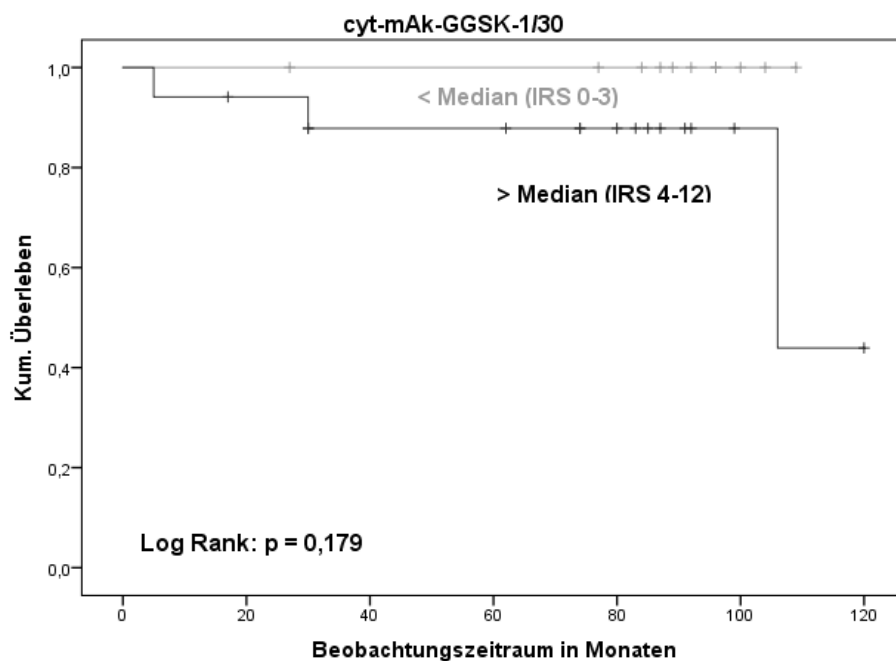


Abbildung 32: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (zytoplasmatisches Kollektiv).

Patientinnen mit einer Gesamtexpression unterhalb des Medians wiesen in der cyt-TA-MUC1-Gruppe ein gleichmäßig besseres Gesamtüberleben auf.

4. Ergebnisse

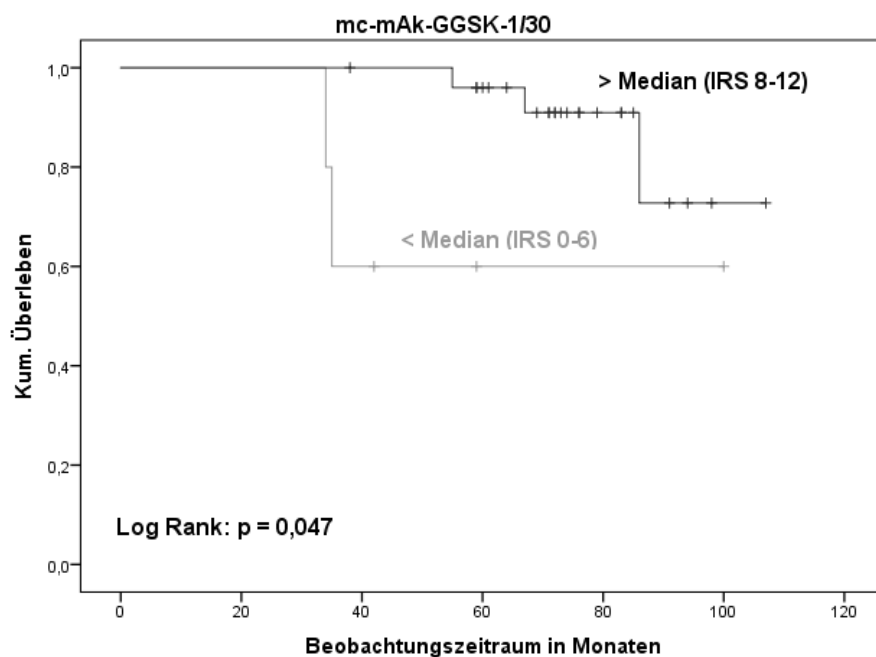


Abbildung 33: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (mc-Kollektiv).

Patientinnen mit einer Gesamtexpression oberhalb des Medians wiesen ein signifikant besseres Gesamtüberleben auf als die Vergleichsgruppe.

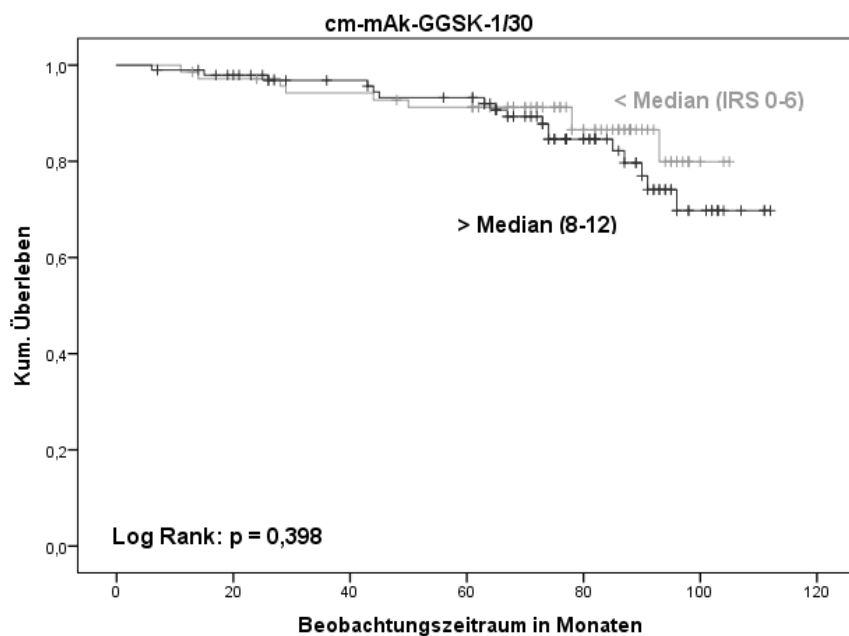


Abbildung 34: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cm-Kollektiv).

4. Ergebnisse

In der cm-TA-MUC1-Gruppe wiesen Patientinnen mit einer Gesamtexpression unterhalb des Medians zum Ende des Beobachtungszeitraums ein besseres Gesamtüberleben auf als die Vergleichsgruppe.

Einfluss der subzellulären TA-MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben

28 Patientinnen zeigten ein zytoplasmatisches Expressionsmuster von TA-MUC1 (cyt-TA-MUC1) im Tumorgewebe. Die Vergleichsgruppe der anderen Verteilungsmuster bestand aus 206 Fällen. Für die cyt-TA-MUC1-Gruppe lag die 3- und 5-JÜR bei 93%, die 10-JÜR betrug 90%. Für die Vergleichsgruppe lag die 3-JÜR bei 96% und die 5-JÜR bei 92%. Die 10-JÜR konnte nicht bestimmt werden (Tabelle 17).

Patientinnen mit zytoplasmatischer Expression wiesen zum Ende des Beobachtungszeitraums eine schlechtere Überlebenszeit auf als Patientinnen der Vergleichsgruppe. Im Verlauf der Überlebenszeitkurven zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 36).

31 Patientinnen wiesen ein gemischtes, überwiegend membranständiges Verteilungsmuster auf (*mc*). Die Vergleichsgruppe bestand aus 203 Fällen. In der *mc*-Gruppe betrug die 3-JÜR 94% und die 5-JÜR 90%. Für die Vergleichsgruppe lag die 3-JÜR bei 96%, die 5-JÜR bei 93% und die 10-JÜR lag bei 85% (Tabelle 17).

Am Ende des Beobachtungszeitraums zeigten Patientinnen mit einer *mc*-TA-MUC1-Expression ein besseres Gesamtüberleben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven (Abb. 37).

Bei 169 Patientinnen wurde TA-MUC1 gemischt, überwiegend zytoplasmatisch exprimiert (*cm*). Die Vergleichsgruppe bestand aus 65 Patienten. In der *cm*-Gruppe betrug die 3-JÜR 96% und die 5-JÜR 93%. Die 10-JÜR konnte nicht bestimmt werden. Für die Vergleichsgruppe lag die 3-JÜR bei 94%, die 5-JÜR bei 91% und die 10-JÜR bei 86% (Tabelle 17).

Am Ende des Beobachtungszeitraums zeigte die *cm*-Gruppe eine bessere Überlebenszeit als die Vergleichsgruppe. Ein signifikanter Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war auch hier nicht nachweisbar (Abb. 38).

Da sich hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 für keine der Gruppen eine gleichmäßige Überlegenheit im Verlauf der Überlebenszeitkurven nachweisen ließ, waren die Bedingungen eines proportionalen Hazard für die nachfolgenden multivariaten Cox-Regressionsanalysen nicht gegeben, weshalb auf eine Darstellung dieser verzichtet wurde.

4. Ergebnisse

Tabelle 17: Vergleich der Überlebensraten unterteilt nach subzellulärer TA-MUC1-Expression

Variable	n	Überlebensrate (%)		
		3-JÜR	5-JÜR	10-JÜR
subzelluläre-Lokalisation				
cytoplasmatische	28	93	93	90
Restliche	206	96	92	—
subzelluläre-Lokalisation				
mc	31	94	90	—
Restliche	203	96	93	85
subzelluläre-Lokalisation				
cm	169	96	93	—
Restliche	65	94	91	86

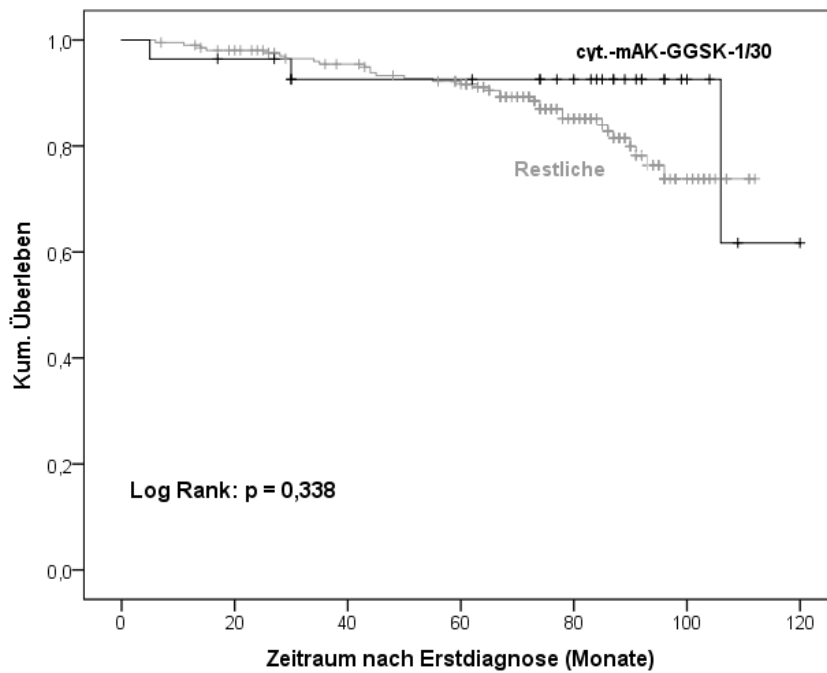


Abbildung 35: Vergleich der Überlebenszeitkurven unterteilt nach subzellulärem Expressionsmuster (cyt vs. Restliche)

Zum Ende des Beobachtungszeitraums zeigten Patientinnen der cyt-TA-MUC1 Gruppe ein schlechteres Gesamtüberleben als die Vergleichsgruppe.

4. Ergebnisse

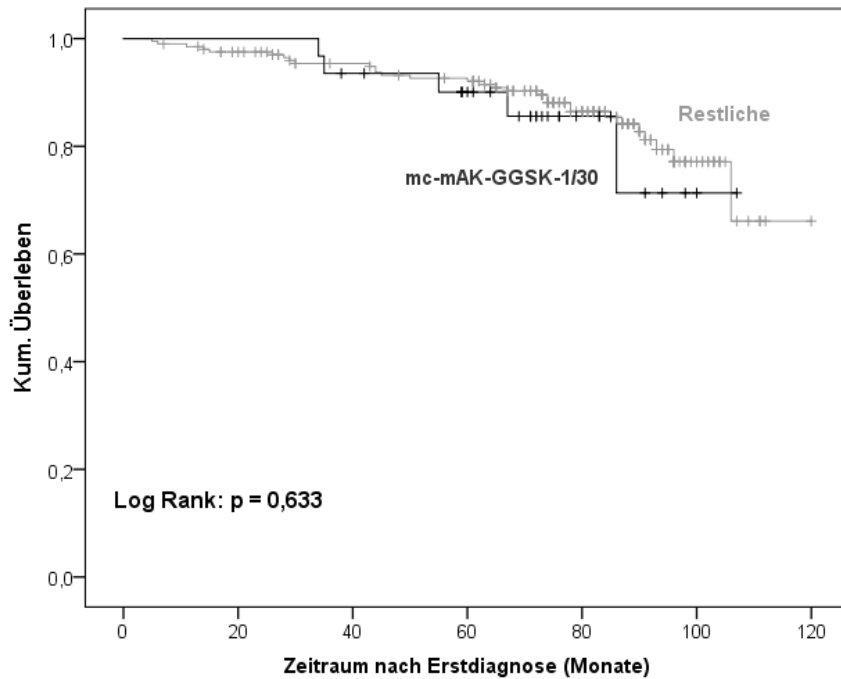


Abbildung 36: Vergleich der Überlebenszeitkurven unterteilt nach subzellulärem Expressionsmuster (mc vs. restliche).

Für keine der beiden Gruppen zeigte sich eine gleichmäßige Überlegenheit im Verlauf der Überlebenszeitkurven.

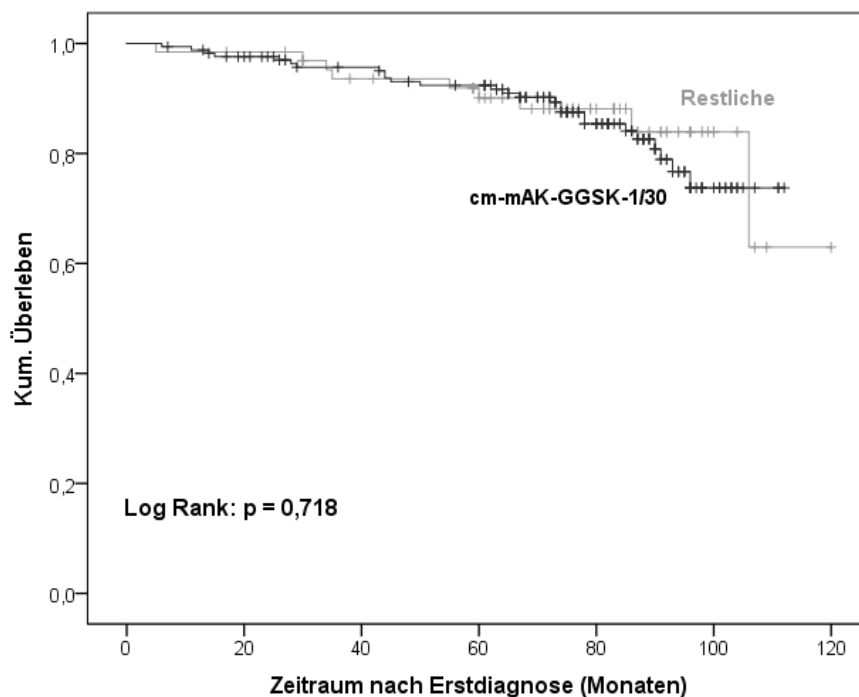


Abbildung 37: Vergleich der Überlebenszeitkurven unterteilt nach subzellulärem Expressionsmuster (cm vs. restliche).

4. Ergebnisse

Für keine der beiden Gruppen zeigte sich eine gleichmäßige Überlegenheit im Verlauf der Überlebenszeitkurven.

4.5.2 Einfluss von TA-MUC1 auf das Metastasenfreie-Überleben

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das Metastasenfreie-Überleben (MFS)

In den Überlebenszeitanalysen wurde der Einfluss der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe auf das Metastasenfreie-Überleben (MFS) von Brustkrebspatientinnen untersucht. Hierbei erfolgte erneut eine Betrachtung der Gesamtexpression von TA-MUC1 anhand der Mediengruppen (<Median vs. ≥Median).

In den Überlebenszeitkurven wiesen Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians zunächst ein gleichmäßig besseres MFS auf. Zum Ende des Beobachtungszeitraums war die Überlebenszeit in der Gruppe >Median jedoch der Vergleichsgruppe <Median unterlegen (Abb. 38).

In der multivariaten Cox-Analyse ergab sich kein signifikanter Einfluss für die Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das MFS. Ein positiver Lymphknotenbefall (*pN1-pN3*) war mit einem mehr als 4,5-fach erhöhten Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen assoziiert (HR: 4,505/ p-Wert: 0,003/ 95%-KI: 1,7 – 12,1).

4. Ergebnisse

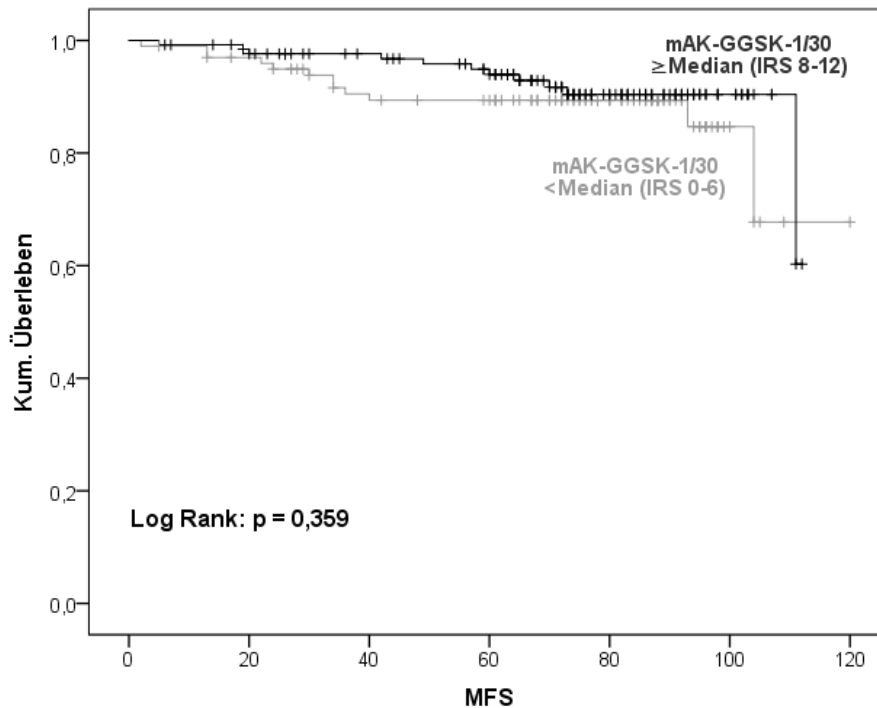


Abbildung 38: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression

Nach einem zunächst überlegenen Verlauf zeigten Patientinnen mit einer Expression oberhalb des Medians zum Ende des Beobachtungszeitraums ein schlechteres MFS als die Vergleichsgruppe.

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das metastasenfrem Überleben, unterteilt nach subzellulären Verteilungsmuster

Patientinnen mit zytoplasmatischer TA-MUC1-Lokalisation im Tumorgewebe (cyt. -GGSK-1/30; n=28) wiesen in 11 Fällen eine Gesamtexpression unterhalb und in 17 Fällen oberhalb des Medians auf. Das MFS der Gruppe $>Median$ war zum Ende des Beobachtungszeitraums das der Vergleichsgruppe überlegen. Der Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war statistisch nicht signifikant (Abb. 39).

Im mc-GGSK-1/30-Kollektiv (n=31) wurde TA-MUC1 in 5 Fällen unterhalb und in 26 Fällen oberhalb des Medians exprimiert. Die Gruppe $>Median$ wies über den gesamten Beobachtungszeitraum ein gleichmäßig besseres MFS als die Vergleichsgruppe auf. Der Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war statistisch nicht signifikant (Log-Rank: $p = 0,065$) (Abb. 40).

Im cm-GGSK-1/30-Kollektiv (n=169) wurde TA-MUC1 in 71 Fällen unterhalb und in 98 Fällen oberhalb des Medians exprimiert. Bis zu einem Beobachtungszeitraum von 70 Monaten

4. Ergebnisse

wiesen Patientinnen mit einer Expression oberhalb des Medians ein besseres MFS auf als die Vergleichsgruppe. Im Verlauf zeigte sich keine Überlegenheit für eine der beiden Gruppen (Abb. 41).

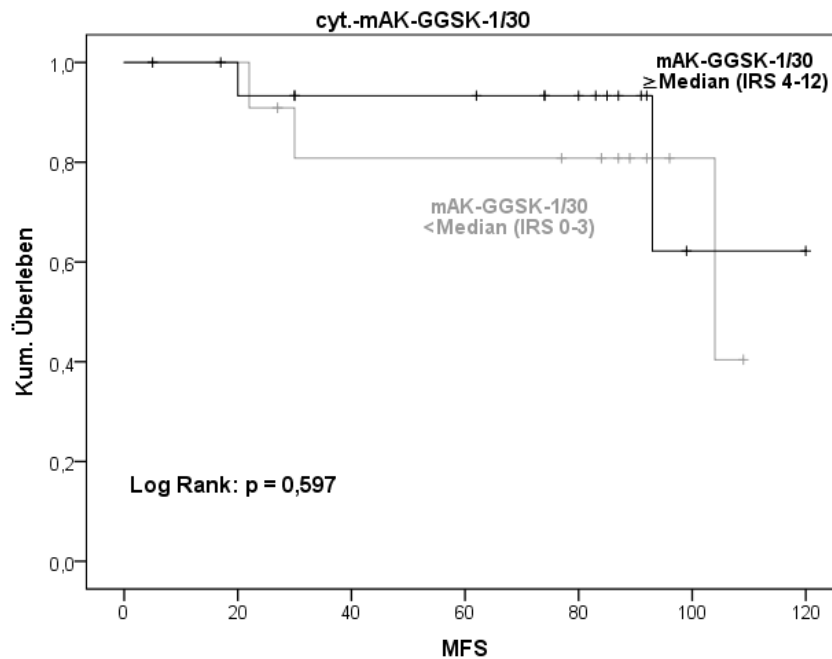


Abbildung 39: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (zytoplasmatisches Kollektiv).

Im zytoplasmatischen Kollektiv wiesen Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians über einen langen Beobachtungszeitraum ein besseres Gesamtüberleben auf. Es zeigte sich keine gleichmäßige Überlegenheit.

4. Ergebnisse

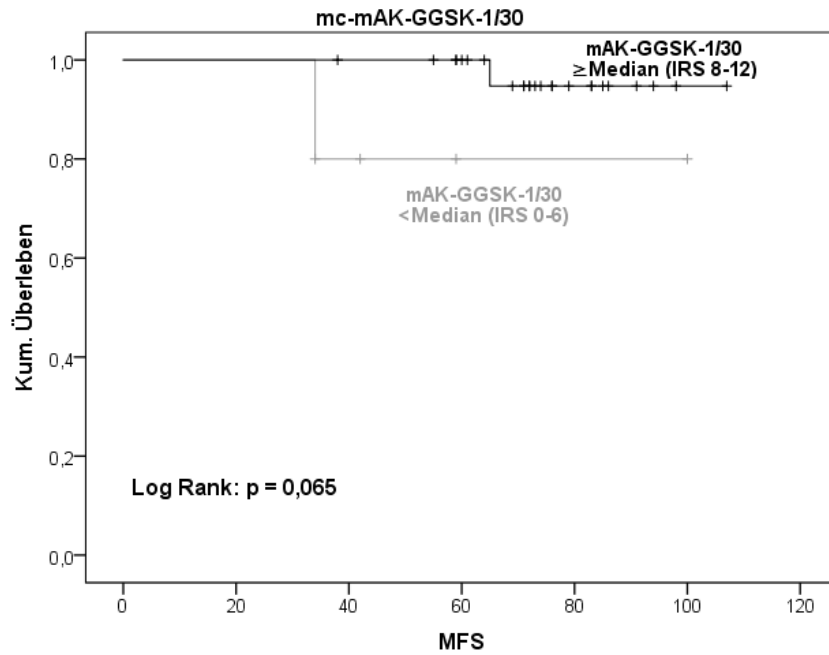


Abbildung 40: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (mc-Kollektiv)

Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians wiesen innerhalb der mc-TA-MUC1-Gruppe ein gleichmäßig besseres MFS auf.

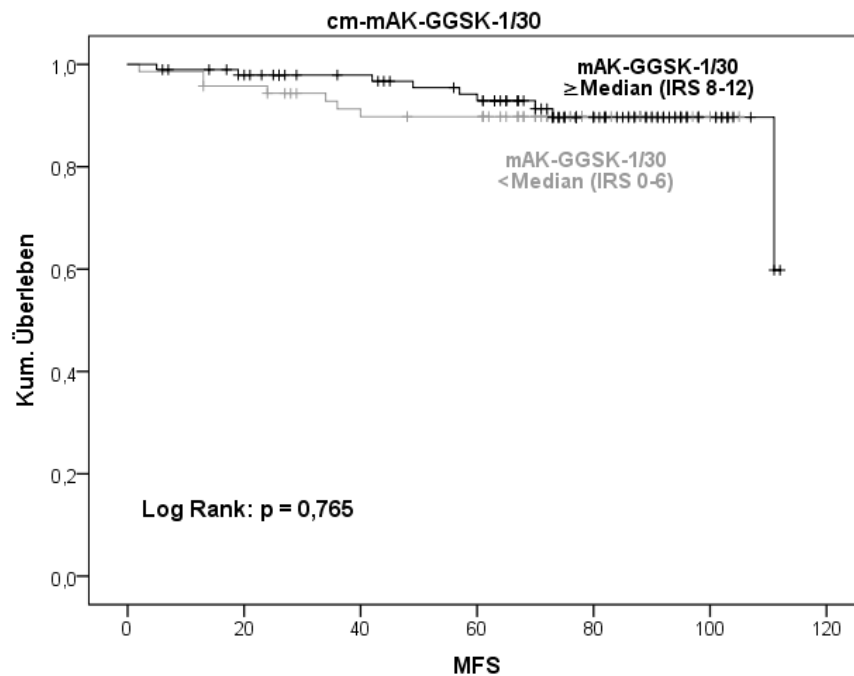


Abbildung 41: Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cm-Kollektiv)

4. Ergebnisse

Im cm-Kollektiv zeigte sich über den Beobachtungszeitraum keine Überlegenheit für eine der beiden. Median-Gruppen.

Einfluss der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 auf das MFS von Brustkrebspatientinnen

Patientinnen mit zytoplasmatischen Expressionsmuster von TA-MUC1 zeigten ein gleichmäßig unterlegenes MFS über den gesamten Beobachtungszeitraum. Der Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war statistisch nicht signifikant (Abb. 42). In der multivariaten Cox-Regression erwies sich eine zytoplasmatische TA-MUC1-Lokalisation, neben einem positiven Lymphknotenbefall, als unabhängiger, signifikanter Prognostikator in Bezug auf das MFS. Patientinnen mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster hatten im Vergleich ein etwa 3-fach erhöhtes Risiko für Fernmetastasen (HR: 3,32/ p-Wert 0,024/ 95%-KI: 1,2-9,4) (Tabelle 18).

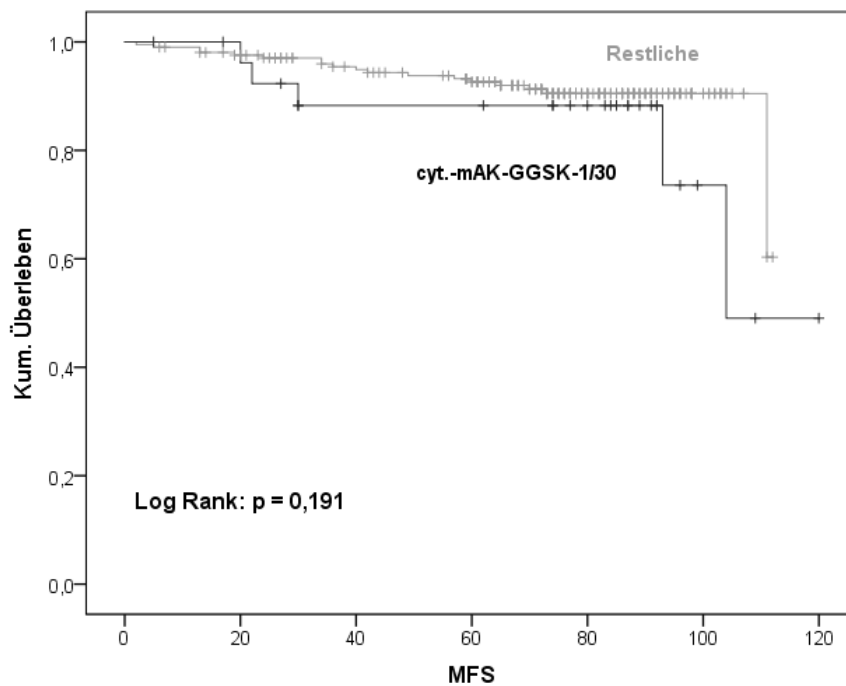


Abbildung 42: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) unterteilt nach subzellulärem Expressionsmuster (cyt vs. Restliche)

Patientinnen mit zytoplasmatischer Expression zeigten ein gleichmäßig unterlegenes MFS über den gesamten Beobachtungszeitraum.

4. Ergebnisse

Tabelle 18: Multivariate Cox-Regression: Einfluss des subzellulärem Expressionsmusters auf das MFS (cyt vs. Restliche)

Variable	[HR Exp (B)]	95%-KI		p-Wert
		untere	obere	
Alter (< 55 vs. ≥ 55 Jahre)				ns
Histologie (kein nst vs. Nst)				ns
Grading (G1-G2 vs. G3)				ns
pT (pT1 vs. pT2 – pT3)	2,51	0,80	7,82	0,112
pN (pN0 vs. pN1 – pN3)	5,37	1,95	14,79	0,001
CIS (nein vs. Ja)				ns
ER (neg. vs. Pos.)				ns
PR (neg. vs. Pos.)				ns
Her2 (neg. vs. Pos.)				ns
GGSK-1/30 (Restliche vs. Cyt)	3,32	1,18	9,40	0,024

31 Patientinnen zeigten ein gemischtes, überwiegend membranständiges Verteilungsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe (*mc-TA-MUC1*). Die Vergleichsgruppe bestand aus 203 Fällen. In den Überlebenszeitkurven wies die *mc-TA-MUC1*-Gruppe ein gleichmäßig besseres MFS auf als die Vergleichsgruppe (Abb. 43). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven. In der multivariaten Cox-Analyse erwies sich ein *mc*-Verteilungsmuster ohne signifikanten Einfluss auf das Risiko für Fernmetastasen (Tabelle 19).

4. Ergebnisse

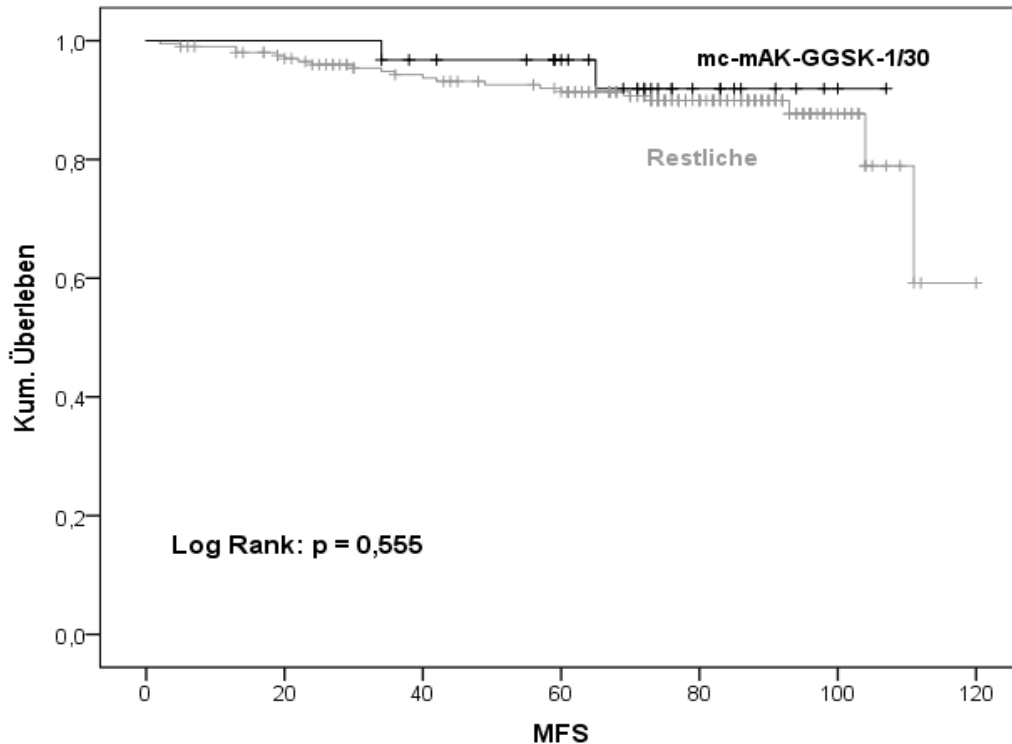


Abbildung 43: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit des subzell-Expressions-musters (mc vs. Restliche)

Die mc-TA-MUC1-Gruppe zeigte ein gleichmäßig besseres MFS über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Tabelle 19: Multivariate Cox-Regression: Einfluss des subzellulären Expressions-musters auf das MFS (mc vs. Restliche)

Variable	[HR Exp (B)]	95%-KI		p-Wert
		untere	obere	
Alter (< 55 vs. ≥ 55 Jahre)				ns
Histologie (kein nst vs. Nst)				ns
Grading (G1-G2 vs. G3)				ns
pT (pT1 vs. pT2 – pT3)	2,55	0,82	7,92	0,105
pN (pN0 vs. pN1 – pN3)	4,45	1,68	11,83	0,003
CIS (nein vs. Ja)				ns
ER (neg. vs. Pos.)				ns
PR (neg. vs. Pos.)				ns
Her2 (neg. vs. Pos.)				ns
GGSK (Restliche vs. Mc)				ns

Bei 169 Patientinnen wurde TA-MUC1 gemischt, überwiegend zytoplasmatisch exprimiert (cm). Die Vergleichsgruppe bestand aus 65 Patientinnen. Es zeigte sich keine gleichmäßige

4. Ergebnisse

Überlegenheit für eine der beiden Gruppen (Abb. 44). Eine anschließende multivariate Cox-Analyse wurde daher nicht durchgeführt.

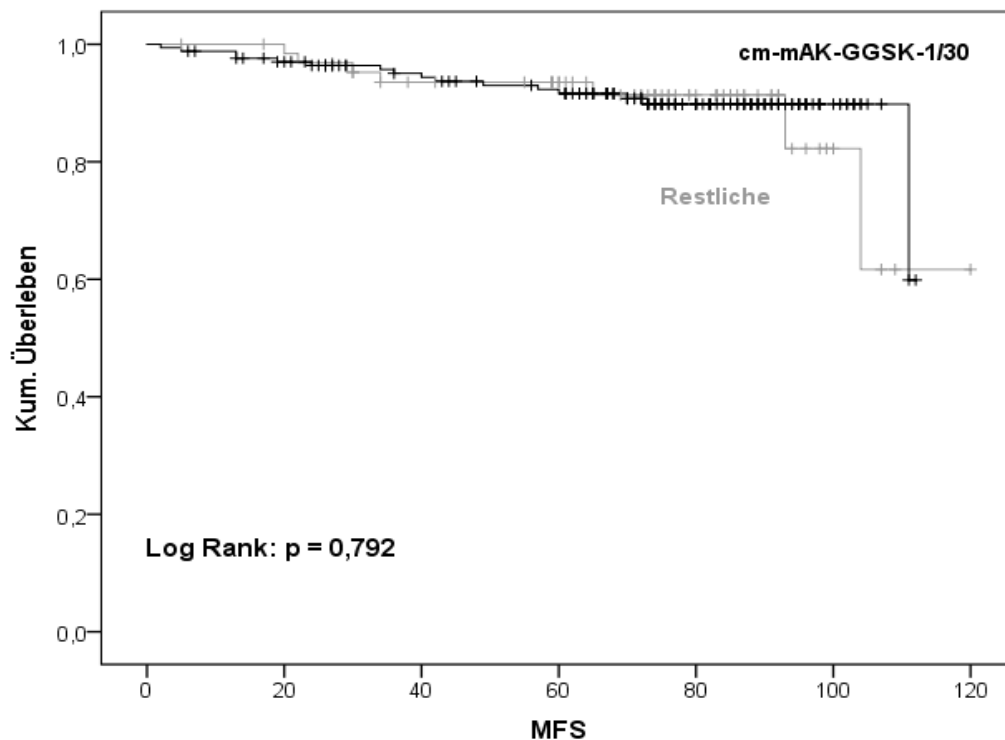


Abbildung 44: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit des subzellulären-Expressions-musters (cm vs. Restliche)

In Bezug auf das MFS zeigte sich keine gleichmäßige Überlegenheit im Verlauf der Überlebenszeitkurven.

4.5.3 Einfluss von TA-MUC1 auf das Krankheitsfreie-Überleben

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das DFS von Brustkrebspatientinnen

Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians zeigten ein gleichmäßig besseres Krankheitsfreies-Überleben (DFS) über den gesamten Beobachtungszeitraum als die Vergleichsgruppe. Der Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war statistisch nicht signifikant (Log-Rank: $p = 0,115$) (Abb. 45). In der multivariaten Cox-Regression erwies sich die Gesamtexpression von TA-MUC1 als unabhängiger Prognostikator für das Auftreten von Fernmetastasen und/oder Rezidiv (*Disease-Event*). Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression unterhalb des Medians hatten ein um ca. 60% erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Events im Sinne einer Fernmetastase und/oder eines Rezidivs (<Median vs. >Median: HR 0,43/ p-Wert: 0,025/ 95%-KI: 0,20-0,90).

4. Ergebnisse

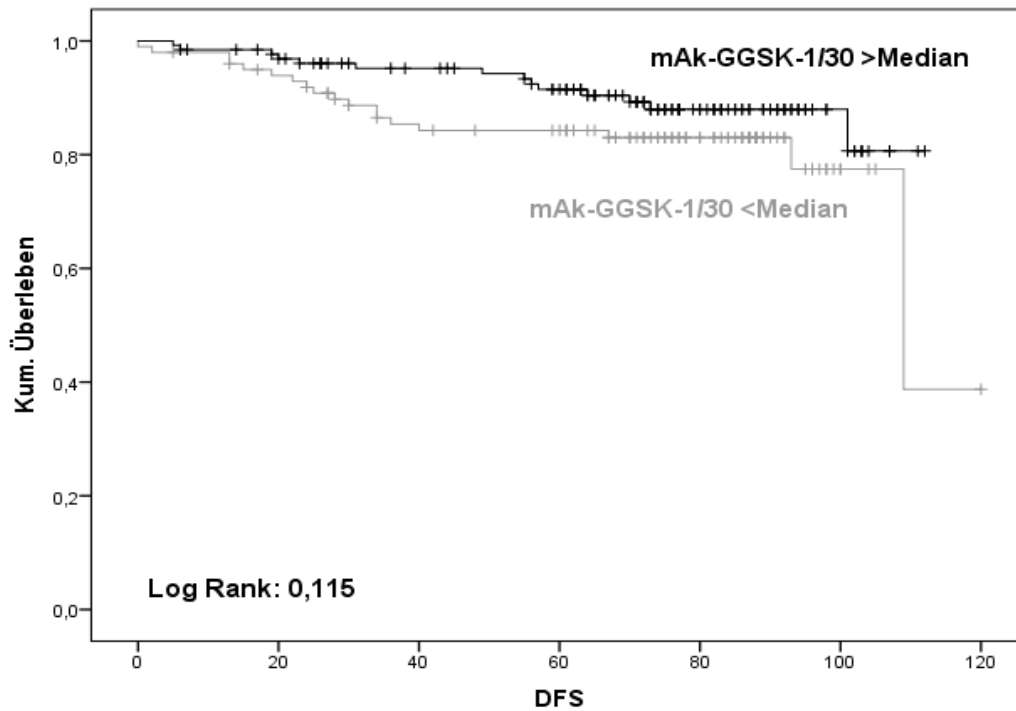


Abbildung 45: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression.

Patientinnen mit einer Expression oberhalb des Medians zeigten ein gleichmäßig besseres DFS.

Tabelle 20: Multivariate Cox-Regression: Einfluss der TA-MUC1-Expression auf das DFS.

Variable	[HR Exp (B)]	95%-KI		p-Wert
		untere	obere	
Alter (<55 vs. ≥55 Jahre)				ns
Histologie (kein nst vs. Nst)				ns
Grading (G1-G2 vs. G3)				ns
pT (pT1 vs. pT2 – pT3)	2,20	0,94	5,14	0,070
pN (pN0 vs. pN1 – pN3)	2,26	1,03	4,93	0,041
CIS (nein vs. Ja)				ns
ER (neg. vs. pos.)				ns
PR (neg. vs. pos.)				ns
Her2 (neg. vs. pos.)	2,37	0,99	5,64	0,051
GGSK-1/30 (<Median vs. ≥Median)	0,43	0,20	0,90	0,025

4. Ergebnisse

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das DFS unterteilt nach subzellulären Expressionsmuster

Im *mc*-GGSK-1/30-Kollektiv (n=31) wiesen fünf Patientinnen eine Expression unterhalb und 26 eine Expression oberhalb des Medians auf. Auch hier zeigte die Gruppe *>Median* ein über den gesamten Zeitraum gleichmäßig besseres DFS als die Vergleichsgruppe (Log-Rank: $p=0,063$) (Abb. 46).

Im *cyt*-GGSK-1/30-Kollektiv wurde TA-MUC1 in 11 Fällen unterhalb und in 17 Fällen oberhalb des Medians exprimiert. Die Gruppe *>Median* zeigte zum Ende des Beobachtungszeitraums ein besseres DFS. Es zeigte sich keine gleichmäßige Überlegenheit im Kurvenverlauf (Abb. 47).

Im *cm*-GGSK-1/30-Kollektiv (n=169) zeigte sich in 71 Tumorschnitten eine Expression unterhalb und in 98 Fällen eine Expression oberhalb des Medians. Bis zu einem Beobachtungszeitraum von 100 Monaten hatte die Gruppe *>Median* ein besseres DFS. Im Verlauf zeigte sich keine gleichmäßige Überlegenheit in der Überlebenszeit (Abb. 48).

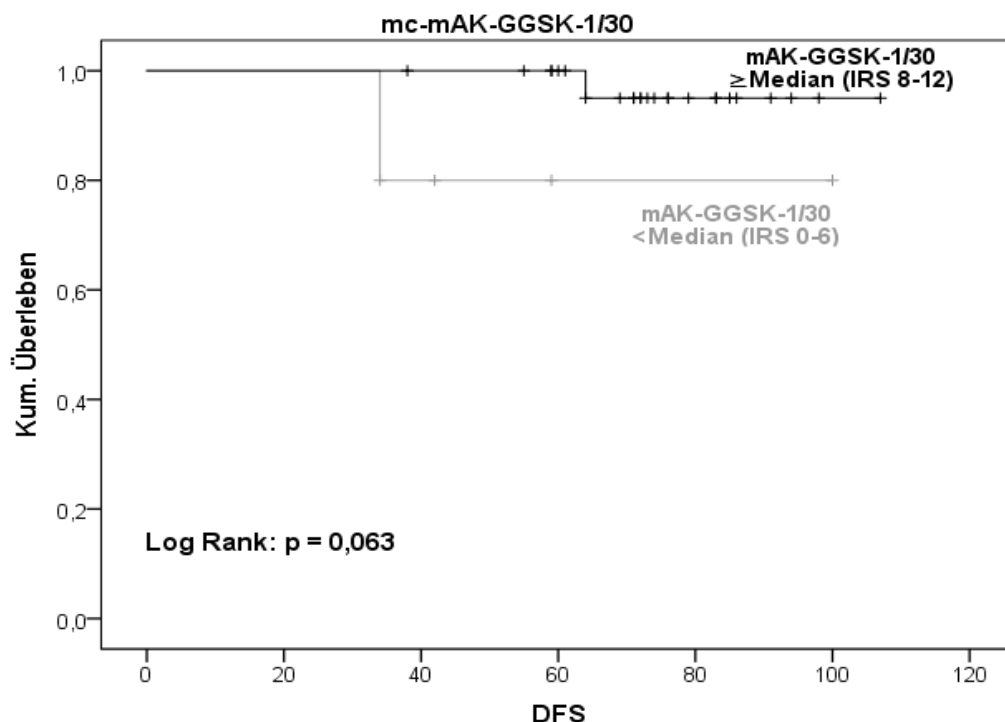


Abbildung 46: Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (*mc*-Kollektiv)

4. Ergebnisse

Im mc-Kollektiv zeigte sich für Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians ein gleichmäßig besseres DFS.

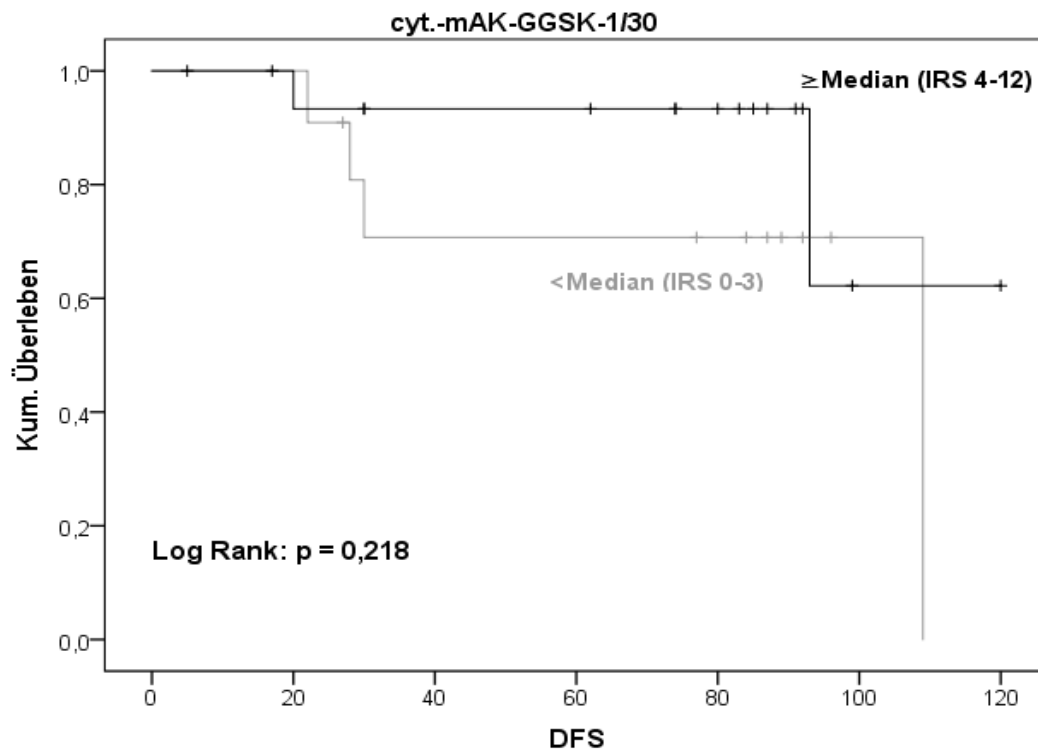


Abbildung 47: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cyt-Kollektiv)

Im zytoplasmatischen Kollektiv zeigte sich keine gleichmäßige Überlegenheit in Bezug auf das DFS.

4. Ergebnisse

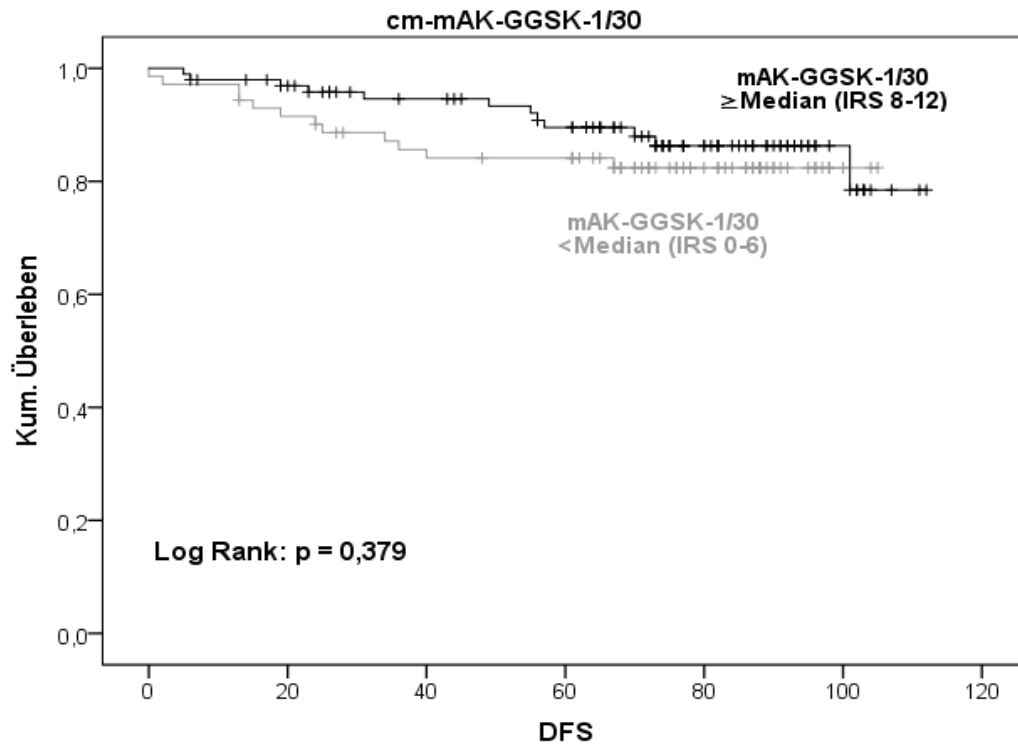


Abbildung 48: Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 (cm-Kollektiv)

Im cm- Kollektiv zeigte sich keine gleichmäßige Überlegenheit in Bezug auf das DFS.

Einfluss der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 auf das DFS von Brustkrebspatientinnen

28 Patientinnen wiesen ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe auf. Die Vergleichsgruppe der übrigen Patientinnen bestand aus 206 Fällen. Patientinnen mit einer zytoplasmatischen Lokalisation zeigten ein gleichmäßig schlechteres DFS als die Vergleichsgruppe (Abb. 49). Der Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war statistisch nicht signifikant. In den Regressionsanalysen zeigte sich ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster ohne Einfluss auf das DFS. Ein positiver Lymphknoten-Befall war mit einem signifikant erhöhten Risiko für Fernmetastasen und/oder Rezidiv assoziiert.

4. Ergebnisse

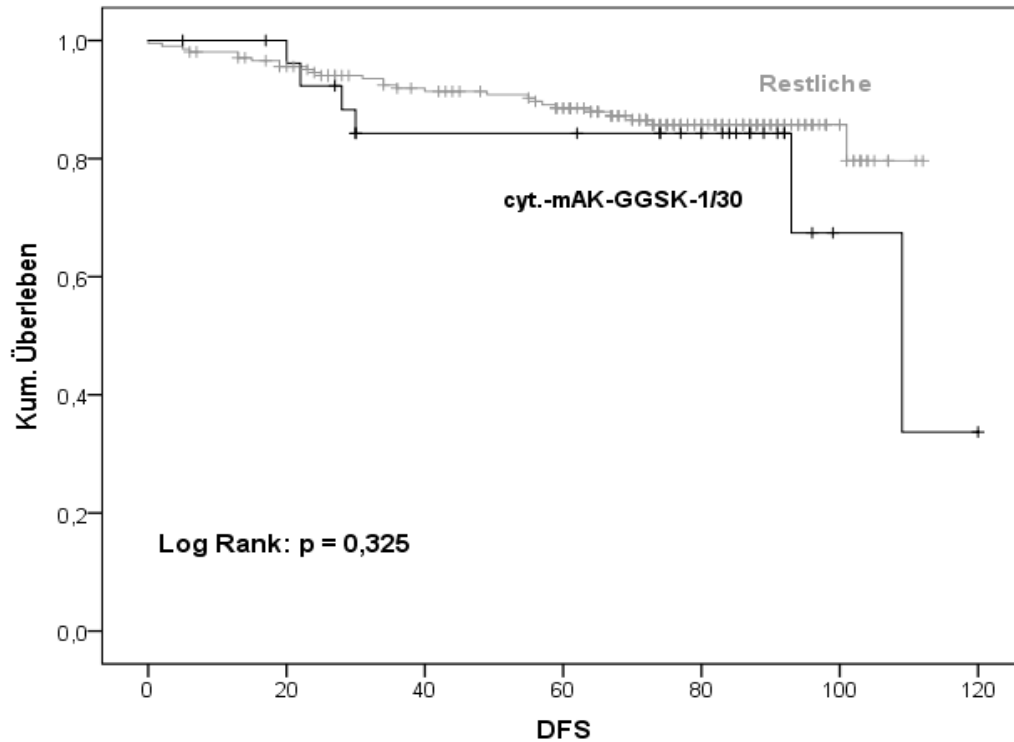


Abbildung 49: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der subzellulären-Expression (cyt. vs. Restliche)

Die cyt-TA-MUC1-Gruppe zeigte ein gleichmäßig schlechteres DFS über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Tabelle 21: Multivariate Cox-Regression: Einfluss des subzellulären Expressionsmusters auf das DFS (cyt. vs. Restliche)

Variable	[HR Exp (B)]	95%-KI		p-Wert
		untere	obere	
Alter (<55 vs. ≥55 Jahre)				ns
Histologie (kein NST vs. NST)				ns
Grading (G1-G2 vs. G3)				ns
pT (pT1 vs. pT2 – pT3)	2,20	0,95	5,09	0,064
pN (pN0 vs. pN1 – pN3)	2,25	1,07	4,73	0,033
CIS (nein vs. Ja)				ns
ER (neg. vs. pos.)				ns

4. Ergebnisse

PR (neg. vs. pos.)	ns
Her2 (neg. vs. pos.)	ns
GGSK-1/30 (Restliche vs. cyt)	ns

31 Patientinnen wiesen ein überwiegend membranständiges Verteilungsmuster auf. Die Vergleichsgruppe bestand aus 203 Fällen. Patientinnen mit einer *mc*-TA-MUC1-Expression zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum ein gleichmäßig besseres DFS als die Vergleichsgruppe (Log-Rank: $p=0,210$) (Abb. 50). In den Regressionsanalysen zeigte sich ein überwiegend membranständiges Verteilungsmuster ohne Einfluss auf das DFS (Tabelle 22)

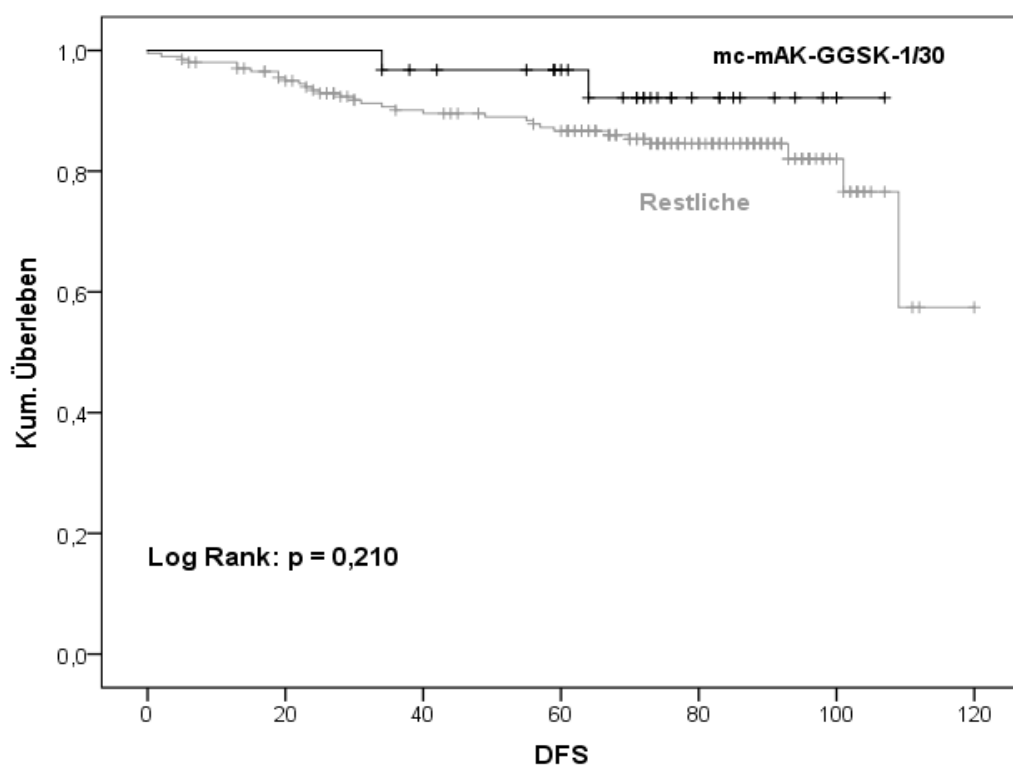


Abbildung 50: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der subzellulären Expression (*mc* vs. *Restliche*)

Die *mc*-TA-MUC1-Gruppe zeigte ein gleichmäßig besseres DFS über den gesamten Beobachtungszeitraum.

4. Ergebnisse

Tabelle 22: Multivariate-Cox-Regression: Einfluss des subzellulären Expressionsmusters auf das DFS (mc vs. Restliche)

Variable	[HR Exp (B)]	95%-KI		p-Wert
		untere	obere	
Alter (< 55 vs. ≥ 55 Jahre)				ns
Histologie (kein nst vs. Nst)				ns
Grading (G1-G2 vs. G3)				ns
pT (pT1 vs. pT2 – pT3)	2,29	0,99	5,32	0,054
pN (pN0 vs. pN1 – pN3)	1,93	0,90	4,15	0,090
CIS (nein vs. ja)				ns
ER (neg. vs. pos.)				ns
PR (neg. vs. pos.)				ns
Her2 (neg. vs. pos.)	2,60	1,08	6,22	0,032
GGSK-1/30 (Restliche vs. mc)	0,17	0,02	1,30	0,089

169 Patientinnen wiesen ein überwiegendes zytoplasmatisches Verteilungsmuster im Tumorgewebe auf (*cm*). Die Vergleichsgruppe bestand aus 65 Patientinnen. Im Verlauf der Überlebenszeitkurven zeigte sich hinsichtlich des DFS keine Überlegenheit für eine der beiden Gruppen (*Abb. 51*). Eine multivariate Cox-Regressionsanalyse wurde nicht durchgeführt.

4. Ergebnisse

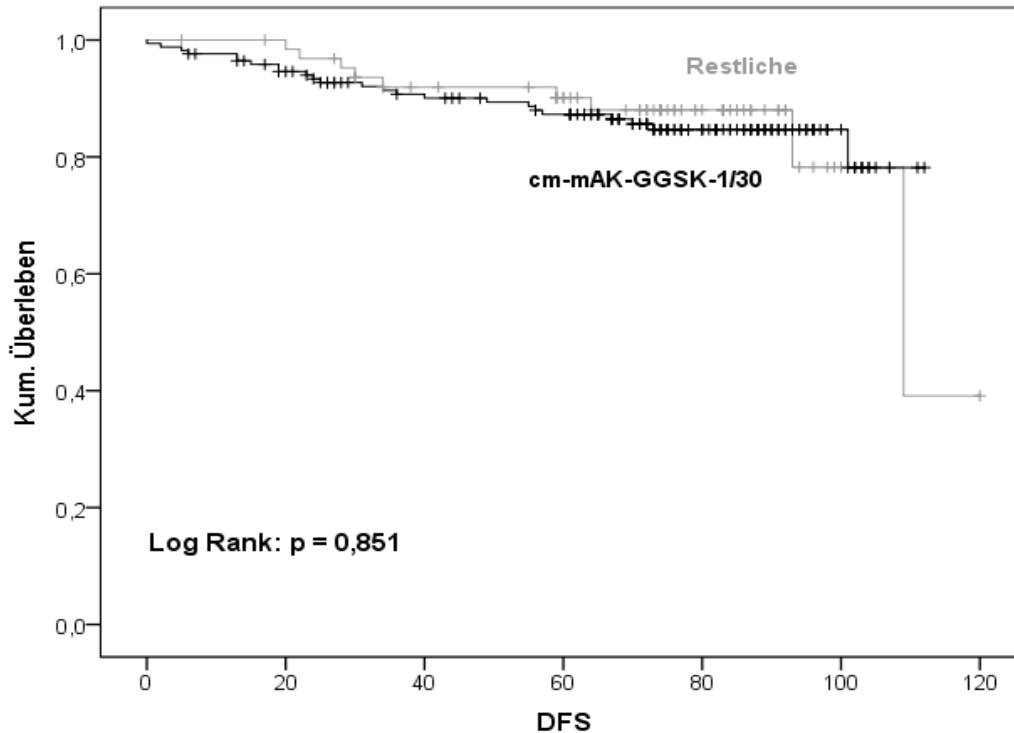


Abbildung 51: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der subzellulären Expression (cm vs. Restliche)

Es zeigte sich keine gleichmäßige Überlegenheit im Verlauf der Überlebenszeitkurven.

4.6 Betrachtung der TA-MUC1-Expression im triple negativen Mammakarzinom

In dieser Arbeit erfolgte eine separate Auswertung hinsichtlich der TA-MUC1-Expression im triple-negativen-Mammakarzinom. Mittels Korrelationsanalysen wurden die signifikanten Zusammenhänge zwischen der TA-MUC1-Expression und den histopathologischen Tumormerkmalen ermittelt und die prognostische Bedeutung von TA-MUC1 für das TNBC-Kollektiv untersucht.

Patientenbezogene Daten des TNBC-Kollektivs

Innerhalb des Gesamtkollektivs (n=237) lag der Anteil an TNBC-Tumoren bei 17,7% (n=42). Für annähernd alle TNBC-Patientinnen konnten Tumordaten und Informationen zum klinischen Verlauf erhoben werden (n=41/42; Follow-Up-Rate: 97,6%). Der mittlere Follow-Up-Zeitraum betrug 6,3 Jahre (95%-KI: 5,1-7,2 Jahre). Im Beobachtungszeitraum wurden 8 Todesfälle im TNBC-Kollektiv dokumentiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate (JÜR) lag bei

4. Ergebnisse

82,9% (Vgl. 5-JÜR d. Gesamtkollektivs: 92,3%). Die 10-JÜR betrug 80,5% (Vgl. Gesamtkollektiv: 92,3%) (Tabelle 23).

Tabelle 23: Follow-Up (TNBC-Kollektiv): Patientenbezogene-Daten

*ED: Erstdiagnose; GÜLR: Gesamtüberlebensrate; MFÜLR: Metastasenfreieüberlebensrate; DFÜLR: Krankheitsfreieüberlebensrate; *: nicht bestimmbar.*

		Häufigkeit (n)	Anteil (%)
Patientenstatus	lebt	33	78,6%
	verstorben	8	19%
	lost-to-follow-Up	1	2,4%
	Rate	$M \pm SD$ (Jahre)	95 % - KI
Alter bei ED		61,0 (\pm 14,58)	52,0 – 69,0
Gesamtüberleben		* ²³	
5-Jahres-GÜLR	82,9%		
10-Jahres-GÜLR	80,5%		
MFS		*	
5-Jahres-MFÜLR	95,1%		
10-Jahres-MFÜLR	95,1%		
DFS		*	
5-Jahres-DFÜLR	87,8%		
10-Jahres-DFÜLR	85,4%		
Follow-Up-Zeitraum		6,3 (\pm 2,6)	5,1 – 7,2
Follow-Up-Rate	97,6%		

Tumorbezogene Daten des TNBC-Kollektivs

In Bezug auf die Tumorhistologie wies ein Großteil der TNBC-Tumoren ein invasives Karzinom ohne speziellen Typ (NST) auf (n=40; 95,2%). In 88,1% der Fälle lag ein G3-Stadium und in 11,9% der Tumoren ein G2-Stadium vor. In Bezug auf die Tumorgöße waren 31% der Tumoren als pT1-Stadium klassifiziert, in 61,9% lag ein pT2- und in 4,8% der Fälle ein pT3-Stadium vor. Viele TNBC-Tumoren wiesen bei Diagnosestellung einen negativen

²³ Die mediane Überlebenszeit ist nicht zu bestimmen. Bis zur maximalen Beobachtungszeit ist für weniger als die Hälfte der Patienten ein Ereignis eingetreten (Kaplan-Meier-Schätzer > 50 %)

4. Ergebnisse

Lymphknotenstatus auf (pN0 = 64,3%), 35,7% zeigten jedoch einen positiven Lymphknotenbefall (pN1: 21,4%; pN2: 9,5%; pN3: 4,8%). In 54,8% der Tumorschnitte ließen sich neben invasiven Karzinomanteilen auch Anteile eines *duktalen* oder *lobulären Carcinoma in situ* nachweisen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Follow-Up (TNBC-Kollektiv): Tumorbezogene-Daten

CIS: Carcinoma in situ; Pn1: Perineural-, V1: Blutgefäß-; L1: Lymphbahnen-Befall

		n	%
Histologie	NST	40	95,2%
	lobulär	2	4,8%
Lokalisation	unifokal	38	90,5%
	multifokal	4	9,5%
Grading	G1	0	
	G2	5	11,9%
	G3	37	88,1%
pT	pT1	13	31%
	pT2	26	61,9%
	pT3	3	7,1%
pN	pN0	27	64,3%
	pN1	9	21,4%
	pN2	4	9,5%
	pN3	2	4,8%
M	M0	38	90,5%
	Mx	4	9,5%
Weitere Klassifikation	L1 u./o. V1	14	33,3%
	Pn1	1	2,4%
Residual	R0	41	97,6%
	R1	1	2,4%
CIS		23	54,8%

Überleben und Prognose des TNBC-Kollektivs

Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurden 8 Todesfälle dokumentiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 82,9%. Die 10-Jahres-Überlebensrate betrug 80,5%. Mittels Log-Rank-Tests wurden die Überlebenszeitkurven verschiedener Gruppen innerhalb des TNBC-Kollektivs miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede in den Überlebenszeiten in Abhängigkeit von der Tumorhistologie (kein NST vs. NST) des T-Stadiums (T1 vs. T2/ T3), und des Auftreten von Fernmetastasen und/ oder Rezidiven (*Event* nein vs. ja) (Tabelle 25)

4. Ergebnisse

Tabelle 25: Follow-Up (TNBC-Kollektiv): Überleben- und Prognose-Daten

Variable	n	Überleben		p-Wert (Log Rank)
		5 Jahre	10 Jahre	
Gesamt	234	82,9	80,5	
Alter				0,061
≤55	17	94,1	—	
>55	24	75	70,8	
Histologie				0,002
kein NST	2	—	—	
NST	39	87,2	84,6	
Lokalisation				ns
unifokal	37	81,1	78,4	
multifokal	4	100	—	
T-Stadium				0,032
T1	13	100	—	
T2 + T3	28	75	—	
N-Stadium				ns
N0	27	85,2	81,5	
N1-N3	14	78,6	—	
Grading				ns
G1 + G2	5	80	—	
G3	36	83,3	80,6	
Risikoläsion				ns
nein	19	89,5	84,2	
ja	22	77,3	—	
Fernmetastase				<0,001
nein	39	87,2	84,6	
ja	2	—	—	
Rezidiv				ns
nein	37	83,8	83,8	
ja	4	50	—	
Event ²⁴				0,002
nein	35	88,6	88,6	
ja	6	50	—	

Gesamtexpression und subzelluläre Lokalisation von TA-MUC1 im TNBC

²⁴ Fernmetastase und/ oder Rezidiv im klinischen Verlauf

4. Ergebnisse

In 90,4% (n=38/42) der Tumoren des TNBC-Kollektivs zeigte sich eine eindeutig positive TA-MUC1-Expression (IRS >2). Der Median der TA-MUC1-Expression im TNBC lag bei einem IRS von 6. In 31% der TNBC-Tumoren zeigte sich eine TA-MUC1-Expression unterhalb des Medians (IRS 0-4), 69% wiesen eine Expression oberhalb des Medians auf (IRS 6-12) (Abb. 52).

Für alle TNBC-Schnitte wurde auch die subzelluläre Expression von TA-MUC1 im Tumorgewebe beurteilt. Hierbei ließen sich in 69,1% der Fälle eine gemischte, überwiegend zytoplasmatische TA-MUC1-Expression nachweisen (*cm*). In 11,9% der Tumorschnitte wurde TA-MUC1 gemischt, überwiegend membranständig exprimiert (*mc*). Eine rein zytoplasmatische Expression von TA-MUC1 (*c*) zeigte sich in 16,7% der Fälle. In keinem der untersuchten TNBC-Schnitte wurde TA-MUC1 rein membranständig exprimiert (*m*) (Abb. 53).

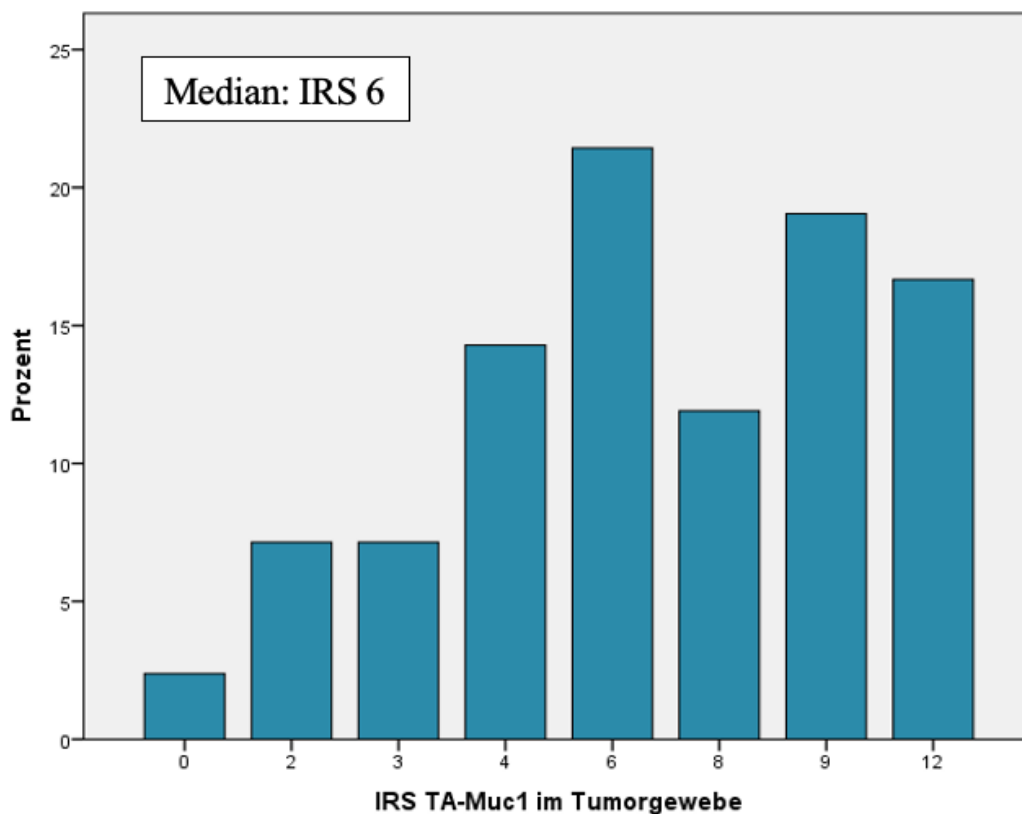


Abbildung 52: Verteilung der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe (TNBC).

Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung der IRS-Werte über das Kollektiv von TNBC-Patientinnen (n=42). Die mediane Gesamtexpression lag bei einem IRS von 6. Damit wurde TA-MUC1 im TNBC-Kollektiv weniger stark exprimiert als in Tumoren des Gesamtkollektivs (Median: IRS=8).

4. Ergebnisse

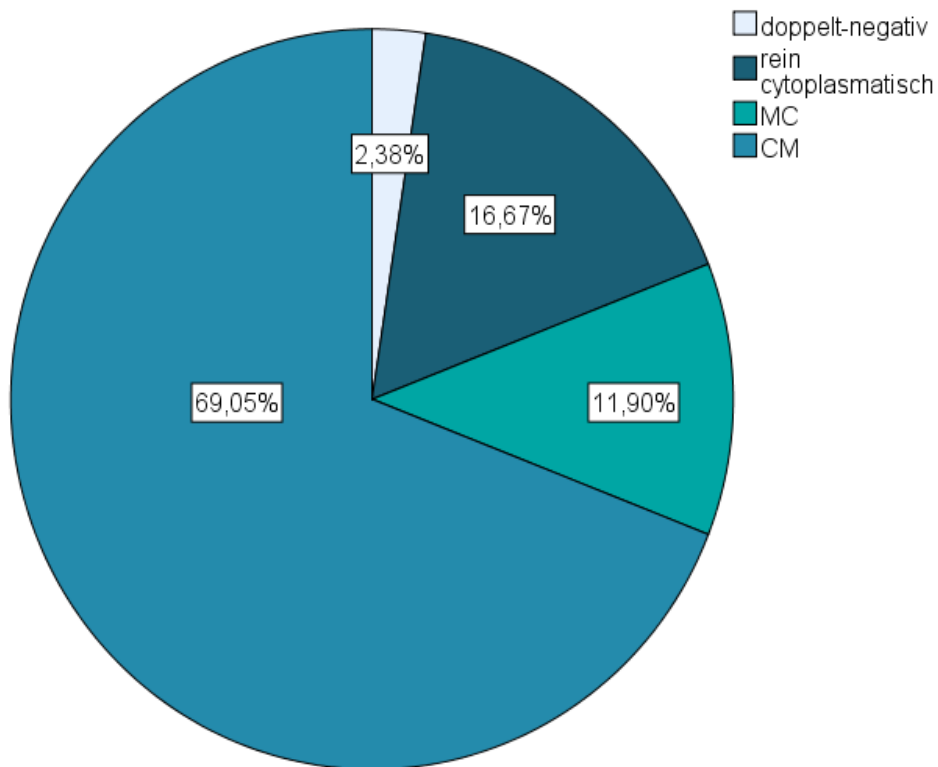


Abbildung 53: Verteilung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 (TNBC)

Im Kreisdiagramm ist die Verteilung der subzellulären-Expressionsmuster von TA-MUC1 dargestellt. Angegeben sind die prozentualen Anteile am TNBC-Kollektiv (n=237).

Gesamtexpression von TA-MUC1 im TNBC in Abhängigkeit der subzellulären-Lokalisation

In den Korrelationsanalysen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gesamtexpression und der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 (Kruskal-Wallis: $p=0,018$). TNBC-Tumoren mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster wiesen eine signifikant niedrigere Gesamtexpression im Tumorgewebe auf als Tumoren mit zytoplasmatisch-membranösen Verteilungsmuster (cm) (Paarweise-Vergleich: $p<0,046$) (Abb. 54). In Übereinstimmung hierzu wiesen Tumoren mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster bei Gegenüberstellung mit den übrigen Tumoren eine signifikant niedrigere Gesamtexpression auf (c vs. Restliche: $\text{Chi}^2 p=0,011$) (Abb. 55). Cm-TA-MUC1-Tumoren hingegen zeigten eine signifikant höhere Gesamtexpression im Tumorgewebe (cm vs. restliche: $\text{Chi}^2 p=0,018$) (Abb. 56).

4. Ergebnisse

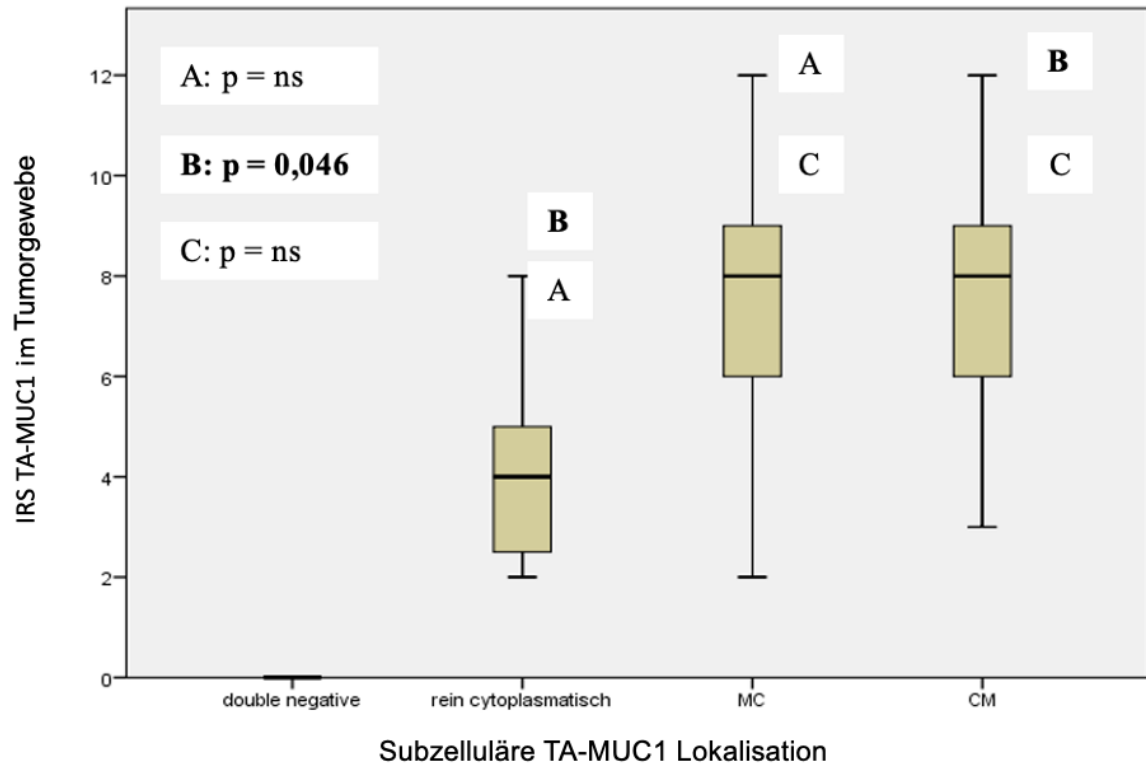


Abbildung 54: Verteilung der TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters (TNBC)

Dargestellt ist die Verteilung der Gesamtexpression von TA-MUC1 über die verschiedenen subzellulären Lokalisationen. TNBC-Patientinnen mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster wiesen eine signifikant schwächere Gesamtexpression auf als Patientinnen mit cm-Verteilungsmuster.

4. Ergebnisse

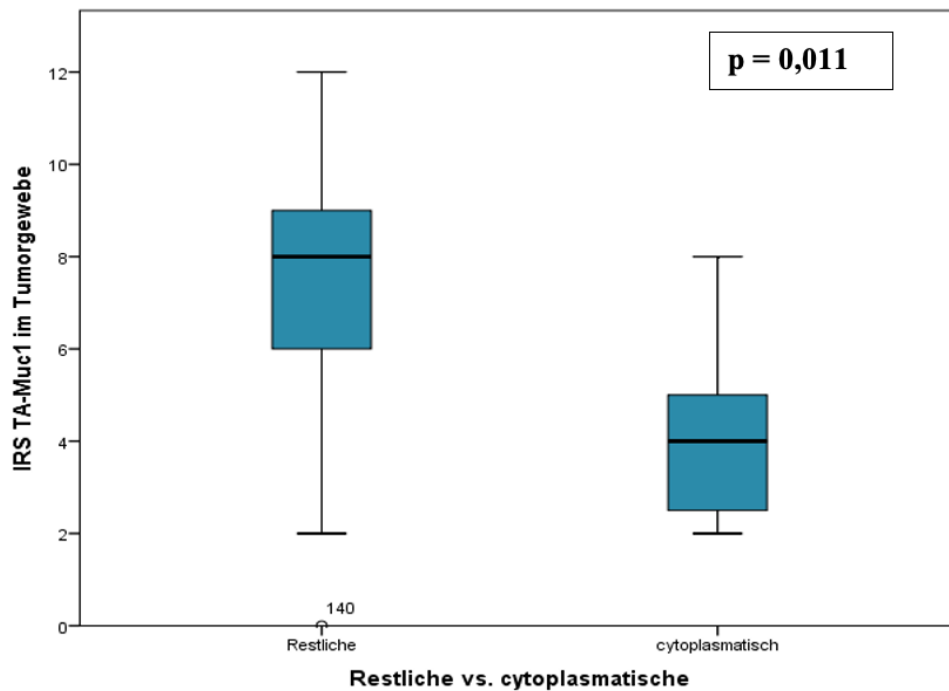
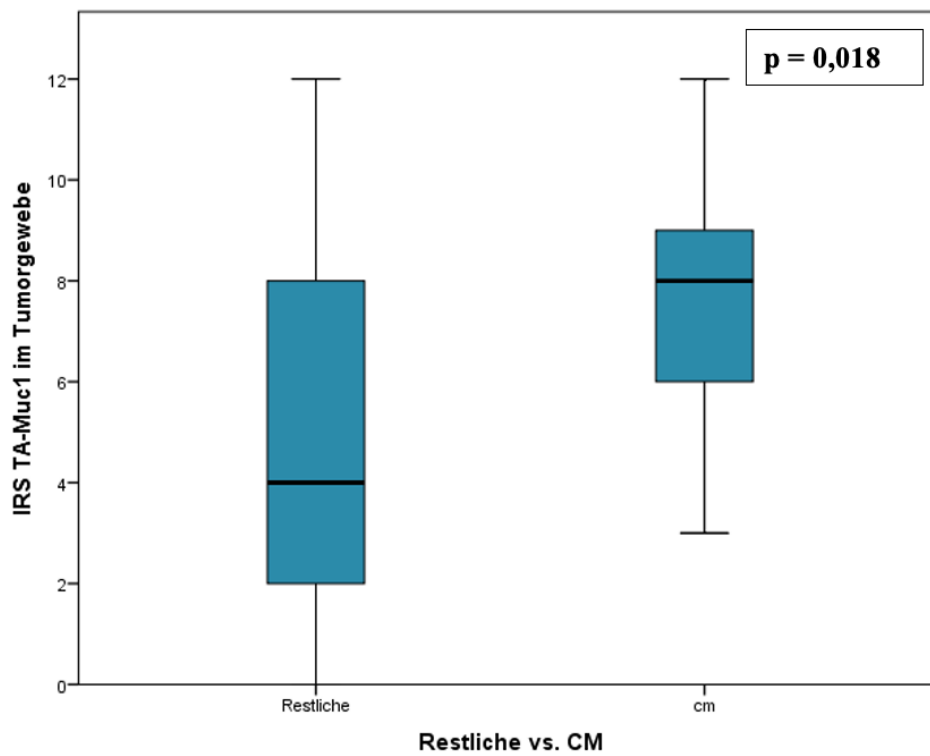


Abbildung 55: Vergleich der TA-MUC1-Expression; zytoplasmatisch vs. Restliche (TNBC)
Patientinnen mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster zeigten bei Gegenüberstellung mit den übrigen Fällen eine signifikant schwächere Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe.



4. Ergebnisse

Abbildung 56: Vergleich der TA-MUC1-Expression; *cm* vs. Restliche (TNBC)

Patientinnen mit überwiegend zytoplasmatischen Verteilungsmuster (*cm*) zeigten bei Gegenüberstellung mit den übrigen Fällen eine signifikant höhere Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe.

Zusammenhang zwischen dem subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1 und Risikoläsionen im TNBC

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 und dem Vorliegen einer Risikoläsion (DCIS oder LIN) im Tumor. Tumoren mit überwiegend membranständigen Verteilungsmuster wiesen signifikant häufiger Risikoläsionen im Tumorgewebe auf als Tumoren der Vergleichsgruppe (*mc* vs. *restliche*: χ^2 : $p=0,03$; ϕ_v : 0,334) (Abb. 57).

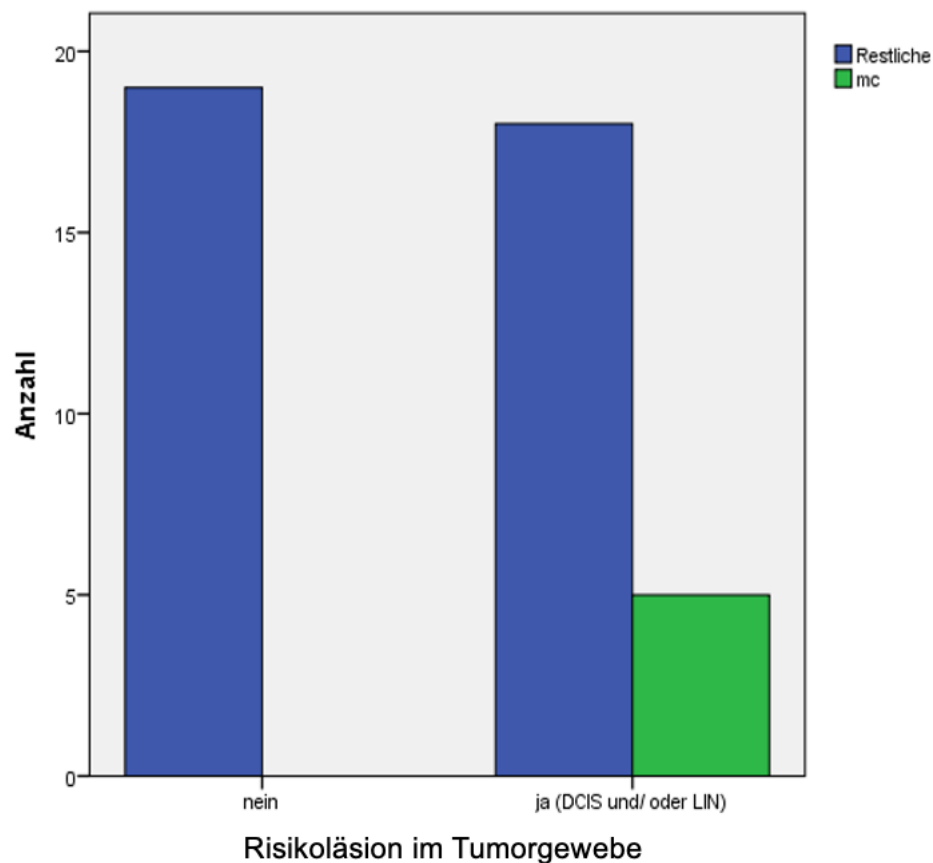


Abbildung 57: Verteilung von Risikoläsionen im Tumorschnitt; Vergleich *mc* vs. *restliche* (TNBC)

4. Ergebnisse

Dargestellt ist die Verteilung des überwiegend membranständigen Verteilungsmusters von TA-MUC1 in Abhängigkeit einer Risikoläsion im Tumor. Tumoren mit einer zusätzlichen Risikoläsion im Tumor zeigten häufiger eine überwiegend membranständige TA-MUC1-Lokalisation als die Vergleichsgruppe.

Einfluss der TA-MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben von TNBC-Patientinnen

Im TNBC-Kollektiv wiesen 21 Patientinnen (51%) eine TA-MUC1-Expression unterhalb des Medians (IRS 0-6) und 20 Patientinnen (49%) eine Expression oberhalb des Medians auf (IRS 8-12). Die 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate (JÜR) für die Gruppe <Median lag bei 76%. Für die Gruppe \geq Median lag die 3-JÜR bei 95% und die 5-JÜR bei 90%, die 10-JÜR konnte nicht bestimmt werden. Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum ein gleichmäßig besseres Gesamtüberleben als die Vergleichsgruppe (Abb. 58). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Log-Rank-Test: $p=0,453$). In der multivariaten Cox-Analyse ergab sich für die Gesamtexpression von TA-MUC1 kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben.

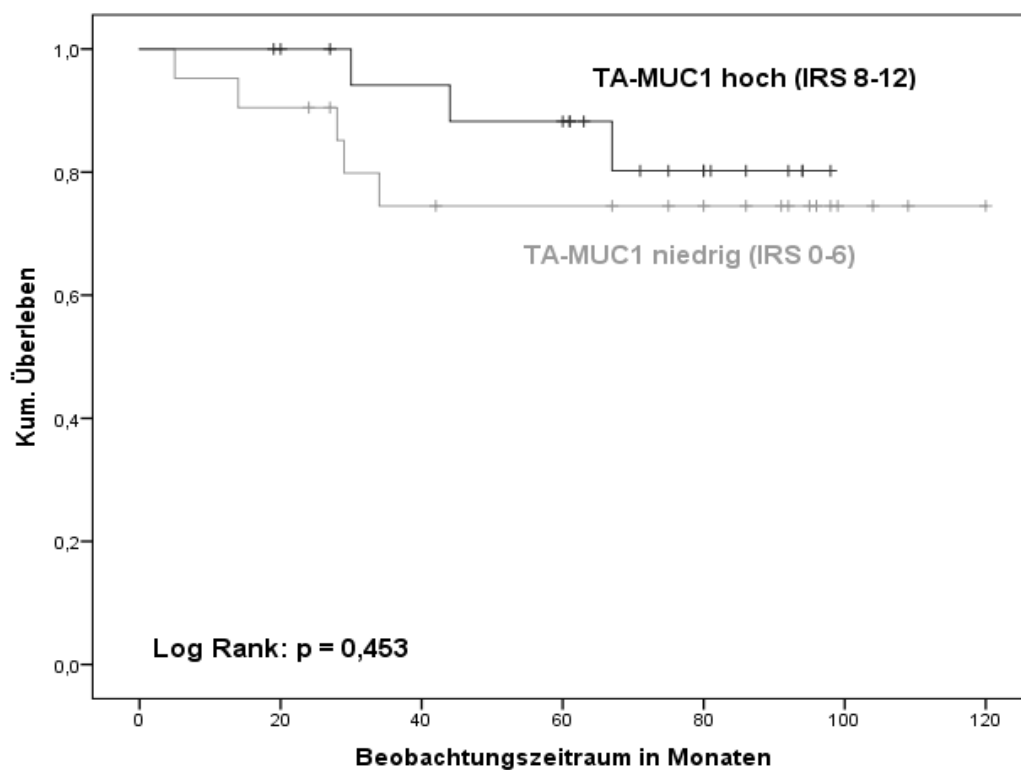


Abbildung 58: Vergleich der Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression (TNBC)

4. Ergebnisse

Dargestellt ist der Verlauf der Überlebenszeitkurven von TNBC-Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb und unterhalb des Medians. Patientinnen mit einer Expression oberhalb des Medians zeigten ein gleichmäßig besseres Gesamtüberleben über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Einfluss des subzellulären Verteilungsmusters auf das Gesamtüberleben von TNBC-Patientinnen

Neben einer Betrachtung der Gesamtexpression wurde zudem der Einfluss des subzellulären Verteilungsmusters von TA-MUC1 auf das Gesamtüberleben im TNBC-Kollektiv untersucht. Patientinnen mit zytoplasmatischer Expression wiesen im Vergleich mit den übrigen Verteilungsmustern die kürzeste Überlebenszeit auf (*Abb. 59*).

Im zweiten Schritt wurden die Überlebenszeiten der Patientinnen einzelner subzellulärer Gruppen mit den Überlebenszeiten der Vergleichsgruppen gegenübergestellt (*c vs. restliche, mc vs. restliche, cm vs. restliche*). Im TNBC-Kollektiv wiesen 7 Patientinnen ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf, die Vergleichsgruppe bestand aus 34 Fällen. Die 3-, 5- und 10-JÜR für die cyt-TA-MUC1-Gruppe lag bei 71%. Für die Vergleichsgruppe lag die 3-JÜR bei 88% und die 5-JÜR bei 85%, die 10-JÜR konnte hier nicht bestimmt werden (Tabelle 26). Patientinnen mit einem zytoplasmatischen Expressionsmuster wiesen ein gleichmäßig schlechteres Gesamtüberleben auf als die Vergleichsgruppe. Der Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven war statistisch nicht signifikant (Log-Rank: $p=0,435$) (*Abb. 60*).

Beim Vergleich der anderen subzellulären Gruppen (*mc vs. restliche und cm vs. restliche*) zeigten sich keine gleichmäßige Überlegenheit für eine der beiden Gruppen (*Abb. 61*). In den multivariaten Cox-Analysen konnte für keine der subzellulären Gruppen ein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

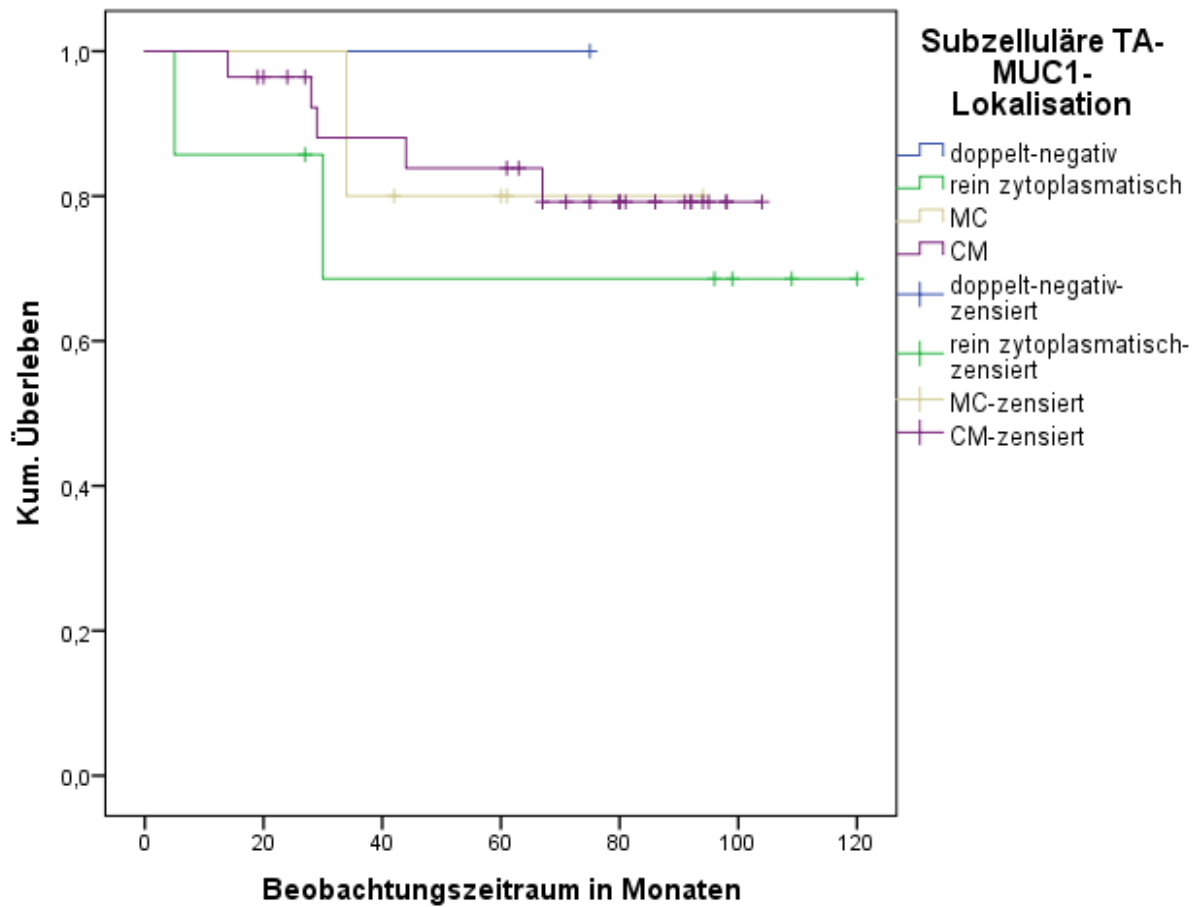


Abbildung 59: Vergleich der Überlebenszeitkurven in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters (TNBC)

Dargestellt ist der Verlauf der Überlebenszeitkurven für Patientinnen mit unterschiedlichem subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1. Hierbei wiesen Patientinnen mit einer rein zytoplasmatischen Expression das schlechteste Gesamtüberleben auf.

4. Ergebnisse

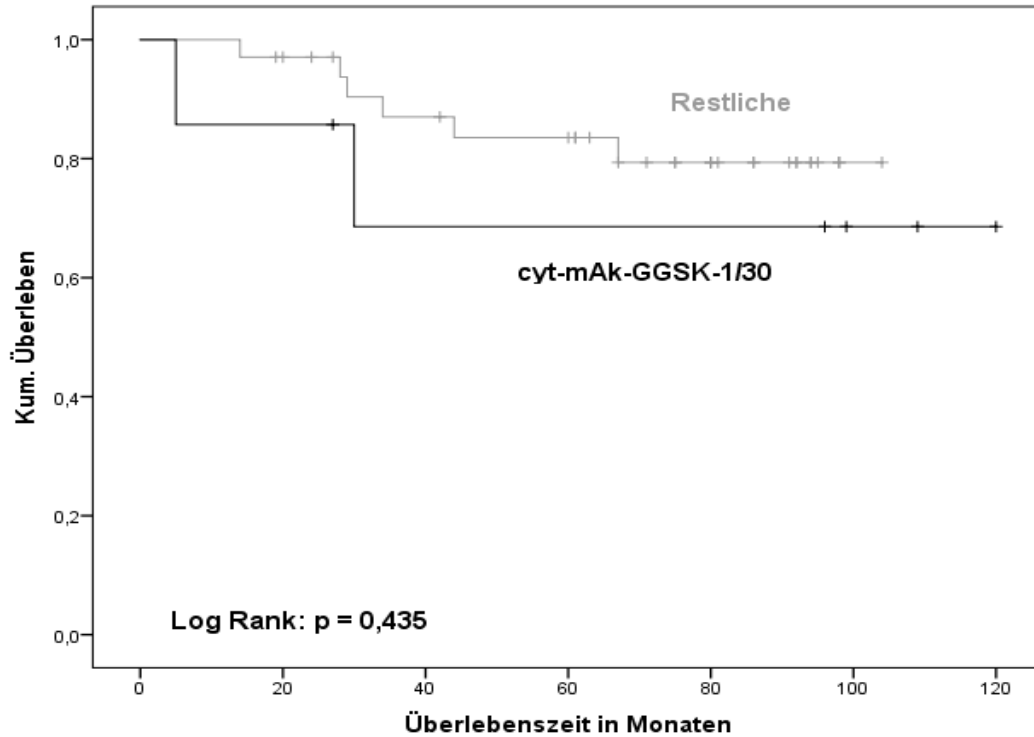


Abbildung 60: Vergleich der Überlebenszeitkurven; zytoplasmatisch vs. restliche (TNBC) TNBC-Patientinnen mit einem zytoplasmatischen Verteilungsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe zeigten ein über den gesamten Beobachtungszeitraum schlechteres Gesamtüberleben als die Vergleichsgruppe.

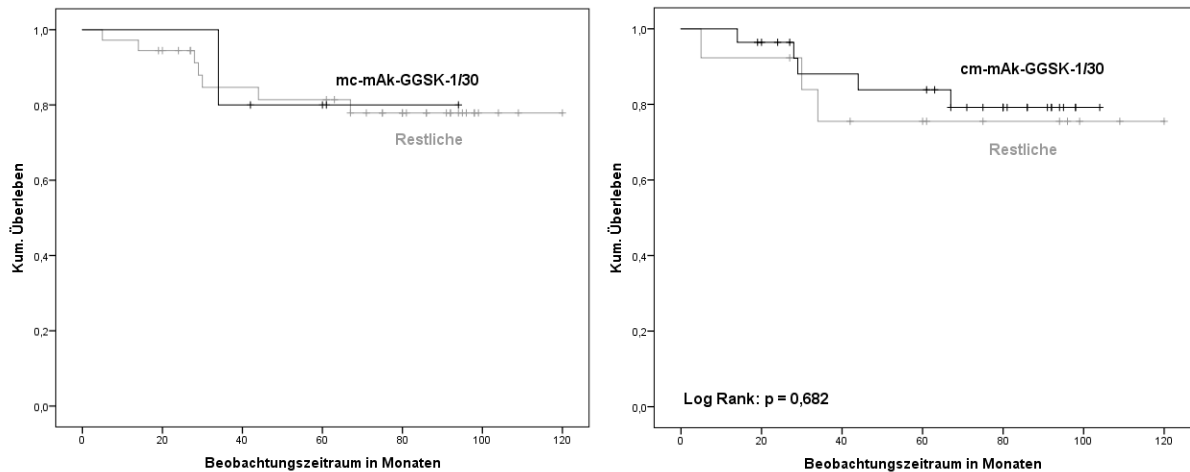


Abbildung 61: Vergleich der Überlebenszeitkurven; li.: mc vs. Restlich; re.: cm vs. restliche (TNBC)

Verlauf der Überlebenszeitkurven von TNBC-Patientinnen mit überwiegend membranständigen (links) und überwiegend zytoplasmatischen Verteilungsmuster (rechts). Für keine der beiden Gruppen zeigte sich ein gleichmäßiger Unterschied in den Überlebenszeiten.

4. Ergebnisse

Tabelle 26: Vergleich der Überlebensraten in Abhängigkeit der subzellulären TA-MUC1-Expression (TNBC)

Variable	n	Überlebensrate (%)		
		3-JÜR	5-JÜR	10-JÜR
mAK-GGSK-1/30				
< Median	21	76	76	76
≥ Median	20	95	90	—
subzelluläre-Lokalisation				
cyt-GGSK-1/30	7	71	71	71
Restliche	34	88	85	—
subzelluläre-Lokalisation				
mc-GGSK-1/30	5	80	80	—
Restliche	36	86	83	81
subzelluläre-Lokalisation				
cm-GGSK-1/30	28	89	86	—
Restliche	13	77	77	77

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das metastasenfreie Überleben (MFS) von TNBC-Patientinnen

In Bezug auf das metastasenfreie Überleben zeigte sich in Abhängigkeit der Gesamtexpression von TA-MUC1 kein Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven von TNBC-Patientinnen (Abb. 62).

4. Ergebnisse

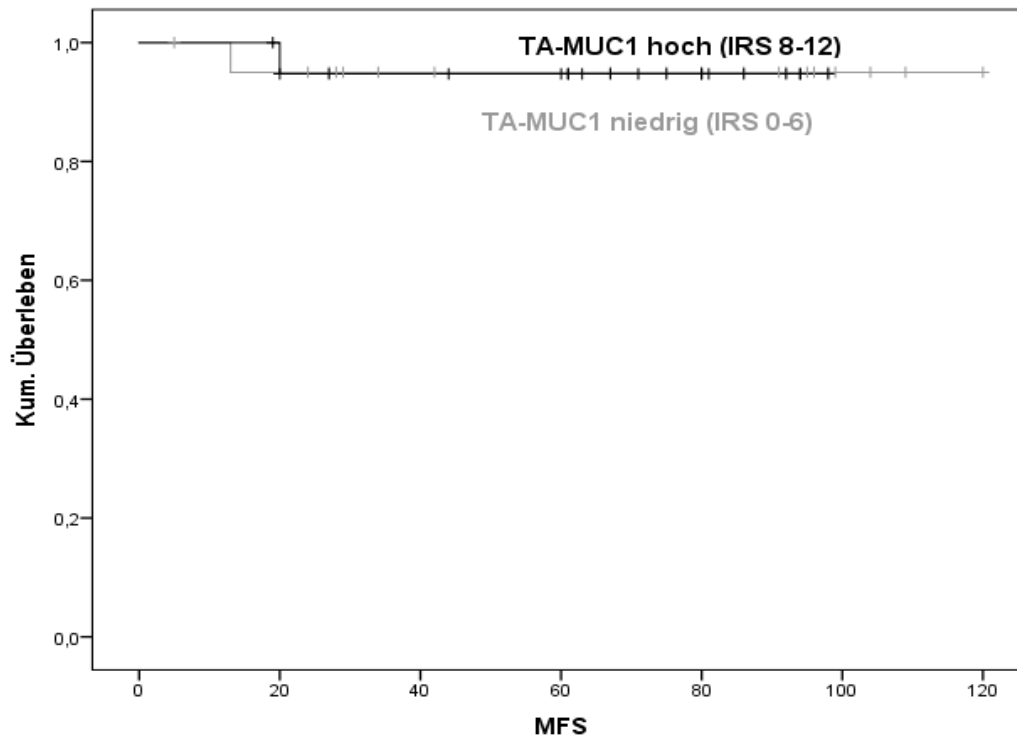


Abbildung 62: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Anhängigkeit der TA-MUC1-Expression (TNBC)

Hinsichtlich des MFS zeigte sich im Verlauf der Überlebenszeitkurven von TNBC-Patientinnen mit einer Expression oberhalb und unterhalb des Medians keine Überlegenheit für eine der beiden Gruppen.

Einfluss des subzellulären Verteilungsmusters von TA-MUC1 auf das MFS von TNBC-Patientinnen

In Bezug auf das MFS wiesen Patientinnen mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster einen schlechteren Verlauf in den Überlebenszeitkurven auf als Patientinnen der Vergleichsgruppe (Abb. 63). Auch bei Gegenüberstellung mit den übrigen Fällen (*cyt vs. Restliche*) zeigten Patientinnen mit zytoplasmatischen Verteilungsmuster ein gleichmäßig schlechteres MFS über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 64). Die Gruppe der *mc*-TA-MUC1-Patientinnen (*mc vs. restliche*) wies im Unterschied zur Vergleichsgruppe hingegen einen gleichmäßig überlegenen Verlauf in den Überlebenszeitkurven auf (Abb. 65). Bei Gegenüberstellung der *cm*-TA-MUC1-Gruppe mit den übrigen Fällen zeigte sich im Verlauf der Überlebenszeitkurven keine gleichmäßige Überlegenheit für eine der beiden Gruppen.

4. Ergebnisse

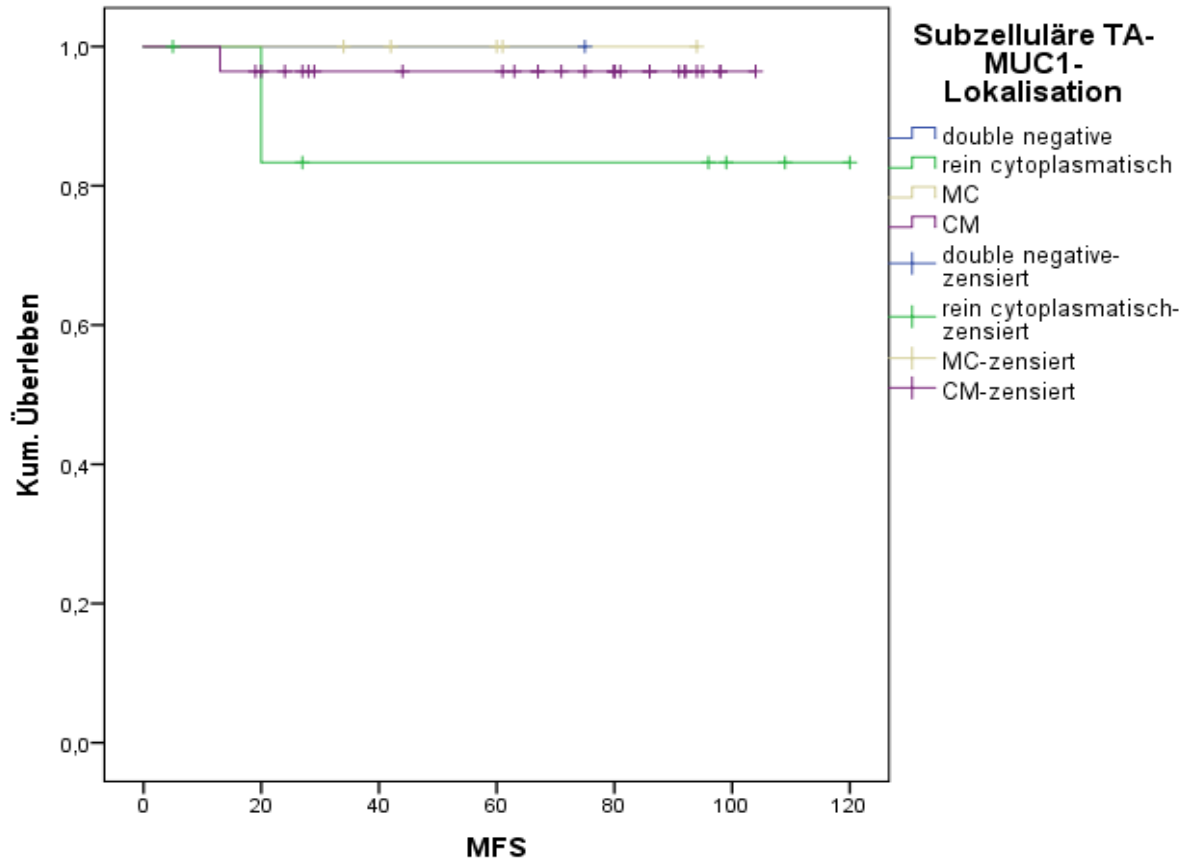


Abbildung 63: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS) in Abhängigkeit des subzellulären Expressionsmusters (TNBC)

Dargestellt ist der Verlauf der Überlebenszeitkurven für Patientinnen mit unterschiedlichem subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1. Hierbei wiesen Patientinnen mit rein zytoplasmatischer Lokalisation das schlechteste MFS auf.

4. Ergebnisse

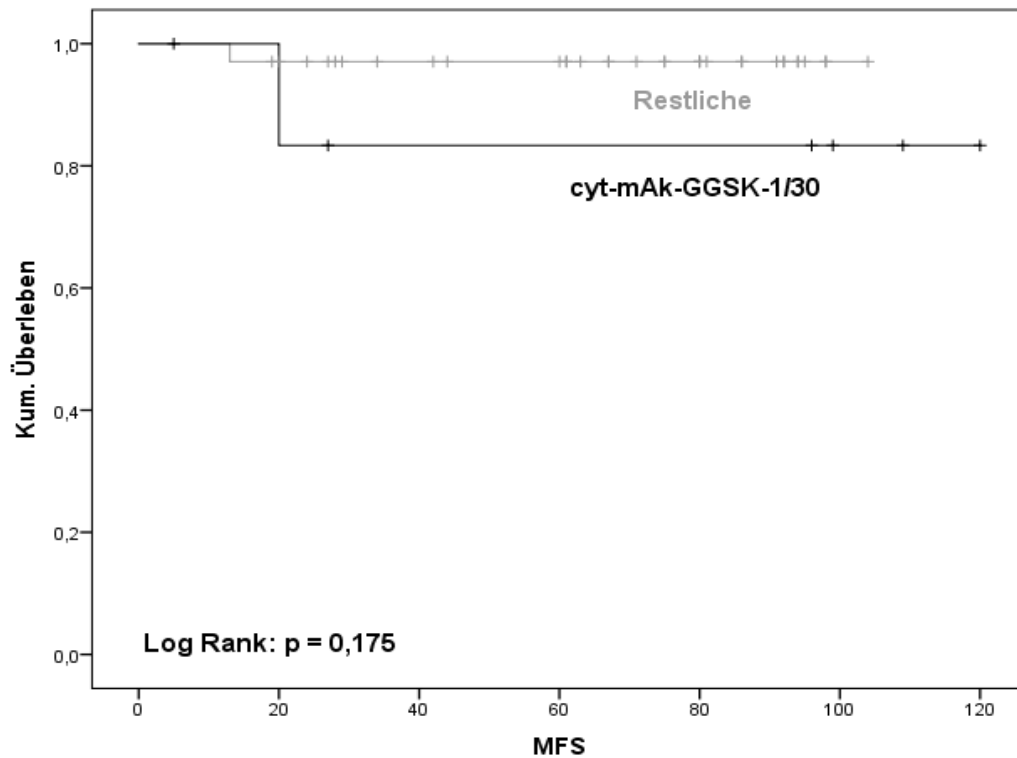


Abbildung 64: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS); zytoplasmatisch vs. Restliche (TNBC)

TNBC-Patientinnen mit einem zytoplasmatischen Verteilungsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe zeigten ein über den gesamten Beobachtungszeitraum schlechteres MFS als die Vergleichsgruppe.

4. Ergebnisse

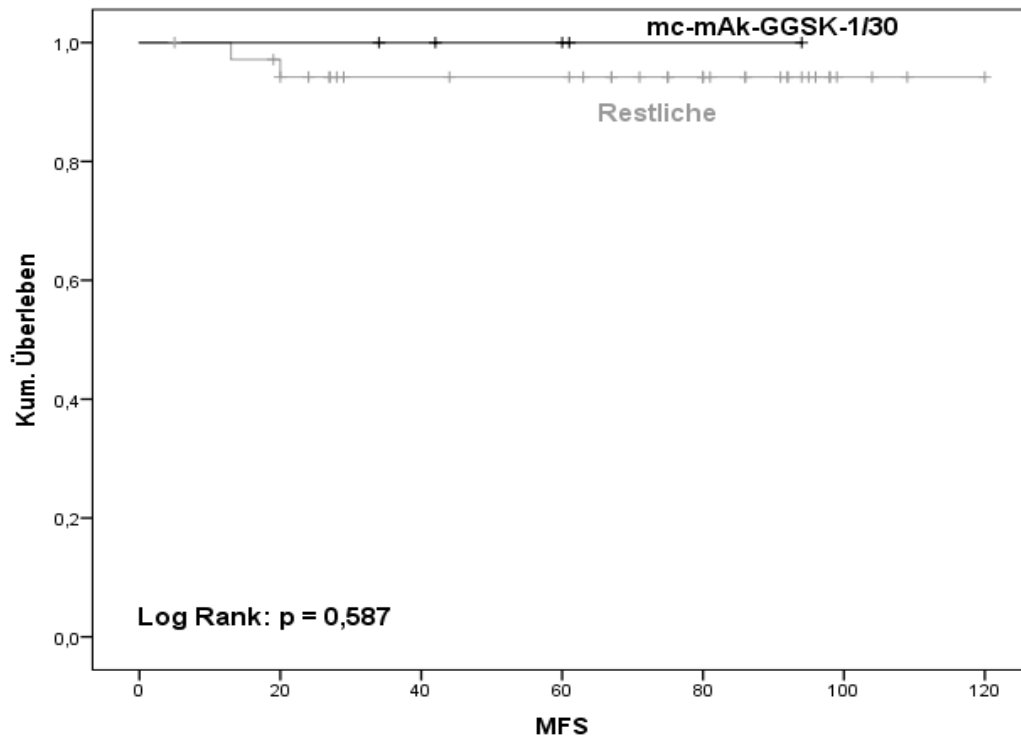


Abbildung 65: Vergleich der Überlebenszeitkurven (MFS); mc vs. Restliche (TNBC)

TNBC-Patientinnen mit einem überwiegend membranständigen Verteilungsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe zeigten ein über den gesamten Beobachtungszeitraum besseres MFS als die Vergleichsgruppe.

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf das krankheitsfreie Überleben von TNBC-Patientinnen

In Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) wiesen Patientinnen mit einer TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians einen tendenziell besseren Verlauf in den Überlebenszeitkurven auf (Abb. 66).

4. Ergebnisse

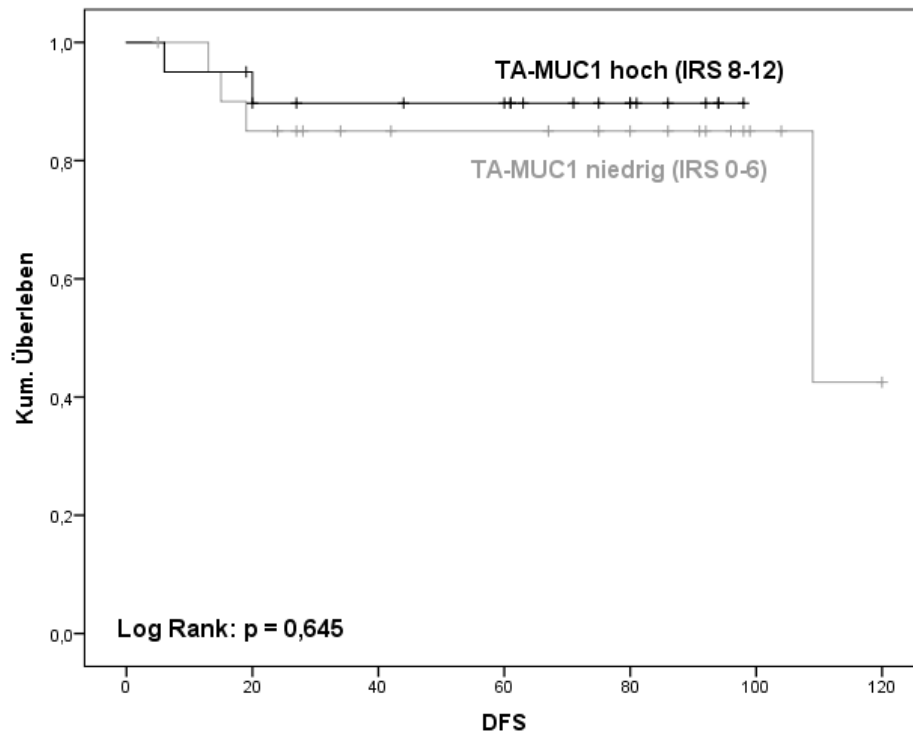


Abbildung 66: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS) in Abhängigkeit der TA-MUC1-Expression (TNBC)

TNBC-Patientinnen mit einer Gesamtexpression oberhalb des Medians wiesen ein tendenziell besseres DFS auf als Patientinnen der Vergleichsgruppe.

Einfluss des subzellulären Verteilungsmuster von TA-MUC1 auf das DFS von TNBC-Patientinnen

In Bezug auf das DFS wiesen Patientinnen mit einem überwiegend membranständigen Verteilungsmuster ein gleichmäßig besseres DFS auf als die Vergleichsgruppe (Abb. 67). Patientinnen mit einem überwiegend zytoplasmatischen Verteilungsmuster zeigten hingegen ein gleichmäßig schlechteres DFS (Abb. 68).

4. Ergebnisse

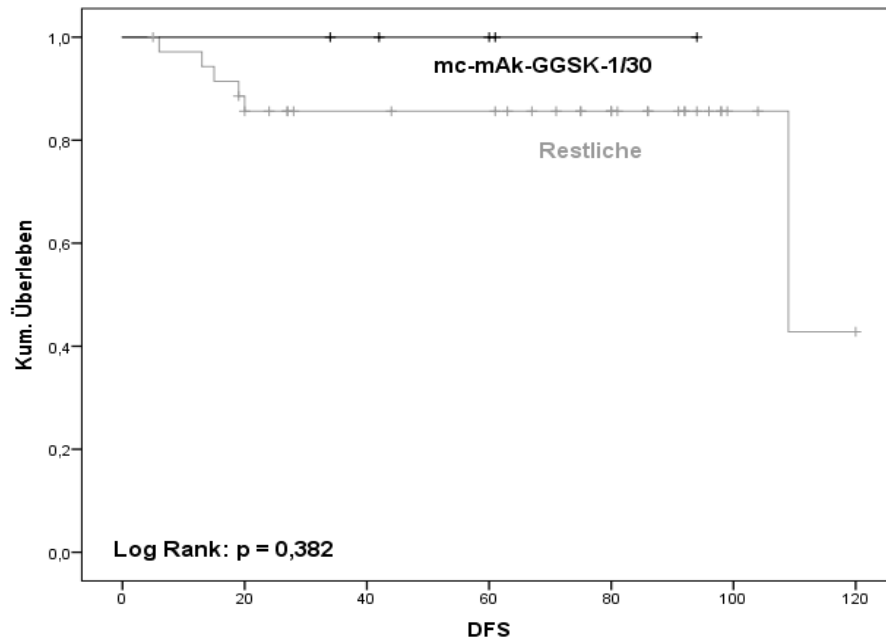


Abbildung 67: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS); mc vs. Restliche (TNBC)
TNBC-Patientinnen mit einem überwiegend membranständigen Verteilungsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe zeigten ein über den gesamten Beobachtungszeitraum tendenziell besseres DFS als die Vergleichsgruppe, auch wenn dieser Effekt das statistische Signifikanzniveau nicht erreichte.

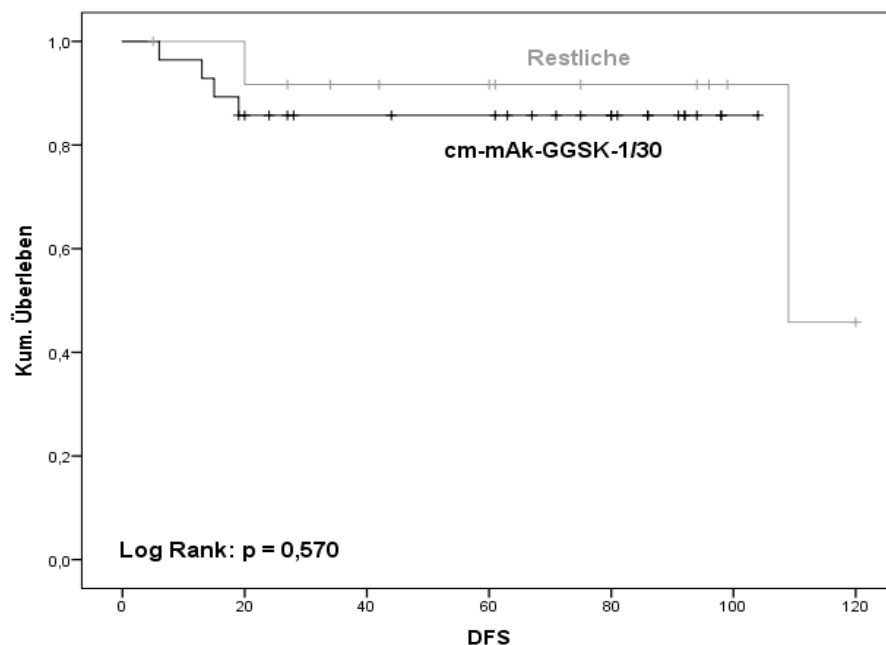


Abbildung 68: Vergleich der Überlebenszeitkurven (DFS); cm vs. Restliche (TNBC)

4. Ergebnisse

TNBC-Patientinnen mit einem überwiegend zytoplasmatischen Verteilungsmuster von TAMUC1 im Tumorgewebe (cm) zeigten ein über den gesamten Beobachtungszeitraum schlechteres DFS als die Vergleichsgruppe.

5. Diskussion

5.1 TA-MUC1 ist ein tumorspezifischer und sensitiver Marker im Mammakarzinom

In einem immunhistochemischen Nachweisverfahren mittels des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30 wurde die Expression von TA-MUC1 im invasiven Tumorgewebe von 237 Brustkrebspatientinnen untersucht. In 92,4% der Tumorschnitte konnte eine eindeutig positive TA-MUC1-Expression ($IRS > 2$) im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Innerhalb der Gruppe TA-MUC1-positiver Tumoren zeigte sich in ca. 40% der Fälle eine ausgeprägte TA-MUC1-Expression ($> 80\%$ positiv-gefärbter Tumorzellen im Tumorschnitt). In gesundem Brustdrüsengewebe ließ sich hingegen keine zellspezifische TA-MUC1-Expression nachweisen. Die Hormonrezeptor-positiven MCF-7-Brustkrebszellen, welche als Positivkontrolle dienten, wiesen eine durchweg kräftige, gemischte (membranständige und zytoplasmatische) TA-MUC1-Expression auf. Zusammenfassend erwies sich das GGSK-1/30-Epitop TA-MUC1 in dieser Arbeit somit innerhalb der Brust als tumorspezifisches und zudem sensitiv-nachweisbares Antigen im Mammakarzinom.

Vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Expression von TA-MUC1 im Mammakarzinom konnten Stergiou et al. (2019) bereits in zwei früheren Antikörperstudien beschreiben (12, 15). In einer ersten Arbeit wurde die mittels GGSK-1/30 nachgewiesene TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe triple-negativer-Brustkrebs- (TNBC-) Patientinnen untersucht. In 97% der untersuchten TNBC-Proben ($n=35$) ließ sich eine positive TA-MUC1-Expression nachweisen (12). Im Unterschied zu dieser Arbeit wurden in der immunhistochemischen Auswertung von Stergiou et al. bereits Antikörperreaktionen mit einem IRS von 1 als positive Gesamtexpression gewertet. Auf Grund dessen lässt sich unter Umständen der dort nachgewiesene höhere Anteil TA-MUC1-positiver Tumoren erklären (Vgl. 97% bei *Stergiou et al.* vs. 92,4% in dieser Arbeit). In Übereinstimmung mit dieser Arbeit zeigte sich auch bei Stergiou et al. keine sichtbare TA-MUC1-Expression im gesunden Brustdrüsengewebe (12).

In einer zweiten Vergleichsarbeit von Stergiou et al. wurde die Expression von TA-MUC1 innerhalb eines größeren Kollektivs von 144 Hormonrezeptor- (HR-) positiven Brustkrebspatientinnen untersucht (15). TA-MUC1 war hier in über 96% der HR-positiven Tumoren nachweisbar, wobei diesmal, in Übereinstimmung mit dieser Arbeit, erst eine

5. Diskussion

Gesamtexpression mit einem IRS>2 als positiv gewertet wurde. Erneut ließ sich auch in dieser Studie keine TA-MUC1-Expression im gesunden Brustdrüsengewebe nachweisen (15).

In dieser Arbeit wurde die Expression von TA-MUC1 nun erstmals anhand eines größeren und heterogenen Brustkrebspatienten-Kollektivs untersucht. Mit einer Nachweisrate von >92% ließ sich das Tumorantigen TA-MUC1 in der Mehrzahl der untersuchten Mammakarzinome nachweisen. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Stergiou et al. konnte die exzellente Nachweismöglichkeit von TA-MUC1 im Tumorgewebe durch den Antikörper GSK-1/30 bestätigt werden. Zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbungen und für eine genauere Beurteilung der Färbereaktion im Tumorgewebe wurden in dieser Arbeit wesentlich geringere Konzentration des Antikörpers GSK-1/30 verwendet als in den Vergleichsstudien von Stergiou et al. (Vgl.: 1 µg/ml (Stergiou et al.) vs. 0,02 µg/ml). Nichtsdestotrotz lag die immunhistochemische Nachweisrate von TA-MUC1 in einem vergleichbar hohen Bereich (Vgl.: 97% bzw. 96% (Stergiou et al.) vs. 92%), was erneut für seine exzellente Sensitivität im Tumorgewebe spricht. Des Weiteren konnte die durch Stergiou et al. bereits vorbeschriebene tumorspezifische Expression von TA-MUC1 bestätigt werden. Bei einer zugleich ausgeprägten Expression im invasiven Tumorgewebe war TA-MUC1 im gesunden Brustdrüsengewebe nicht nachweisbar.

Im Unterschied zu Stergiou et al. erfolgte für das in dieser Arbeit untersuchte Brustkrebspatientinnen-Kollektiv keine Einschränkung bzw. Vorauswahl hinsichtlich der Tumorbiologie oder des Hormonrezeptorstatus. Das Gesamtkollektiv bestand vielmehr aus einer zufälligen Auswahl²⁵ von Patientinnen mit verschiedenen Mammakarzinom-Entitäten, die sich unter anderem hinsichtlich ihrer Tumorhistologie, dem Differenzierungsgrad oder der Hormonrezeptor-Expression im Tumorgewebe stark unterschieden.

Die Tatsache, dass TA-MUC1 innerhalb dieses heterogenen Kollektivs nicht nur in über 92% der Tumorproben nachweisbar war, sondern in der Mehrzahl auch in hohen Maßen exprimiert wurde, unterstreicht das Potenzial von TA-MUC1 als Tumormarker im Mammakarzinom als solches. Ein Nachweis von TA-MUC1 war bspw. gleichermaßen im Frühstadium des lokal begrenzten, gut differenzierten und Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom möglich, wie

²⁵ Zufällig bezieht sich hier auf die Vorauswahl hinsichtlich HR-Status, Tumorgrading, Histologie etc. Einschlussvoraussetzungen für das Kollektiv waren u.a. Erstdiagnosedatum, stattgehabte Brust-OP und das Vorliegen von Informationen zum klinischen Verlauf. Siehe auch [3.2.1 – Patienten und Datenerhebung](#)

5. Diskussion

auch im entdifferenzierten Tumorgewebe eines triple-negativen Mammakarzinoms der bereits ossär-metastasierten Patientin. TA-MUC1 als tumorspezifisches und zugleich ubiquitär exprimiertes Antigen im Brustkrebsgewebe beweist damit ein exzellentes Potenzial als universeller Tumormarker und therapeutischer Zielstruktur im Mammakarzinom.

5.2 TA-MUC1 als Marker im Vor- und Frühstadium des Mammakarzinoms

Das *duktale Carcinoma in situ* (DCIS) stellt eine von den Milchgängen des gesunden Brustdrüsengewebes ausgehende intraepitheliale Neoplasie dar, deren Wachstum auf die Basalmembran begrenzt ist (165). Mit rund 95% stellt das DCIS die mit Abstand häufigste nicht-invasive, nicht-obligate Präkanzerose des Mammakarzinoms dar (166). Aufgrund guter therapeutischer Möglichkeiten weist das DCIS eine geringe Mortalität auf. Schätzungsweise 3% aller Patientinnen mit erstdiagnostizierten DCIS sterben innerhalb von 20 Jahren an den Folgen eines invasiven Mammakarzinoms (167). Nicht selten bleiben DCIS lange Zeit asymptomatisch und werden als zufälliger Tastbefund erkannt (166). Die Diagnosesicherung erfolgt meist mittels Vakuumbiopsie, anhand derer sich eine nachfolgende Beurteilung der pathomorphologischen Faktoren zur Bestimmung des Malignitätspotentials durchführen lässt (17). Ähnlich wie im invasiven Mammakarzinom ist eine Identifizierung von Antigenen, die Korrelationen zu diesen prognosebestimmenden Faktoren aufweisen, auch im DCIS von besonderer Bedeutung (165). In dieser Arbeit wurden daher erstmalig die Expression und Korrelationen des GGSK-1/30-Epitops TA-MUC1 im DCIS untersucht.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Brustkrebsproben ließen sich in 88 Fällen, neben invasiven Karzinom-Anteilen, zusätzlich DCIS-Anteile im Tumorschnitt nachweisen. 92% der DCIS wiesen eine eindeutig positive TA-MUC1-Expression auf. Die Gesamtexpression von TA-MUC1 im DCIS fiel schwächer aus als im invasiven Tumorgewebe (Vgl.: *DCIS* \bar{x} = IRS 6; *invasives Karzinom* \bar{x} = IRS 8). Ähnlich wie im invasiven Mammakarzinom zeigte sich in Bezug auf das subzelluläre Expressionsmuster häufig eine gemischte, überwiegend zytoplasmatische Expression (*cm*) im DCIS, deutlich seltener ließ sich hingegen ein membranständig-betontes Expressionsmuster nachweisen (*mc*) (Vgl. *DCIS* 5,8%; *invasives Karzinom* 13,5%). Ein rein zytoplasmatisches Expressionsmuster war im DCIS wie im invasiven Tumorgewebe zu gleichen Maßen nachweisbar.

5. Diskussion

In dieser Studie sollte erstmals die Expression des GGSK-1/30-Epitops TA-MUC1 im DCIS beschrieben werden. Zudem existieren nach bestem Wissen kaum Vergleichsstudien, in denen die Expression von tumorassoziierten MUC1 im DCIS überhaupt untersucht wurde. In einer Antikörperstudie von Mommers, E.C., et al. (1999) konnte, unter Verwendung vier verschiedener MUC1-Antikörper, von denen zwei gegen normal-glykosyliertes MUC1 (115D8 und 139H2) und zwei gegen eine unterglykosylierte Form von MUC1 gerichtet waren (SM3 und VU-4-H-5), eine Expression von tumorassoziiertem MUC1 im DCIS nachgewiesen werden (168). In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrade zeigte sich in bis zu 46% (115D8 u. 139H2) bzw. 15% (SM3) und 8% (VU-4-H-5) der Fälle eine positive Expression im Gewebe schlecht differenzierter (high-grade) DCIS. In besser differenzierten (low-grade) DCIS hingegen zeigte sich für alle hier untersuchten MUC1-Epitope eine niedrigere oder fehlende Expression. Mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers VU-4-H-5 wiesen alle in der Studie von Mommers et al. untersuchten Antikörper ihr MUC1-Epitop auch im gesunden Brustdrüsengewebe nach und waren somit nicht DCIS-spezifisch (168).

Im Einklang mit Mommers et al. konnte in dieser Arbeit eine deutliche Expression von tumorassoziiertem MUC1, hier dargestellt durch das GGSK-1/30-Epitop TA-MUC1, im DCIS nachgewiesen werden. Im Vorstadium des Mammakarzinoms ließen sich folglich die gleichen tumorassoziierten Expressionsmuster von TA-MUC1 nachweisen, wie im invasiven Karzinom. Im Vergleich mit den bei Mommers et al. verwendeten Antikörpern, die lediglich gegen die Peptidsequenz von normal- bzw. unterglykosyliertem MUC1 gerichtet sind, war der hier verwendete mAk-GGSK-1/30 in der Lage, sein Glykopeptid-Epitop TA-MUC1 einerseits DCIS-spezifisch, ohne Nachweis im gesunden Gewebe, und andererseits in hohem Maße und zudem spezifisch, ohne Expression im Gesunden, im DCIS nachzuweisen. TA-MUC1 wies im DCIS hierbei ein ähnliches subzelluläres Expressionsmuster auf, wie im invasiven Mammakarzinom.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die spezifischen tumorassoziierten Molekül-Modifikationen von MUC1, die zu der Entstehung des Glykopeptid-Epitops TA-MUC1 führen, bereits in nicht-invasiven Vorstufen des Mammakarzinoms nachweisbar sind. Aufgrund seiner exzellenten und spezifischen Nachweismöglichkeit im DCIS stellt TA-MUC1 daher einen potenziell geeigneten immunhistologischen Marker im Früh- und Vorstadium des Mammakarzinoms dar.

5. Diskussion

5.3 Bedeutung des subzellulären Expressionsmusters von TA-MUC1 im Mammakarzinom

Im gesunden Brustdrüsengewebe wird das membranständige Glykoprotein MUC1 in seinem physiologischen Expressionsmuster rein apikal auf der Zelloberfläche exprimiert (81). Durch einen Verlust der Zellpolarität, bspw. im Rahmen der Tumorgenese kommt es zu einer Umverteilung des MUC1-Moleküls über die gesamte Zellmembran, was zu der Entstehung neuer aberranter subzellulärer Verteilungsmuster führt (9). In mehreren Vergleichsstudien konnten bereits signifikante Zusammenhänge zwischen dem subzellulären Expressionsmestern von MUC1 im Tumorgewebe und dem prognostischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden (130, 169-171).

Hinsichtlich der subzellulären Lokalisation des GGSK-1/30-Epitops TA-MUC1 wurde in unterschiedliche einfach-positive (*rein zytoplasmatisch (c)* und *rein membranständig (m)*) und in gemischt-positive (*überwiegend zytoplasmatisch (cm)* und *überwiegend membranständig (mc)*) Expressionsmuster unterschieden. Alle hier untersuchten Tumorschnitte wiesen zumindest Anteile einer zytoplasmatischen TA-MUC1-Lokalisation auf (*cm, mc und c*). Häufig überwog hierbei der zytoplasmatische gegenüber dem membranständigen Anteil (*cm*≈74%) oder es zeigte sich ein rein zytoplasmatisches Verteilungsmuster (*c*≈12%). Seltener wurde TA-MUC1 überwiegend membranständig exprimiert (*mc*≈14%).

Das hier nachgewiesene betont-zytoplasmatische Expressionsmuster von TA-MUC1 (86% der Tumorproben wiesen eine rein zytoplasmatische, oder gemischte, überwiegend zytoplasmatische Expression auf) unterscheidet sich von den Expressionsmustern verschiedener tumorassoziierter MUC1-Epitope anderer Vergleichsstudien. Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers PankoMab-GEX, der, ähnlich wie GGSK-1/30 gegen ein Glykopeptid-Epitop von MUC1 gerichtet ist, zeigte sich in etwa 40% der untersuchten Tumoren ein rein membranständiges Verteilungsmuster des untersuchten MUC1-Epitops (171). Ein rein membranständiges Expressionsmuster ließ sich für TA-MUC1 hingegen in keiner der untersuchten Tumorproben in dieser Arbeit nachweisen. In weniger als 6% der Tumoren ließ sich in der PankoMab-Studie ein rein zytoplasmatisches Verteilungsmuster nachweisen, für TA-MUC1 wiederum zeigte sich dies etwa doppelt so häufig in 12% der Tumorproben (171). In einer zweiten Antikörperstudie von Rahn J. et al. (2001) konnte, mittels des Antikörpers mAk-B27.29, der an einer charakteristischen Peptidsequenz von MUC1 bindet, in rund 81%

5. Diskussion

der Tumorschnitte ein gemischtes Expressionsmuster mit membranständigen und zytoplasmatischen Anteilen des MUC1-Epitops nachgewiesen werden (130). Dieses Verteilungsmuster deckt sich mit dem für TA-MUC1 nachgewiesenen überwiegend gemischten Expressionsmusters (cm- und mc-TA-MUC1 in $\approx 88\%$ aller Tumoren).

Bei Betrachtung unterschiedlicher MUC1-Studien findet sich eine große Varietät der beschriebenen subzellulären Expressionsmustern von MUC1 im Mammakarzinom. Die mitunter sehr unterschiedliche Beschreibung in der Literatur lässt sich durch zwei Faktoren erklären: Zum einen existiert in den Vergleichsstudien keine einheitliche Unterteilung hinsichtlich des subzellulären Verteilungsmusters. Bspw. wird neben einer zytoplasmatischen und membranständigen Lokalisation in anderen Studien zudem in ein apikales-, mikrokanalikuläres- oder basolaterales-Expressionsmuster unterschieden (130, 169). Zum anderen wurden in den verschiedenen MUC1-Studien tatsächlich sehr unterschiedliche tumorassoziierte Varianten eines Glykoproteins untersucht. Verschiedene Prozesse während der Tumorgenese führen zu biochemischen Modifikationen des MUC1-Moleküls, wodurch eine große Zahl unterschiedlicher (Glyko)-Peptid-Epitope entstehen (146). Die jeweiligen tumorassoziierten MUC1-Epitope lassen sich durch eine Reihe spezifischer monoklonaler Antikörper nachweisen (147). Einige dieser Antikörper binden an einer durch verminderte Glykosylierung freigelegten Peptidsequenz des MUC1-Peptids (130), andere Antikörper, wie der hier verwendete monoklonale Antikörper GGSK-1/30, binden an spezifische Kohlenhydrat-Epitopen auf der Peptidsequenz (11, 171). Letztlich führen beide Faktoren, sowohl die methodischen Unterschiede als auch die große Varietät an tumorassoziierten MUC1-Formen, dazu, dass ein einfacher Vergleich der Literatur in Bezug auf das subzellulären Verteilungsmuster von MUC1 nicht möglich ist.

Die unterschiedlichen Nachweismöglichkeiten mittels verschiedener MUC1-Epitope, bedingt durch Unterschiede in ihrer Molekülstruktur und ihrem Verhalten im Tumorgewebe, haben unmittelbaren Einfluss auf die diagnostische und prognostische Wertigkeit des jeweiligen MUC1-Antikörpers. Für GGSK-1/30 zeigte sich, dass dieser in der Lage ist, sein MUC1-Epitop häufiger als andere MUC1-Antikörper auch in membranständiger Lokalisation nachzuweisen. Eine membranständige, respektive apikale MUC1-Lokalisation stellt hierbei das physiologische subzelluläre Expressionsmuster von MUC1 im Brustkrebsgewebe dar (1, 9). Hieraus lässt sich schließen, dass ein membranständig-betontes Expressionsmuster im

5. Diskussion

Tumorgewebe aus einer weitestgehend erhaltenen Zellpolarität und -integrität resultiert. Dies wiederum spricht für ein besser differenziertes frühes Tumorstadium, was grundsätzlich mit einer günstigeren Prognose einhergeht. Es ist denkbar, dass GGSK-1/30 dadurch in der Lage ist, sein Epitop TA-MUC1 bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Tumorgewebe zu detektieren, während andere MUC1-Antikörper lediglich in der Lage sind, ihr MUC1-Epitop erst mit fortgeschrittenen Differenzierungsgrad in aberranter, nicht länger membranständiger Lokalisation nachzuweisen.

In Übereinstimmung mit diesen Ausführungen konnte in dieser Studie eine signifikante Korrelationen zwischen einer membranständigen TA-MUC1-Lokalisation im Tumorgewebe und einem prognostisch günstigeren Verlauf von Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden (s.u. [5.4 TA-MUC1 als unabhängiger Prognostikator des Mammakarzinoms](#)). Zusammenfassend ist der monoklonale Antikörper GGSK-1/30 in der Lage, sein Glykopeptid-Epitop TA-MUC1 sowohl in aberranter subzellulärer als auch physiologischer membranständiger Lokalisation im Tumorgewebe des Mammakarzinoms nachzuweisen. TA-MUC1 scheint hierbei, wie alle tumorassoziierten MUC1-Epitope, ein charakteristisches Expressionsmuster aufzuweisen, welches für TA-MUC1 als gemischtes, überwiegend zytoplasmatisch Verteilungsmuster beschrieben werden kann. Nichtsdestotrotz lässt sich TA-MUC1, insbesondere im Vergleich mit anderen tumorassoziierten MUC1-Epitopen, häufiger auch in membranständiger Lokalisation nachweisen, was für die diagnostische und prognostische Wertigkeit von GGSK-1/30 von entscheidender Bedeutung ist.

5.4 Zusammenhang zwischen Tumorbiologie und TA-MUC1-Expression im Mammakarzinom

In den Korrelationsanalysen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe und dem Grading. In Tumoren des G1-Stadiums wurde TA-MUC1 schwächer exprimiert als in weniger gut differenzierten G2- und G3-Tumoren. Mehr als 60% der G1-Tumoren zeigten eine TA-MUC1-Expression unterhalb des Medians, wohingegen rund 80% der G2-Tumoren eine Expression oberhalb des Medians aufwiesen. Neben dem Grading zeigte sich zudem ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gesamtexpression von TA-MUC1 und der Tumorhistologie. So wurde TA-MUC1 im muzinösen Mammakarzinom signifikant schwächer exprimiert als im Tumorgewebe invasiver Karzinome ohne speziellen Typ (*NST*) oder in Tumoren des lobulären Typs ($p=0,002$

5. Diskussion

und $p < 0,001$). 100% der muzinösen Karzinome wiesen eine Gesamtexpression unterhalb des Medians auf. Am stärksten fiel die Expression von TA-MUC1 im invasiv-lobulären Mammakarzinom aus. Hier zeigte sich eine signifikant stärkere Expression als in Tumoren des muzinösen Typs ($p < 0,001$) oder NST-Tumoren ($p = 0,045$). Rund 80% der invasiv-lobulären Tumoren wiesen eine TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians auf.

Das Tumorgrading beinhaltet die Beurteilung des histologischen Differenzierungsgrades und der Zellmorphologie im Tumorgewebe im Vergleich mit dem physiologischen Gewebe (172). Verschiedene Parameter, wie eine erhöhte Zellteilungsrate, ein Verlust der Zellpolarität sowie das Ausmaß an Zell- und Kernformvariationen sprechen für einen schlechten Differenzierungsgrad. Das Tumorgrading erlaubt Rückschlüsse auf das Malignitätspotential und somit auf die Prognose des klinischen Verlaufs (173, 174). Da sich die histologischen Subtypen des Mammakarzinoms untereinander in ihrem Differenzierungsgrad, ihrem Wachstumsmuster und ihrem Ursprungsgewebe unterscheiden, können anhand der Tumorhistologie ebenfalls prognostische Zusammenhänge hergestellt werden. So treten im muzinösen Mammakarzinom in der Regel seltener Lymphknoten-Metastasen auf als in Karzinomen der anderen Histologien. Zudem weisen Patientinnen dieses Subtyps meist ein besseres klinisches Outcome auf als bspw. Patientinnen mit einem häufig multizentrischen Tumor des NST-Typs (175-177).

In Bezug auf die Tumorhistologie stehen die Ergebnisse aus den Korrelationsanalysen zur Gesamtexpression von TA-MUC1 im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, wie der von Matsukita, S. et al. (2003), die in ihrer Arbeit verschiedene Antikörper zum MUC1-Nachweis im Tumorgewebe verwendeten. Bei Matsukita, S. et al. wiesen muzinöse Karzinome ebenfalls eine signifikant schwächere Gesamtexpression von tumorassoziierten MUC1 auf als NST-Tumoren. Matsuki, S. et al. setzten die nachgewiesene schwächere MUC1-Expression mit dem günstigeren Differenzierungsgrad und der weniger aggressive Tumorbilogie des muzinösen Subtyps in Zusammenhang (178).

Hinsichtlich des Tumorgradings divergieren die Ergebnisse der Korrelationsanalysen aus den Vergleichsstudien. Dian, D. et al. (2009) untersuchten die diagnostische Wertigkeit des monoklonalen Antikörpers *PankoMab-GEX*, der, wie GSK-1/30 auch, gegen ein tumorassoziiertes Glykopeptid-Epitop von MUC1 gerichtet ist. Sie verglichen diesen mit zwei

5. Diskussion

bereits etablierten MUC1-Antikörpern. Anhand von *PankoMab-GEX* konnte keine signifikante Korrelation zum Tumorgrading hergestellt werden, anders als durch einen Nachweis mittels der Vergleichsantikörper. Unter Verwendung von *mAk-DF3* zeigte sich eine signifikant schwächere MUC1-Expression im Tumorgewebe von G3-Tumoren als in Tumoren des G2-Stadiums. Durch einen Nachweis mittels des MUC1-Peptid-Antikörpers *VU4H5* zeigte sich wiederum eine konkordant zum Grading zunehmende Gesamtexpression im Tumorgewebe. G3-Tumoren wiesen folglich eine stärkere MUC1-Expression auf als Tumoren der niedrigeren Grading-Stadien (179). In Übereinstimmung mit Dian et al. zeigte TA-MUC1 in G2-Tumoren eine höhere Gesamtexpression als in G1-Tumoren. Anders als bei einem Nachweis mittels *VU4H5* ließ sich für das GSK-1/30-Epitop TA-MUC1 jedoch keine steigende Gesamtexpression in G3-Tumoren beobachten, sondern es zeigte sich, ähnlich wie bei einem Nachweis mittels *mAk-DF3*, eine tendenziell niedrigere Expression als in G2-Tumoren.

Die Entstehung der durch GSK-1/30 nachweisbaren sialylierten *Core*-Struktur (sialyliertes Thomsen-Friedenreich-Antigen, *STn*) vom TA-MUC1 resultiert aus einer verminderten Glykosyltransferasen- und einer verstärkten Sialyltransferasen-Aktivität im Tumorgewebe. Im frühen Stadium des Mammakarzinoms zeigt sich häufig eine noch erhaltene bzw. physiologische Transferasen-Aktivität (146). Dies könnte erklären, weshalb die Gesamtexpression des aberranten Glykopeptid-Antigens TA-MUC1 im Tumorgewebe von G1-Tumoren und in besser differenzierten Tumoren des muzinösen Subtyps insgesamt niedriger ausfällt. Widersprüchlich hierzu ließ sich auf der anderen Seite keine höhere TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe schlechter differenzierter G3-Tumoren nachweisen. Es scheint daher, dass das Ausmaß der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe nicht ausschließlich über Veränderungen in der Transferasen-Aktivität und den hierdurch bedingten Molekül-Modifikationen im Tumorgewebe bestimmt wird. Vielmehr zeigte sich in dieser Arbeit, in Übereinstimmung mit anderen MUC1-Antikörperstudien, dass das Ausmaß der Gesamtexpression von TA-MUC1 tatsächlich in hohen Maßen von der subzellulären Lokalisation des Antigens im Tumorgewebe abhängig ist (130, 171, 180). Tumoren mit einem rein zytoplasmatischen Expressionsmuster von TA-MUC1 wiesen eine deutlich schwächere Gesamtexpression im Tumorgewebe auf als Tumoren mit überwiegend membranständiger TA-MUC1-Lokalisation ([s. 4.4 TA-MUC1-Expression in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation](#)). Hinsichtlich der Korrelationen mit histopathologischen Tumormerkmalen sollte

5. Diskussion

folglich sowohl die Gesamtexpression als auch die subzelluläre Lokalisation von TA-MUC1 im Tumorgewebe berücksichtigt werden.

In Übereinstimmung mit den Korrelationen zur Gesamtexpression zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 und der Tumorhistologie. NST-Tumoren wiesen häufiger als erwartet ein gemischtes, überwiegend zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf (*cm*). Tumoren vom muzinösen Subtyp zeigten hingegen signifikant häufiger als erwartet ein rein zytoplasmatisches Expressionsmuster im Tumorgewebe (*c*). Im Tumorgewebe muzinöser Mammakarzinome ließen sich folglich einerseits eine insgesamt niedrigere Gesamtexpression und andererseits ein häufig rein zytoplasmatisches Expressionsmuster von TA-MUC1 nachweisen. Dieser Zusammenhang erscheint insofern kongruent, als dass ein zytoplasmatisches Expressionsmuster in weiteren Korrelationsanalysen mit einer signifikant niedrigeren Gesamtexpression von TA-MUC1 im Tumorgewebe einherging.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Glykopeptid-Epitop TA-MUC1 im Tumorgewebe muzinöser Mammakarzinome insgesamt schwächer und häufig rein zytoplasmatisch exprimiert wird. In Anbetracht des signifikanten Zusammenhangs mit der weniger aggressiven Tumorbiologie des muzinösen Subtyps und eines damit einhergehenden günstigeren klinischen Verlaufs (175-177), lassen sich so anhand des Expressionsmusters von TA-MUC1 Rückschlüsse auf die Prognose von Brustkrebspatientinnen ziehen. Um die Relevanz von TA-MUC1 als prognostischen Marker im Mammakarzinom näher zu beschreiben, wurde zudem der Einfluss von TA-MUC1 auf das Überleben und den weiteren klinischen Verlauf untersucht.

5.4 TA-MUC1 als unabhängiger Prognostikator des Mammakarzinoms

Einfluss der Gesamtexpression von TA-MUC1 auf den klinischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen

In einer früheren Antikörperstudie von Stergiou, N. et al. (2019) wurde der Einfluss des Glykopeptid-Epitops TA-MUC1 auf den klinischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen innerhalb eines Kollektivs von 144 Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen untersucht. Anhand der Färbereaktion mit GGSK-1/30 erfolgte eine Unterscheidung des Kollektivs in TA-MUC1-positive ($IRS \geq 1$) und TA-MUC1-negative Tumoren ($IRS=0$). Anschließend wurden

5. Diskussion

die Überlebenszeiten der beiden Patientengruppen in Bezug auf das Metastasen- (MFS) und krankheitsfreie Überleben (DFS) verglichen. Es konnten dabei keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe und dem MFS oder DFS nachgewiesen werden (15).

In dieser Studie wurde die prognostische Bedeutung von TA-MUC1 im Mammakarzinom anhand eines größeren und heterogenen Kollektivs von Brustkrebspatientinnen untersucht. Im Unterschied zu Stergiou et al. erfolgte in dieser Arbeit eine Unterteilung der Gesamtexpression von TA-MUC1 anhand des Medians (unterhalb: IRS 0-6 und oberhalb: IRS 8-12), wobei eine Gesamtexpression unterhalb des Medians als niedrige und eine Expression oberhalb des Medians als hohe TA-MUC1-Expression gewertet wurde. In Bezug auf das Gesamtüberleben zeigten Patientinnen mit einer hohen TA-MUC1-Expression eine überlegene 3- und 5-Jahres-Überlebensrate (JÜR). Hinsichtlich des Metastasenfreien-Überlebens (MFS) wiesen Patientinnen mit einer hohen TA-MUC1-Expression eine tendenziell bessere Überlebenszeit auf (Abb.70). Mit Blick auf das DFS war eine hohe TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe mit einem gleichmäßig besseren Verlauf assoziiert und TA-MUC1 bewies sich als signifikanter unabhängiger Prognostikator. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine hohe TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe mit einem insgesamt günstigeren Verlauf assoziiert ist. In Bezug auf das Krankheitsfreie-Überleben bewies sich TA-MUC1 zudem als ein signifikanter unabhängiger prognostischer Marker des Mammakarzinoms.

Es finden sich einige MUC1-Antikörperstudien, die hinsichtlich der prognostischen Bedeutung vergleichbare Ergebnissen für ihre jeweiligen Epitope zeigen konnten, wie für TA-MUC1. Zusammenfassend existiert in der Literatur jedoch keine Einigkeit, was sich durch mehrere Faktoren erklären lässt: Zum einen existieren große Unterschiede im Studiendesign. Die Größe des Patientenkollektivs (Vgl. 82 Patienten (Parham et al. (180)) und 1447 Patienten (Rakha et al. (128))), die Länge des Beobachtungszeitraums oder die betrachteten primären Endpunkte (DFS, MFS, RFS oder Gesamtüberleben) variieren innerhalb der verschiedenen Studien stark. Zum anderen stellen sich die verschiedenen Patientenkollektive sehr unterschiedlich dar und unterscheiden sich anhand der Patienten- und Tumormerkmalen. Bei Ceriani et al. und Stergiou et al. wurden bspw. ausschließlich Hormonrezeptor-positive Brustkrebspatientinnen in die Studie eingeschlossen (12, 184)). Ein weiterer methodischer Unterschied besteht darin, dass der Begriff einer hohen oder niedrigen MUC1-Expression nicht einheitlich definiert ist. Es finden

5. Diskussion

sich verschiedene Einteilungen und unterschiedliche Vorgehensweisen bei den immunhistochemischen Auswertungen unterschiedlicher Studien. In den meisten Arbeiten wird ein semiquantitativer Score verwendet, der sich ähnlich bzw. gleich zu dem in dieser Studie angewandten IR-Score berechnen lässt. Hierbei wird die Kombination aus den Anteilen positiver Tumorzellen und der Färbintensität im Tumorschnitt beurteilt (128, 180, 181, 183, 184). Andere Arbeiten bewerteten hingegen lediglich den prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen im Schnitt (127), oder es wurde ein selbst bestimmter *Cut-off*-Wert gewählt, ab dem eine Gesamtexpression als positiv gewertet wurde (15, 171).

Als letzte und vermutlich entscheidendste Ursache für die Diskrepanz in den Literaturergebnissen dient die bereits angesprochene Diversität in der Biologie der in den Studien verwendeten unterschiedlichen MUC1-Antikörper. Je nach Glykosylierungsmuster und spezifischer Molekül-Modifikation im Tumorgewebe entstehen unterschiedliche immunogene MUC1-assoziierte Peptid- und Kohlenhydratstrukturen, gegen die jeweils verschiedene MUC1-Antikörper gerichtet sein können. Die Varietät der tumorassoziierten MUC1-Epitope spiegelt sich in der enormen Vielfalt an bereits existierenden MUC1-Antikörpern wider (147). Zusammengefasst ist also die prognostische Wertigkeit der verwendeten Antikörper abhängig von dem Expressionsmuster und dem biologischen Verhalten ihrer tumorassoziierten MUC1-Epitope im Tumorgewebe und sollte daher für sich stehend betrachtet werden.

Die Zielstruktur des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30 liegt in einer 22 Aminosäuren langen Peptidsequenz der VNTR-Domäne von MUC1, welche die beiden immundominanten Domänen PDTR und GSTA beinhaltet. An der Serin-17-Seitenkette findet sich hier eine glykosidisch gebundene sialylierte Core-1-Struktur (Thomsen-Friedenreich-Antigen, *Serin-17-STn*) welche zusammen mit einer spezifischen Peptidsequenz das Glykopeptid-Epitop TA-MUC1 bildet (14). Im Gegensatz zu vielen anderen MUC1-Antikörpern ist GGSK-1/30 folglich nicht gegen die reine Peptidsequenz, sondern gegen ein spezifisches Glykopeptid innerhalb der VNTR-Domäne von MUC1 gerichtet. Das immunogene Potential des Glykopeptid-Epitops TA-MUC1 wird dabei maßgeblich durch die enthaltene *Serin-17-STn*-Struktur definiert (12, 14).

5. Diskussion

Das Glykosylierungsmuster von tumorassoziiertem MUC1 wird durch die Aktivität verschiedener substrat- und ortsspezifischer Glykosyltransferasen im Epithelgewebe bestimmt (1). Aufgrund einer verminderten Transferasen-Aktivität im Tumorgewebe kommt es zu einem gestörten Aufbau der normalerweise weit verzweigten Kohlenhydratstruktur von MUC1. Dadurch entstehen verkürzte Zwischenprodukte von „unreifen“ O-Glykan-Vorstufen, wie bspw. dem bereits angesprochenen sialysierten Thomsen-Friedenreich-Antigen (*STn*, *Neu5Aca2-6GalNAca-O-Ser/Thr*) (9, 185). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das *STn*-Antigen im Tumorgewebe verschiedener Karzinome überexprimiert vorliegt, und darüber hinaus die Höhe der Gesamtexpression mit dem prognostischen Verlauf korreliert (186-189). Blixt, O. et al. (2011) gelang es zudem, hohe Titer an Autoantikörper im Blutserum von Brustkrebspatientinnen nachzuweisen, die gegen aberrante Glykopeptid-Strukturen von MUC1 gerichtet waren (*STn*-MUC1 und *core-3*-MUC1) (190). Diese spezifischen Antikörper waren schon im frühen Tumorstadium nachweisbar, wohingegen die Serumproben gesunder Frauen durchweg negativ ausfallen. Es zeigte sich, dass hohe *STn*- und *core-3*-MUC1-Antikörpertiter im Serum mit einem signifikant verringerten Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen sowie einem prognostisch günstigeren klinischen Verlauf einhergingen. Daraus schlussfolgerte man, dass die zirkulierenden Autoantikörper im Serum in der Lage sind, eine Immunantwort gegen Glykopeptid-Strukturen auf tumorassoziierten MUC1 zu induzieren, die wiederum in einer Suppression von Fernmetastasen und einem verzögerten Krankheitsprogress resultiert (190).

In Übereinstimmung hierzu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine höhere Expression des tumorassoziierten *STn*-Glykopeptids TA-MUC1 im Tumorgewebe mit einem besseren krankheitsfreien Überleben (DFS) und einem signifikant niedrigeren Risiko für Fernmetastasen und/oder Rezidiven einhergeht. Konkordant dazu wiesen Patientinnen mit einer hohen TA-MUC1-Expression zudem signifikant häufiger eine positive Progesteronrezeptor-Expression im Tumorgewebe auf, was ebenfalls mit einem nachweislich niedrigeren Risiko für Fernmetastasen, einem längeren krankheitsfreien Überleben und einem insgesamt günstigeren klinischen Verlauf assoziiert ist (191-193). Vor diesem Hintergrund scheint es plausibel, dass das Tumorantigen TA-MUC1 eine immunogene Glykopeptid-Struktur im Tumorgewebe des Mammakarzinoms darstellt, welche, in Übereinstimmung mit Blixt et al., in der Lage ist, eine Autoantikörper-vermittelte Anti-TA-MUC1- (=Anti-Tumor-) Immunantwort im Serum zu induzieren, auf die sich der hier beobachtete Zusammenhang zurückführen lässt. Dies würde

5. Diskussion

weiterhin bedeuten, dass das tumorspezifische TA-MUC1 ein geeignetes *Target* für eine zielgerichtete Tumorthherapie für Brustkrebspatientinnen darstellt und der synthetisch hergestellte anti-TA-MUC1-Antikörper GGSK-1/30 für therapeutische Zwecke verwendet werden könnte.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass neben einem nachgewiesenen Einfluss der TA-MUC1-Expression auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) kein Einfluss auf das Gesamtüberleben oder metastasenfrees Überleben nachgewiesen werden konnte. Zudem stehen der Nachweis einer schwachen TA-MUC1-Expression in niedrig malignen G1-Tumoren sowie im Tumorgewebe prognostisch günstigerer muzinöser Karzinome im Kontrast zu dem nachgewiesenen Einfluss der TA-MUC1-Expression auf das DFS. Eine alleinige Betrachtung der Gesamtexpression im Tumorgewebe scheint daher nicht hinreichend geeignet, um die prognostische Bedeutung von TA-MUC1 im Mammakarzinom zu beschreiben. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich vielmehr, dass hierfür die Gesamtexpression im Tumorgewebe mit dem subzelluläre Expressionsmuster von TA-MUC1 im Zusammenhang betrachtet werden muss.

Eine hohe, überwiegend membranständige TA-MUC1-Expression ist mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben und einem günstigeren klinischen Verlauf assoziiert

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine starke und überwiegend membranständige Expression von TA-MUC1 im Tumorgewebe mit einem besseren Krankheitsverlauf einhergeht. Mc-TA-MUC1-Tumoren wiesen eine prognostisch günstigere Tumorphistologie auf; Patientinnen mit membranständig betontem Expressionsmuster zeigten zudem ein gleichmäßig überlegenes DFS und MFS. Diese Beobachtung deckt sich mit verschiedenen Vergleichsstudien zur MUC1-Expression im Mammakarzinom.

In der Studie von Ceriani, R.L. et al. (1992) war eine hohe membranständige MUC1-Expression, nachgewiesen durch den MUC1-Peptid-Antikörpers *BrE-3*, mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben und einem niedrigen Rezidivrisiko assoziiert (184). Weitere Studien von van der Vegt et al. (2007) und Heublein et al. (2015) kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Unter Verwendung des MUC1-Antikörpers *mAb214D4* zeigte sich bei van der Vegt et al. ein signifikant besseres Gesamtüberleben sowie ein reduziertes Rezidivrisiko für Patientinnen mit einer positiven und zugleich membranständigen MUC1-Expression im Tumorgewebe (169).

5. Diskussion

Heublein et al., die mit dem Antikörper *PankoMab-GEX* einen mit GGSK-1/30 vergleichbaren Glykopeptid-Antikörper verwendeten, berücksichtigten in ihrer Studie lediglich das subzelluläre Expressionsmuster von MUC1, unabhängig von der Gesamtexpression. Ein rein membranständiges Expressionsmuster war auch hier mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben und einem insgesamt günstigeren klinischen Verlauf assoziiert (171).

Im physiologischen Zustand wird das membranständige Mucin MUC1 auf der apikalen Zelloberfläche von Epithelien exprimiert. Über einen Erhalt der Zellintegrität trägt es zu einer natürlichen Barriere gegenüber äußeren Einflüssen bei und übernimmt wichtige Schutzfunktionen auf der Epithelzelle (81). Ein Verlust der Zellpolarität im Rahmen von malignen Prozessen führt zu einer Umverteilung von MUC1 über die gesamte Zellmembran. Durch neu entstehende Interaktionen mit basolateralen Rezeptor-Tyrosinkinasen werden so MUC1-induzierte Signalwege, wie der ERBB2-Signalweg, aktiviert. Diese bewirken eine Funktionsstörung der *tight junctions* und Zelladhäsionsmolekülen, was letztendlich in einem Polaritätsverlust der Zelle und einem Fortschreiten der malignen Transformation resultiert (1, 9). Mit zunehmender Entartung der Epithelzelle ist folglich zu erwarten, dass MUC1 vermehrt in seiner nicht-physiologischen aberranten subzellulären-Lokalisation exprimiert wird. Umgekehrt steht ein überwiegend membranständiges Expressionsmuster für eine weitgehend erhaltene Zellintegrität und Differenzierungsgrad, was einem früheren Stadium der malignen Transformation entspricht. Der in dieser Arbeit nachgewiesene positive prognostische Einfluss einer hohen membranständigen TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe steht hiermit im Einklang. Anhand des Expressionsmusters von *TA-MUC1* im Tumorgewebe lassen sich somit bereits im frühen Tumorstadium Rückschlüsse auf den weiteren Krankheitsverlauf von Brustkrebspatientinnen ziehen.

Eine hohe zytoplasmatische TA-MUC1-Expression ist mit einem prognostisch ungünstigen klinischen Verlauf assoziiert

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine membranständig-betonte TA-MUC1-Expression, als Indikator für einen funktionell erhaltenen Differenzierungsgrad und weitgehend intakte Signalwege, mit einem günstigeren klinischen Verlauf einhergeht. Wie in den meisten Vergleichsstudien nachgewiesen wurde, spiegelt eine aberrante, zytoplasmatische MUC1-Expression im Tumorgewebe wiederum einen Verlust des physiologischen Differenzierungsgrad mit fehlerhaften bzw. gestörten Signalwegen da. Dies begünstigt die

5. Diskussion

Überlebens- und Wachstumsprozesse der Tumorzelle und resultiert letztendlich in einem erhöhten Risiko für Fernmetastasen und einem insgesamt schlechteren Krankheitsverlauf (127, 130, 184, 194). In Übereinstimmung dazu konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass ein hohes zytoplasmatisches Expressionsmuster von TA-MUC1 mit einem signifikant erhöhten Risiko für Fernmetastasen sowie einem tendenziell schlechteren Gesamtüberleben einhergeht.

Im Anschluss an die Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum finden im Golgi-Apparat O-Glykosylierungsprozesse des MUC1-Proteins statt. Anschließend werden die glykosylierten MUC1-Moleküle an die Zellmembran transportiert. Über eine Clathrin-vermittelte Endozytose werden die membranständigen MUC1-Moleküle internalisiert und der Vorgang der O-Glykosylierung so häufig wiederholt, bis eine terminale Addition von Sialinsäure an die entstehende Glykankette eine weitere Modifizierung des - inzwischen stark glykosylierten - MUC1-Moleküls determiniert (195, 196). Eine reduzierte bzw. fehlende N-Acetylglucosaminyltransferase-Aktivität führt zu einer verminderten Glykosylierung von MUC1 im Tumorgewebe und zur Entstehung verkürzter MUC1-Glykopeptidstrukturen (*Core2*-Strukturen). Eine verstärkte Sialyltransferasen-Aktivität im Tumorgewebe bewirkt, durch ein Anfügen endständiger Sialinsäure als „Stoppssignal“, einen vorzeitigen Abbruch der Glykanketten-Synthese von MUC1. Intrazellulär führt dies zu einer Akkumulierung sialylierter und stark verkürzter MUC1-Glykopeptide im Tumorgewebe (185).

TA-MUC1, in seiner rein zytoplasmatischen Lokalisation, stellt ein solches aberrantes verkürztes sialyliertes MUC1-Glykopeptid dar (13,15). Zytoplasmatisch exprimiert scheint TA-MUC1 einen Tumorprogress-fördernden Einfluss auf die Epithelzelle zu haben, was in einem schlechteren klinischen Outcome der Patientinnen mit zytoplasmatischen Expressionsmuster resultiert. In diesem Zusammenhang fanden Li, Y. et al. (1998) Hinweise darauf, dass zytoplasmatisch exprimiertes MUC1 im Tumorgewebe mit intrazellulären Strukturproteinen, wie dem am *Wnt*-Signalweg und an Zelladhäsions-Verbindungen beteiligten β -Catenin, interagiert. Dies führt zu einer Auflösung der Zellintegrität, was im nächsten Schritt eine Bildung von Fernmetastasen begünstigt (197, 198), (199). Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchten Rahn, J. J., et al. (2001) das Zusammenspiel von MUC1 und β -Catenin im Tumorgewebe, um so eine Erklärung für den negativ prognostischen Einfluss von zytoplasmatisch-exprimierten MUC1 zu finden. Allerdings konnte kein signifikanter

5. Diskussion

Zusammenhang und darüber hinaus auch keine alternative Erklärung für die beobachteten Zusammenhänge nachgewiesen werden (130).

Durch einen Verlust der Zellpolarität im Tumor, was zu einer Umorganisation von MUC1 über die gesamte Zellmembran führt, ist MUC1 in der Lage, mit den basolateral exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR), zu interagieren und neue, Tumorprogress-fördernde Signalwege zu aktivieren (9). Neben seiner membranständigen Form wird MUC1 im Tumor häufig auch intrazellulär im Zytosol und Nucleus exprimiert (119, 145). Bitler, B. G., et al. (2010) konnten erstmals nachweisen, dass tumorassoziiertes MUC1 und die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR - welche physiologischerweise ebenfalls membranständig und im Tumorgewebe internalisiert und zytosolisch exprimiert wird (200, 201) - nicht nur in membranständiger Lokalisation, sondern auch intrazellulär miteinander interagieren (202). Somit ist auch zytoplasmatisches MUC1 in der Lage, EGFR-abhängige und tumorwachstumsfördernde Signalwege zu aktivieren (202). Weiterhin konnten Bitler et al. nachweisen, dass die Internalisierung und der retrograde Transport von EGFR in das Zytoplasma in Abhängigkeit von MUC1 stattfindet. Im Falle, dass MUC1 nach vorübergehender Aufnahme in die Zelle zur Modifikation im Golgi-Apparat anschließend wieder auf der Zellmembran exprimiert wurde, blieb auch ein intrazellulärer Weitertransport von EGFR aus und die Rezeptor-Tyrosinkinase wurde stattdessen zusammen mit MUC1 „recycelt“ und zur Zelloberfläche transportiert (202) (s. Abb. 77).

Da ein physiologischer „Recycling-Prozess“ von MUC1 im Tumorgewebe auf Grund einer verminderten Glykosylierung und einer verstärkten Sialylierung des Moleküls seltener stattfindet, könnte dies zum einen zu einer vermehrten intrazellulären Akkumulierung des aberranten Glykopeptids und zum anderen eine verstärkte intrazelluläre Interaktion zwischen MUC1 und EGFR im Tumorgewebe bewirken - wodurch wiederum intrazelluläre Signalwege der Tumorzelle aktiviert würden. Umgekehrt könnte eine vermehrt membranständige MUC1-Expression über eine reduzierte intrazelluläre Aufnahme von EGFR zu einer verminderten Aktivierung dieser tumorprogressionsfördernden Prozesse auf intrazellulärer Ebene führen.

5. Diskussion

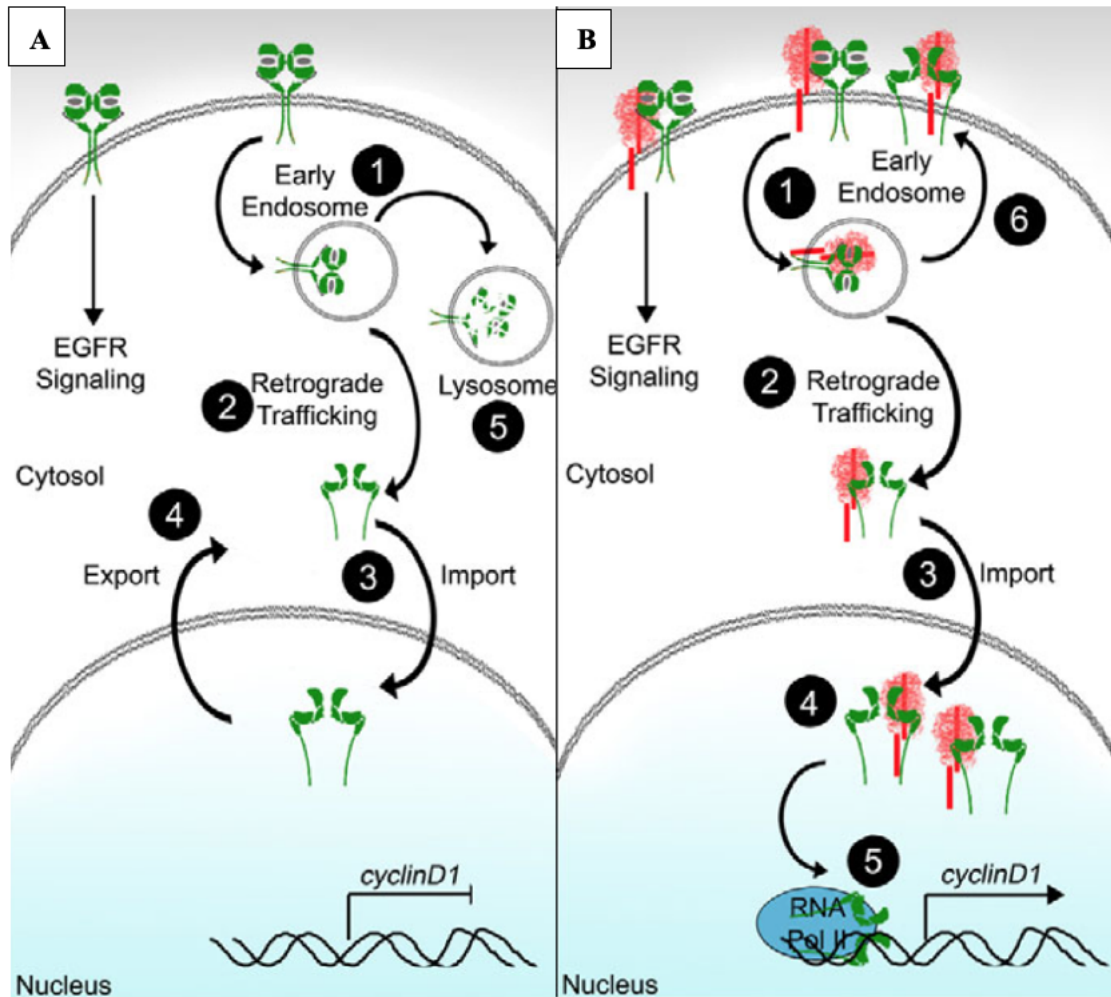


Abbildung 69: Die Rolle von MUC1 im nukleären Transport von und während der Interaktion mit EGFR.

(modifiziert nach Bitler, B. G., et al. (2010), *Journal of Cell Science* 123, 1716-1723).

A: EGF-Stimulation in Abwesenheit von MUC1: EGFR wird über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen (1) und anschließend entweder retrograd weiter in das Zytosol transportiert (2) oder intrazellulär in Lysosomen recycelt (5). Das zytosolische EGFR wird Importin- β 1-vermittelt in den Zellkern aufgenommen (3). In Abwesenheit von MUC1 wird es nachfolgend erneut ins Zytosol exportiert (4). **B:** EGF-Stimulation in Anwesenheit von MUC1: EGFR und MUC1 werden gemeinsam internalisiert und über retrograden Transport weiterverarbeitet (1, 2). Beide Moleküle werden Importin- β 1-vermittelt in den Zellkern importiert und bilden dort einen gemeinsamen Komplex (3,4). Das im Zellkern akkumulierte EGFR ist, in diesem Komplex gebunden, in der Lage, mit der RNA-Polymerase 2 zu interagieren und über den Promotor Cyclin D1 die Transkription verschiedener an Zellproliferation und Tumorprogress beteiligter Gene zu aktivieren (5). Im Falle eines

5. Diskussion

fehlenden intrazellulären Transports, mit einer weiterhin membrangebundenen Expression von MUC1, bleibt auch die Internalisierung von EGFR aus und EGFR wird zurück zur Zellmembran transportiert (6).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein ausgeprägtes zytoplasmatisches Expressionsmuster von TA-MUC1 im Mammakarzinom mit einem signifikant erhöhten Fernmetastasen-Risiko einhergeht, wohingegen eine hohe membranständige Expression mit einem günstigeren klinischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen assoziiert ist. Die ausgeführten Hypothesen stellen eine nachvollziehbare Erklärungen für diesen nachgewiesenen prognostischen Einfluss des GGSK-1/30-Epitops TA-MUC1 dar. Die in diesem Zusammenhang postulierte onkogene Wirkung von TA-MUC1 unterstreicht sein Potenzial als *target* für die gezielte Immuntherapie im Mammakarzinom.

5.5 Die Bedeutung von TA-MUC1 im triple-negativen Mammakarzinom

Das triple negative Mammakarzinom (engl.: *triple negative breast cancer*, TNBC) wird durch eine fehlende Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptor-Expression (PR) sowie eine ausbleibenden Überexpression des *human epidermal growth factor receptor type 2* (HER2) im Tumorgewebe definiert. Das TNBC macht schätzungsweise 15% aller Mammakarzinome aus (203). Im Vergleich mit anderen Mammakarzinom-Subtypen ist das TNBC mit einer aggressiveren Tumorbiologie, einem höheren Risiko für Fernmetastasen und einem insgesamt schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (5). Die Prognose des TNBC wird maßgeblich durch das Ansprechen auf eine Chemotherapie bestimmt, welche weiterhin die einzige kausale Standardtherapie darstellt (5, 17). Um das klinische *Outcome* von TNBC-Patientinnen zu verbessern, ist es - neben einer Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten - notwendig, die bestehenden systemischen Therapiemöglichkeiten des TNBC, bspw. anhand zielgerichteter Immuntherapien, zu erweitern (204-206). Sowohl eine erfolgreiche Frühdiagnostik als auch eine effektive Immuntherapie basieren hierbei zunächst auf der Identifizierung zugänglicher und tumorspezifischer Antigene im TNBC. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Expression von TA-MUC1 im Tumorgewebe und dessen Einfluss auf den prognostischen Verlauf von TNBC-Patientinnen gesondert untersucht.

5. Diskussion

Die Expression von TA-MUC1 im TNBC

Tumorassoziiertes MUC1 lässt sich in ca. 90% aller invasiven Mammakarzinome nachweisen (119). Siroy, A. et al. (2013) konnten zeigen, dass verändert glykosyliertes MUC1 zudem in etwa 94% aller dort untersuchten TNBC-Tumoren exprimiert wurde (207). In Bezug auf das GGSK-1/30-Epitop TA-MUC1 gelang es Stergiou, N. et al. (2019) dieses in rund 97% aller untersuchten TNBC-Schnitte nachzuweisen (12).

Innerhalb des hier untersuchten Mammakarzinom-Kollektivs (n=237) waren 42 TNBC-Tumoren vertreten. In 90,4% der TNBC-Schnitte zeigte sich eine eindeutig positive TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe ($IRS > 2$). TA-MUC1 wurde hierbei im TNBC weniger stark exprimiert als im Gesamtkollektiv: $\bar{x}_{\text{Gesamtkollektiv}} IRS=8$, $\bar{x}_{\text{TNBC-Kollektiv}} IRS=6$. In rund 70% der TNBC ließ sich ein überwiegend zytoplasmatisches Expressionsmuster nachweisen (*cm*). Nur etwa 12% der TNBC, und damit weniger häufig als im Gesamtkollektiv, zeigten ein überwiegend membranständiges Expressionsmuster (*mc*). In ca. 17% der Fälle, häufiger als bei Tumoren des Gesamtkollektivs, wurde TA-MUC1 ausschließlich zytoplasmatisch exprimiert (*c*). Wie im Gesamtkollektiv wiesen TNBC-Tumoren mit einem zytoplasmatischen Expressionsmuster eine signifikant schwächere TA-MUC1-Expression auf als die übrigen TNBC- (*mc*- und *cm*-) Tumoren.

Wie verschiedene Studien zeigen konnten, und in dieser Arbeit bereits ausgeführt wurde, wird tumorassoziiertes MUC1 in gut differenzierten Tumoren bzw. in frühen Tumorstadien vorwiegend in seiner physiologischen membranständigen Form exprimiert, wohingegen es sich in schlechter differenzierten Tumoren vermehrt in aberranter subzellulärer Lokalisation nachweisen lässt (130, 169, 171, 180, 208). Vor diesem Hintergrund erscheint es kongruent, dass TA-MUC1 im TNBC, welches in der Regel eine aggressive Tumorbilologie mit schlechterem Differenzierungsgrad aufweist, weniger häufig membranständig und häufiger zytoplasmatisch exprimiert wurde als in Tumoren des Gesamtkollektivs. In Übereinstimmung hierzu wiesen TNBC-Tumoren mit zytoplasmatischen Expressionsmuster eine signifikant schwächere Gesamtexpression von TA-MUC1 auf, was ebenfalls mit einer aggressiveren Tumorbilologie und einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert ist (127, 182).

5. Diskussion

TA-MUC1 ist ein prognostischer Marker im triple-negativen Mammakarzinom

Das subzelluläre Expressionsmuster verschiedener tumorassoziierter MUC1-Antigene korreliert mit dem klinischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen (170, 171, 209). Die Ergebnisse in der Literatur gehen diesbezüglich auseinander. Dennoch zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen bestimmten aberranten Expressionsmustern von MUC1 im Tumorgewebe und prognosebestimmenden Tumormerkmalen (128, 202, 208). Auch für TA-MUC1 konnte ein Einfluss auf den klinischen Verlauf von TNBC-Patientinnen nachgewiesen werden, wobei ein rein zytoplasmatisches Expressionsmuster mit einem tendenziell schlechteren Gesamtüberleben assoziiert war. TNBC-Patientinnen mit einer hohen TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe wiesen eine bessere 5-Jahres-Überlebensrate sowie ein gleichmäßig besseres Gesamtüberleben auf. In Bezug auf das subzelluläre Verteilungsmuster zeigten Patientinnen mit einer rein zytoplasmatischen TA-MUC1-Expression ein insgesamt schlechteres Gesamtüberleben im TNBC-Kollektiv. Hierbei muss die kleine Fallzahl im TNBC-Kollektiv erwähnt werden, aufgrund derer sich eine fehlende Signifikanz mitunter erklären lässt.

In Bezug auf die Gesamtexpression von tumorassoziertem MUC1 existiert, anders als für das subzelluläre Expressionsmuster, ein breiter Konsens in der Literatur zum prognostischen Einfluss im Mammakarzinom. Eine hohe MUC1-Expression ist dabei meist mit einer prognostisch günstigeren Tumorbiologie und einem insgesamt besseren klinischen Verlauf assoziiert, wohingegen eine niedrige, oder gar fehlende, MUC1-Expression mit einem erhöhten Risiko für Fernmetasen, einem häufigeren Lymphknotenbefall und einem insgesamt schlechteren Outcome einhergeht (130, 169, 181, 210). In Übereinstimmung hiermit wiesen TNBC-Patientinnen mit einer niedrigen TA-MUC1-Expression eine tendenziell schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) sowie ein schlechteres Gesamtüberleben auf als Patientinnen mit einer hohen Gesamtexpression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Glykopeptid-Epitop TA-MUC1 im Tumorgewebe des TNBC in ähnlich hohen Maßen exprimiert wird, wie in anderen Mammakarzinom-Formen. Mit einer Nachweisrate von über 90%, bei einer zudem tumorspezifischen Expression, stellt TA-MUC1 einen grundsätzlich geeigneten Tumormarker sowie ein potenzielles Target im triple-negativen Mammakarzinom dar. Anhand des Expressionsmusters und der Gesamtexpression von TA-MUC1 lassen sich Tendenzen hinsichtlich des Gesamtüberlebens

5. Diskussion

und der Prognose von TNBC-Patientinnen ableiten. Sowohl für therapeutische als auch für diagnostische Zwecke könnte der monoklonale Antikörper GGSK-1/30 daher im TNBC gleichermaßen Anwendung finden wie im Mammakarzinom als solches.

6. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das GGSK-1/30-Glykopeptid-Epitop TA-MUC1 hinsichtlich seiner Tumorspezifität und seiner sensitiven Nachweismöglichkeit im Tumorgewebe ein geeignetes Tumorantigen im Mammakarzinom darstellt. Zur Verdeutlichung der universellen Einsatzmöglichkeit, konnte TA-MUC1 in unterschiedlichen Mammakarzinom-Subtypen und Tumorstadien - vom Frühkarzinom bis zum entdifferenzierten TNBC – in ausgeprägter Form nachgewiesen werden. Weiterhin bewies sich TA-MUC1 als unabhängiger Prognostikator des Mammakarzinoms und zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Rezidiv- und Fernmetastasen-Risiko von Brustkrebspatientinnen: Eine hohe membranständige TA-MUC1-Expression war mit einer günstigeren Prognose assoziiert, wohingegen eine starke zytoplasmatische Expression mit einem schlechteren klinischen Verlauf einherging. Diese Zusammenhänge ließen sich zum Teil auch für die TA-MUC1-Expression im TNBC reproduzieren: Im TNBC wurde TA-MUC1 seltener membranständig und häufiger zytoplasmatisch exprimiert als in den übrigen Mammakarzinomtypen - was vor dem Hintergrund des schlechteren klinischen Verlaufs von TNBC-Patientinnen kongruent zu den bereits nachgewiesenen prognostischen Zusammenhängen zur TA-MUC1-Expression war. Die nachgewiesenen Zusammenhänge führten zur Formulierung folgender Hypothese: Membranständig exprimiertes TA-MUC1 stellt eine immunogene Struktur auf Brustkrebszellen dar und ist dadurch in der Lage, eine effektiven anti-Tumor-Immunantwort zu induzieren. Ein membranständiges Expressionsmuster von TA-MUC1 ist daher mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Um diese Hypothese zu verifizieren, wäre es interessant, das hier untersuchte Patientinnen-Kollektiv auf frei-zirkulierende anti-TA-MUC1-Autoantikörper im Blutserum²⁶ zu untersuchen und die Höhe der Antikörpertiter mit dem klinischen Verlauf dieser Patientinnen zu korrelieren. Sollte sich dann zeigen, dass das in dieser Arbeit nachgewiesene Expressionsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe mit dem Ausmaß der Antikörpertiter im Blut korreliert und beides wiederum übereinstimmenden Einfluss auf das klinische *Outcome* von Brustkrebspatientinnen hat, so würde dies den Nutzen von TA-MUC1 als Tumormarker im Mammakarzinom bestätigen. Anhand der TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe ließen sich zuverlässige Rückschlüsse auf das Ausmaß einer gegen TA-MUC1 gerichteten Anti-Tumor-Immunantwort *in vivo* ziehen. Dies böte einen exzellenten

²⁶ Das Vorliegen von Serumproben zu jeder Tumorprobe war ein Einschlusskriterien für das in dieser Arbeit untersuchte Patientinnen-Kollektiv

6. Fazit und Ausblick

Ansatzpunkt für den potenziellen therapeutischen Einsatz des monoklonalen Antikörpers GSK-1/30 für die gezielte Krebs-Immuntherapie. Die tatsächliche Einsatzfähigkeit sowie die therapeutischen Grenzen des TA-MUC1-Antikörpers GSK-1/30 bleiben abzuwarten. Nichtsdestotrotz kann optimistisch davon ausgegangen werden, dass sich TA-MUC1, auf Grund seiner hervorragenden Nachweismöglichkeit, seiner tumorspezifischen Expression und der nachgewiesenen prognostischen Bedeutung, als Tumorantigen im Mammakarzinom etablieren wird.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Expression des neuen tumorassoziierten Glykoproteins „TA-MUC1“ im Brustkrebsgewebe untersucht. Ziel war es, die Eignung von TA-MUC1 als Tumormarker und therapeutische Zielstruktur im Mammakarzinom zu beschreiben. Bereits in früheren Studien konnte die Expression von TA-MUC1 durch den monoklonalen Antikörper GGSK-1/30 in Tumorproben von Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem und triple-negativem Mammakarzinom nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die TA-MUC1-Expression in dieser Arbeit erstmals anhand eines größeren und heterogenen Brustkrebs-Kollektivs untersucht. Wie in den Vorarbeiten erfolgte dies durch ein immunhistochemisches Nachweisverfahren, bei dem GGSK-1/30 als Primärantikörper diente.

In der immunhistochemischen Auswertung konnte in über 92% der untersuchten Tumorproben eine eindeutig positive TA-MUC1-Expression nachgewiesen werden; zugleich zeigte sich keine Expression von TA-MUC1 im gesunden Brustdrüsengewebe. TA-MUC1 bewies sich dadurch zunächst als exzellent nachweisbares und zudem tumorspezifisches Antigen im Mammakarzinom. Dies war für die anschließenden Korrelations- und Überlebenszeitanalysen von grundlegender Bedeutung.

Im Unterschied zu den bisherigen TA-MUC1-Studien wurde in dieser Arbeit neben der Gesamtexpression von TA-MUC1 zudem die subzelluläre Lokalisation des Glykopeptids im Tumorgewebe beurteilt. Dafür erfolgte eine Unterscheidung in vier unterschiedliche Expressionsmuster: ausschließlich zytoplasmatisch; ausschließlich membranständig; gemischt-überwiegend zytoplasmatisch oder gemischt-überwiegend membranständig. Anhand eines Follow-Up mit 241 Brustkrebspatientinnen wurden die Korrelationen zwischen der Gesamtexpression und der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 im Tumorgewebe mit histopathologischen und prognosebestimmenden Faktoren untersucht. Es zeigte sich, dass eine hohe, membranständige TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe mit einem günstigeren klinischen Verlauf assoziiert war, wohingegen eine hohe, zytoplasmatische Expression mit einer schlechteren Prognose einherging. Zurückführen ließen sich diese Zusammenhänge auf die Tatsache, dass membranständig exprimiertes TA-MUC1 - in seiner physiologischen Lokalisation - eine immunogene Struktur auf der Oberfläche von Brustkrebszellen darstellt, wodurch mutmaßlich eine effektive anti-Tumorimmunantwort im Tumorgewebe ausgelöst werden kann und das Tumorwachstum gehemmt wird. Zytoplasmatisch exprimiertes TA-

7. Zusammenfassung

MUC1 hingegen scheint, akkumuliert im Zytoplasma, eine tumorfördernde Wirkung zu entfalten. Diese resultiert vermutlich mitunter aus einer Interaktion von TA-MUC1 mit aberrant exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen im Zytoplasma, was zu der Aktivierung zellproliferationsfördernder Signalwege und letztendlich einem unkontrollierten Tumorwachstum führt.

Sowohl für das Ausmaß der Gesamtexpression als auch für das subzelluläre Expressionsmuster von TA-MUC1 im Tumorgewebe ließen sich in den Analysen signifikante prognostische Einflüsse nachweisen. In Zusammenschau mit der tumorspezifischen Expression und seiner exzellenten Nachweisbarkeit im Tumorgewebe bewies sich TA-MUC1 dadurch als überaus geeignetes Tumorantigen im Mammakarzinom. Der TA-MUC1-Antikörper GGSK-1/30 stellt somit ein potenzielles neues Werkzeug für die gezielte Diagnostik und Krebsimmuntherapie, insbesondere für Brustkrebsentitäten mit limitierten Therapieoptionen wie dem TNBC, dar.

8. Literaturverzeichnis

1. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):45-60.
2. Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci*. 2001;6:D1321-57.
3. Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, et al. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol Rev*. 1995;145:61-89.
4. Apostolopoulos V, McKenzie IF. Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev Immunol*. 1994;14(3-4):293-309.
5. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(11):674-90.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
7. Heer E, Harper A, Escandor N, Sung H, McCormack V, Fidler-Benaoudia MM. Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. *Lancet Glob Health*. 2020;8(8):e1027-e37.
8. Hanisch FG. O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem*. 2001;382(2):143-9.
9. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):874-85.
10. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(3):204.
11. Rye PD, Bovin NV, Vlasova EV, Molodyk AA, Baryshnikov A, Kreutz FT, et al. Summary report on the ISOBM TD-6 workshop: analysis of 20 monoclonal antibodies against Sialyl Lewis x and related antigens. Montreux, Switzerland, September 19-24, 1997. *Tumour Biol*. 1998;19(5):390-420.
12. Stergiou N, Gaidzik N, Heimes AS, Dietzen S, Besenius P, Jakel J, et al. Reduced Breast Tumor Growth after Immunization with a Tumor-Restricted MUC1 Glycopeptide Conjugated to Tetanus Toxoid. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(1):113-22.
13. Stergiou N, Glaffig M, Jonuleit H, Schmitt E, Kunz H. Immunization with a Synthetic Human MUC1 Glycopeptide Vaccine against Tumor-Associated MUC1 Breaks Tolerance in Human MUC1 Transgenic Mice. *ChemMedChem*. 2017;12(17):1424-8.
14. Palitzsch B, Gaidzik N, Stergiou N, Stahn S, Hartmann S, Gerlitzki B, et al. A Synthetic Glycopeptide Vaccine for the Induction of a Monoclonal Antibody that Differentiates between Normal and Tumor Mammary Cells and Enables the Diagnosis of Human Pancreatic Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55(8):2894-8.
15. Stergiou N, Nagel J, Pektor S, Heimes AS, Jakel J, Brenner W, et al. Evaluation of a novel monoclonal antibody against tumor-associated MUC1 for diagnosis and prognosis of breast cancer. *Int J Med Sci*. 2019;16(9):1188-98.
16. Barnes B. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016: Robert Koch-Institut; 2016 [cited 2019 05.07]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile.
17. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.1: AWMF online; 2018 [cited 2019 06.07].

8. Literaturverzeichnis

Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLk_S3_Mammakarzinom_2018-09.pdf.

18. Scheiden R, Sand J, Tanous AM, Capesius C, Wagener C, Wagon MC, et al. Consequences of a National Mammography Screening Program on diagnostic procedures and tumor sizes in breast cancer. A retrospective study of 1540 cases diagnosed and histologically confirmed between 1995 and 1997. *Pathol Res Pract*. 2001;197(7):467-74.
19. Krebs in Deutschland 2014 - Brustdrüse C50 Robert Koch-Institut 2017 [cited 2019 06.07]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c50_brust.pdf?_blob=publicationFile.
20. Breast Cancer Statistics Cancer Research UK: Cancer Research UK; [cited 2019 06.07]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer>.
21. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M RJ, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019. [cited 2019 06.07].
22. Hubner J, Katalinic A, Waldmann A, Kraywinkel K. Long-term Incidence and Mortality Trends for Breast Cancer in Germany. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2020;80(6):611-8.
23. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000;321(7261):624-8.
24. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*. 2001;2(3):133-40.
25. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;59(4):651-72.
26. Group. DES. Systematic Review of Cancer Screening Literature for Updating American Cancer Society Breast Cancer Screening Guidelines. Duke Clinical Research Institute, Durham, NC: Guidelines Development Group. 2014.
27. Lauby-Secretan B, Loomis D, Straif K. Breast-Cancer Screening--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1479.
28. Broeders M, Moss S, Nystrom L, Njor S, Jonsson H, Paap E, et al. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen*. 2012;19 Suppl 1:14-25.
29. Oeffinger KC, Fontham ET, Etzioni R, Herzig A, Michaelson JS, Shih YC, et al. Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update From the American Cancer Society. *JAMA*. 2015;314(15):1599-614.
30. Schaefer FK, Waldmann A, Katalinic A, Wefelnberg C, Heller M, Jonat W, et al. Influence of additional breast ultrasound on cancer detection in a cohort study for quality assurance in breast diagnosis--analysis of 102,577 diagnostic procedures. *Eur Radiol*. 2010;20(5):1085-92.
31. Ohuchi N, Suzuki A, Sobue T, Kawai M, Yamamoto S, Zheng YF, et al. Sensitivity and specificity of mammography and adjunctive ultrasonography to screen for breast cancer in the Japan Strategic Anti-cancer Randomized Trial (J-START): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10016):341-8.
32. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*. 2002;41(3A):151-2, discussion 2-3.

8. Literaturverzeichnis

33. Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S, Hanna WM. Cancer care Ontario guideline recommendations for hormone receptor testing in breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012;24(10):684-96.
34. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(2):241-56.
35. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R6.
36. Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2001;27(3):137-42.
37. Yarnold J. Early and locally advanced breast cancer: diagnosis and treatment National Institute for Health and Clinical Excellence guideline 2009. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2009;21(3):159-60.
38. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989;63(1):181-7.
39. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):195-208.
40. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2016;34(10):1134-50.
41. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, et al. Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole-breast irradiation in stages I and II invasive breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88(3):553-64.
42. Fisher B, Anderson S. Conservative surgery for the management of invasive and noninvasive carcinoma of the breast: NSABP trials. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *World J Surg*. 1994;18(1):63-9.
43. Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1365-83.
44. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;366(9503):2087-106.
45. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G, Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9804):1707-16.
46. Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN, Julian JA, MacKenzie R, Parpia S, et al. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(6):513-20.
47. Owen JR, Ashton A, Bliss JM, Homewood J, Harper C, Hanson J, et al. Effect of radiotherapy fraction size on tumour control in patients with early-stage breast cancer after local tumour excision: long-term results of a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2006;7(6):467-71.

8. Literaturverzeichnis

48. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, Jager J, et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):47-56.
49. Vrieling C, van Werkhoven E, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, et al. Prognostic Factors for Local Control in Breast Cancer After Long-term Follow-up in the EORTC Boost vs No Boost Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2017;3(1):42-8.
50. Ebtctg, McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *Lancet.* 2014;383(9935):2127-35.
51. Eisen A, Fletcher GG, Gandhi S, Mates M, Freedman OC, Dent SF, et al. Optimal systemic therapy for early breast cancer in women: a clinical practice guideline. *Curr Oncol.* 2015;22(Suppl 1):S67-S81.
52. Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol.* 2006;24(12):1940-9.
53. Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(4):CD006243.
54. Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilas G, Murray S. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist.* 2008;13(6):620-30.
55. Schneeweiss A, Denkert C, Fasching PA, Fremd C, Gluz O, Kolberg-Liedtke C, et al. Diagnosis and Therapy of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) - Recommendations for Daily Routine Practice. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2019;79(6):605-17.
56. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie: 117-164. 1908.
57. Thomas L, Lawrence H. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper. 1959:529-32.
58. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
59. Vajdic CM, van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer.* 2009;125(8):1747-54.
60. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21(2):137-48.
61. Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol.* 2004;22(6):1136-51.
62. Ochsenein AF. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2002;9(12):1043-55.
63. Muenst S, Laubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med.* 2016;279(6):541-62.
64. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991-8.
65. Engel AM, Svane IM, Rygaard J, Werdelin O. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol.* 1997;45(5):463-70.

8. Literaturverzeichnis

66. Svane IM, Engel AM, Nielsen MB, Ljunggren HG, Rygaard J, Werdelin O. Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur J Immunol.* 1996;26(8):1844-50.
67. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med.* 2000;191(4):661-8.
68. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107-11.
69. Gasser S, Raulet DH. The DNA damage response arouses the immune system. *Cancer Res.* 2006;66(8):3959-62.
70. Fridman WH, Remark R, Goc J, Giraldo NA, Becht E, Hammond SA, et al. The immune microenvironment: a major player in human cancers. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;164(1):13-26.
71. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60.
72. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
73. Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(29):4531-8.
74. Lu B, Finn OJ. T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):70-9.
75. Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity.* 1999;11(3):263-70.
76. Old LJ, Boyse EA. Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med.* 1964;15:167-86.
77. Boon T, Gajewski TF, Coulie PG. From defined human tumor antigens to effective immunization? *Immunol Today.* 1995;16(7):334-6.
78. Yang F, Yang XF. New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors. *Cell Mol Immunol.* 2005;2(5):331-41.
79. Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity.* 1999;10(3):281-7.
80. Finn OJ. Immunological weapons acquired early in life win battles with cancer late in life. *J Immunol.* 2008;181(3):1589-92.
81. Baldus SE, Engelmann K, Hanisch FG. MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004;41(2):189-231.
82. Vlad AM, Kettel JC, Alajez NM, Carlos CA, Finn OJ. MUC1 immunobiology: from discovery to clinical applications. *Adv Immunol.* 2004;82:249-93.
83. Forstner JF. Intestinal mucins in health and disease. *Digestion.* 1978;17(3):234-63.
84. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:607-34.
85. Corfield AP. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(1):236-52.
86. Linden SK, Florin TH, McGuckin MA. Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS One.* 2008;3(12):e3952.
87. Devine PL, McKenzie IF. Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays.* 1992;14(9):619-25.
88. Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1765(2):189-222.

8. Literaturverzeichnis

89. Carlstedt I, Sheehan JK, Corfield AP, Gallagher JT. Mucous glycoproteins: a gel of a problem. *Essays Biochem.* 1985;20:40-76.
90. Gupta R, Jentoft N. Subunit structure of porcine submaxillary mucin. *Biochemistry.* 1989;28(14):6114-21.
91. Timpte CS, Eckhardt AE, Abernethy JL, Hill RL. Porcine submaxillary gland apomucin contains tandemly repeated, identical sequences of 81 residues. *J Biol Chem.* 1988;263(2):1081-8.
92. Gerken TA, Revoredo L, Thome JJ, Tabak LA, Vester-Christensen MB, Clausen H, et al. The lectin domain of the polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases (ppGalNAc Ts) acts as a switch directing glycopeptide substrate glycosylation in an N- or C-terminal direction, further controlling mucin type O-glycosylation. *J Biol Chem.* 2013;288(27):19900-14.
93. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology.* 2012;22(6):736-56.
94. Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immun.* 1992;60(10):3971-8.
95. Helenius A, Aebi M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:1019-49.
96. Theodoropoulos G, Carraway KL. Molecular signaling in the regulation of mucins. *J Cell Biochem.* 2007;102(5):1103-16.
97. Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport DT, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem.* 1989;264(11):6480-7.
98. Gum JR, Jr., Hicks JW, Toribara NW, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1994;269(4):2440-6.
99. Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem.* 1998;273(12):6812-20.
100. Desseyn JL, Aubert JP, Van Seuninghen I, Porchet N, Laine A. Genomic organization of the 3' region of the human mucin gene MUC5B. *J Biol Chem.* 1997;272(27):16873-83.
101. Zhu L, Lee P, Yu D, Tao S, Chen Y. Cloning and characterization of human MUC19 gene. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(2):348-58.
102. Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem.* 1993;268(27):20563-9.
103. Shankar V, Pichan P, Eddy RL, Jr., Tonk V, Nowak N, Sait SN, et al. Chromosomal localization of a human mucin gene (MUC8) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16(3):232-41.
104. Lapensee L, Paquette Y, Bleau G. Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil Steril.* 1997;68(4):702-8.
105. Ambort D, van der Post S, Johansson ME, Mackenzie J, Thomsson E, Kregel U, et al. Function of the CysD domain of the gel-forming MUC2 mucin. *Biochem J.* 2011;436(1):61-70.
106. Desseyn JL. Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;52(2):284-92.

8. Literaturverzeichnis

107. Ambort D, Johansson ME, Gustafsson JK, Nilsson HE, Ermund A, Johansson BR, et al. Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(15):5645-50.
108. Verdugo P. Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1990;52:157-76.
109. Ambort D, Johansson ME, Gustafsson JK, Ermund A, Hansson GC. Perspectives on mucus properties and formation--lessons from the biochemical world. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(11).
110. Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000;10(5):439-49.
111. Wreschner DH, McGuckin MA, Williams SJ, Baruch A, Yoeli M, Ziv R, et al. Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Sci*. 2002;11(3):698-706.
112. Parry S, Silverman HS, McDermott K, Willis A, Hollingsworth MA, Harris A. Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283(3):715-20.
113. Carraway KL, Perez A, Idris N, Jepson S, Arango M, Komatsu M, et al. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, in cancer and epithelia: to protect and to survive. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002;71:149-85.
114. Gum JR, Jr., Ho JJ, Pratt WS, Hicks JW, Hill AS, Vinall LE, et al. MUC3 human intestinal mucin. Analysis of gene structure, the carboxyl terminus, and a novel upstream repetitive region. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26678-86.
115. Carraway KL, Price-Schiavi SA, Komatsu M, Idris N, Perez A, Li P, et al. Multiple facets of sialomucin complex/MUC4, a membrane mucin and erbb2 ligand, in tumors and tissues (Y2K update). *Front Biosci*. 2000;5:D95-D107.
116. Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem*. 2001;276(16):13057-64.
117. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442-54.
118. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):265-73.
119. Kufe DW. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene*. 2013;32(9):1073-81.
120. Pochampalli MR, el Bejjani RM, Schroeder JA. MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene*. 2007;26(12):1693-701.
121. Wei X, Xu H, Kufe D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell*. 2005;7(2):167-78.
122. Ahmad R, Raina D, Trivedi V, Ren J, Rajabi H, Kharbanda S, et al. MUC1 oncoprotein activates the I κ B kinase beta complex and constitutive NF- κ B signalling. *Nat Cell Biol*. 2007;9(12):1419-27.
123. Komatsu M, Tatum L, Altman NH, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Potentiation of metastasis by cell surface sialomucin complex (rat MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein. *Int J Cancer*. 2000;87(4):480-6.
124. Workman HC, Sweeney C, Carraway KL, 3rd. The membrane mucin Muc4 inhibits apoptosis induced by multiple insults via ErbB2-dependent and ErbB2-independent mechanisms. *Cancer Res*. 2009;69(7):2845-52.
125. Komatsu M, Jepson S, Arango ME, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates

8. Literaturverzeichnis

- primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene*. 2001;20(4):461-70.
126. Abbott KL, Aoki K, Lim JM, Porterfield M, Johnson R, O'Regan RM, et al. Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. *J Proteome Res*. 2008;7(4):1470-80.
127. McGuckin MA, Walsh MD, Hohn BG, Ward BG, Wright RG. Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Hum Pathol*. 1995;26(4):432-9.
128. Rakha EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D, Kurien T, Green AR, Paish EC, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol*. 2005;18(10):1295-304.
129. Byrne J, Horgan PG, England S, Callaghan J, Given HF. An evaluation of the usefulness of primary tumour expression of MCA and CA15-3 as prognostic indicators in breast carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 1992;18(3):230-4.
130. Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer*. 2001;91(11):1973-82.
131. Levitin F, Stern O, Weiss M, Gil-Henn C, Ziv R, Prokocimer Z, et al. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *J Biol Chem*. 2005;280(39):33374-86.
132. Macao B, Johansson DG, Hansson GC, Hard T. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(1):71-6.
133. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9:874.
134. Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlom J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma*. 1984;3(3):223-32.
135. Hayes DF, Sekine H, Ohno T, Abe M, Keefe K, Kufe DW. Use of a murine monoclonal antibody for detection of circulating plasma DF3 antigen levels in breast cancer patients. *J Clin Invest*. 1985;75(5):1671-8.
136. Ramasamy S, Duraisamy S, Barbashov S, Kawano T, Kharbanda S, Kufe D. The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop. *Mol Cell*. 2007;27(6):992-1004.
137. Bieche I, Lidereau R. A gene dosage effect is responsible for high overexpression of the MUC1 gene observed in human breast tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;98(1):75-80.
138. Lacunza E, Baudis M, Colussi AG, Segal-Eiras A, Croce MV, Abba MC. MUC1 oncogene amplification correlates with protein overexpression in invasive breast carcinoma cells. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;201(2):102-10.
139. Khodarev NN, Pitroda SP, Beckett MA, MacDermid DM, Huang L, Kufe DW, et al. MUC1-induced transcriptional programs associated with tumorigenesis predict outcome in breast and lung cancer. *Cancer Res*. 2009;69(7):2833-7.
140. Raina D, Ahmad R, Rajabi H, Panchamoorthy G, Kharbanda S, Kufe D. Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *Int J Oncol*. 2012;40(5):1643-9.
141. Ahmad R, Raina D, Joshi MD, Kawano T, Ren J, Kharbanda S, et al. MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor-kappaB p65 transcription factor. *Cancer Res*. 2009;69(17):7013-21.

8. Literaturverzeichnis

142. Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, et al. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*. 2004;5(2):163-75.
143. Pegram MD, Borges VF, Ibrahim N, Fuloria J, Shapiro C, Perez S, et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(5):R73.
144. Ibrahim NK, Yariz KO, Bondarenko I, Manikhas A, Semiglazov V, Alyasova A, et al. Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(21):6822-30.
145. Kufe DW. Targeting the human MUC1 oncoprotein: a tale of two proteins. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(1):81-4.
146. Karsten U, von Mensdorff-Pouilly S, Goletz S. What makes MUC1 a tumor antigen? *Tumour Biol*. 2005;26(4):217-20.
147. Price MR, Rye PD, Petrakou E, Murray A, Brady K, Imai S, et al. Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. San Diego, Calif., November 17-23, 1996. *Tumour Biol*. 1998;19 Suppl 1:1-20.
148. Domenech N, Henderson RA, Finn OJ. Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *J Immunol*. 1995;155(10):4766-74.
149. Soares MM, Mehta V, Finn OJ. Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection. *J Immunol*. 2001;166(11):6555-63.
150. Law AMK, Lim E, Ormandy CJ, Gallego-Ortega D. The innate and adaptive infiltrating immune systems as targets for breast cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(7):X1.
151. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*. 2001;2(4):293-9.
152. Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(10):1535-44.
153. Sames D, Chen XT, Danishefsky SJ. Convergent total synthesis of a tumour-associated mucin motif. *Nature*. 1997;389(6651):587-91.
154. Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med*. 1994;180(1):1-4.
155. Engelman K, Shen H, Finn OJ. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res*. 2008;68(7):2419-26.
156. Mason JT, O'Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(2):225-9.
157. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(6):741-8.
158. Cattoretto G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*. 1993;171(2):83-98.

8. Literaturverzeichnis

159. Dako Denmark A/S D-G, Denmark. Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse Code K5007; 4. Auflage [cited 2019 28.06.2019]. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/128486001.PDF>.
160. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
161. Beasley TM, Schumacker RE. Multiple Regression Approach to Analyzing Contingency Tables: Post Hoc and Planned Comparison Procedures. *The Journal of Experimental Education*. 1995;64(1):79-93.
162. Leitlinienprogramm Onkologie der A. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. AWMF online. 2020.
163. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
164. Ditsch N, Untch M, Thill M, Muller V, Janni W, Albert US, et al. AGO Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2019. *Breast Care (Basel)*. 2019;14(4):224-45.
165. Frykberg ER, Bland KI. Overview of the biology and management of ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*. 1994;74(1 Suppl):350-61.
166. Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K, Grady D, Henderson C. Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. *JAMA*. 1996;275(12):913-8.
167. Narod SA, Iqbal J, Giannakeas V, Sopik V, Sun P. Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. *JAMA Oncol*. 2015;1(7):888-96.
168. Mommers EC, Leonhart AM, von Mensdorff-Pouilly S, Schol DJ, Hilgers J, Meijer CJ, et al. Aberrant expression of MUC1 mucin in ductal hyperplasia and ductal carcinoma In situ of the breast. *Int J Cancer*. 1999;84(5):466-9.
169. van der Vegt B, de Roos MA, Peterse JL, Patriarca C, Hilkens J, de Bock GH, et al. The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome of invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology*. 2007;51(3):322-35.
170. Guo Q, Tang W, Inagaki Y, Midorikawa Y, Kokudo N, Sugawara Y, et al. Clinical significance of subcellular localization of KL-6 mucin in primary colorectal adenocarcinoma and metastatic tissues. *World J Gastroenterol*. 2006;12(1):54-9.
171. Heublein S, Mayr D, Egger M, Karsten U, Goletz S, Angele M, et al. Immunoreactivity of the fully humanized therapeutic antibody PankoMab-GEX is an independent prognostic marker for breast cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:50.
172. Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol*. 1993;46(2):189-90.
173. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
174. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957;11(3):359-77.
175. Rasmussen BB, Rose C, Christensen IB. Prognostic factors in primary mucinous breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 1987;87(2):155-60.
176. Li CI. Risk of mortality by histologic type of breast cancer in the United States. *Horm Cancer*. 2010;1(3):156-65.

8. Literaturverzeichnis

177. Clayton F. Pure mucinous carcinomas of breast: morphologic features and prognostic correlates. *Hum Pathol.* 1986;17(1):34-8.
178. Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, Tanaka S, Goto M, Irimura T, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma. *Histopathology.* 2003;42(1):26-36.
179. Dian D, Janni W, Kuhn C, Mayr D, Karsten U, Mylonas I, et al. Evaluation of a novel anti-mucin 1 (MUC1) antibody (PankoMab) as a potential diagnostic tool in human ductal breast cancer; comparison with two established antibodies. *Onkologie.* 2009;32(5):238-44.
180. Parham DM, Slidders W, Robertson AJ. Quantitation of human milk fat globule (HMFG1) expression in breast carcinoma and its association with survival. *J Clin Pathol.* 1988;41(8):875-9.
181. Wilkinson MJ, Howell A, Harris M, Taylor-Papadimitriou J, Swindell R, Sellwood RA. The prognostic significance of two epithelial membrane antigens expressed by human mammary carcinomas. *Int J Cancer.* 1984;33(3):299-304.
182. Hayes DF, Mesa-Tejada R, Papsidero LD, Croghan GA, Korzun AH, Norton L, et al. Prediction of prognosis in primary breast cancer by detection of a high molecular weight mucin-like antigen using monoclonal antibodies DF3, F36/22, and CU18: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 1991;9(7):1113-23.
183. Ellis IO, Hinton CP, MacNay J, Elston CW, Robins A, Owainati AA, et al. Immunocytochemical staining of breast carcinoma with the monoclonal antibody NCRC 11: a new prognostic indicator. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985;290(6472):881-3.
184. Ceriani RL, Chan CM, Baratta FS, Ozzello L, DeRosa CM, Habif DV. Levels of expression of breast epithelial mucin detected by monoclonal antibody BrE-3 in breast-cancer prognosis. *Int J Cancer.* 1992;51(3):343-54.
185. Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem.* 1995;233(2):607-17.
186. Thor A, Ohuchi N, Szpak CA, Johnston WW, Schlom J. Distribution of oncofetal antigen tumor-associated glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res.* 1986;46(6):3118-24.
187. Lottich SC, Johnston WW, Szpak CA, Delong ER, Thor A, Schlom J. Tumor-associated antigen TAG-72: correlation of expression in primary and metastatic breast carcinoma lesions. *Breast Cancer Res Treat.* 1985;6(1):49-56.
188. Munkley J. The Role of Sialyl-Tn in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):275.
189. Julien S, Videira PA, Delannoy P. Sialyl-tn in cancer: (how) did we miss the target? *Biomolecules.* 2012;2(4):435-66.
190. Blixt O, Bueti D, Burford B, Allen D, Julien S, Hollingsworth M, et al. Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Res.* 2011;13(2):R25.
191. Clark GM, McGuire WL, Hubay CA, Pearson OH, Marshall JS. Progesterone receptors as a prognostic factor in Stage II breast cancer. *N Engl J Med.* 1983;309(22):1343-7.
192. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol.* 2004;17(12):1545-54.
193. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer. *Nature.* 2015;523(7560):313-7.

8. Literaturverzeichnis

194. Ohuchi N, Page DL, Merino MJ, Viglione MJ, Kufe DW, Schlom J. Expression of tumor-associated antigen (DF3) in atypical hyperplasias and in situ carcinomas of the human breast. *J Natl Cancer Inst.* 1987;79(1):109-17.
195. Altschuler Y, Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, Apodaca G, Weisz OA, et al. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol Biol Cell.* 2000;11(3):819-31.
196. Litvinov SV, Hilkens J. The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling. *J Biol Chem.* 1993;268(28):21364-71.
197. Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 1999;21(12):1021-30.
198. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781-810.
199. Li Y, Bharti A, Chen D, Gong J, Kufe D. Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 1998;18(12):7216-24.
200. Liao HJ, Carpenter G. Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol Biol Cell.* 2007;18(3):1064-72.
201. Liao HJ, Carpenter G. Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 2009;69(15):6179-83.
202. Bitler BG, Goverdhan A, Schroeder JA. MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 10):1716-23.
203. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(20):1938-48.
204. Jhan JR, Andrechek ER. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. *Pharmacogenomics.* 2017;18(17):1595-609.
205. Duffy MJ, McGowan PM, Crown J. Targeted therapy for triple-negative breast cancer: where are we? *Int J Cancer.* 2012;131(11):2471-7.
206. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet.* 2017;389(10087):2430-42.
207. Siroy A, Abdul-Karim FW, Miedler J, Fong N, Fu P, Gilmore H, et al. MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Hum Pathol.* 2013;44(10):2159-66.
208. Ghosh SK, Pantazopoulos P, Medarova Z, Moore A. Expression of underglycosylated MUC1 antigen in cancerous and adjacent normal breast tissues. *Clin Breast Cancer.* 2013;13(2):109-18.
209. de Roos MA, van der Vegt B, Peterse JL, Patriarca C, de Vries J, de Bock GH, et al. The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and clinical outcome in 'pure' ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology.* 2007;51(2):227-38.
210. Luna-More S, Rius F, Weil B, Jimenez A, Bautista MD, Perez-Mellado A. EMA: a differentiation antigen related to node metastatic capacity of breast carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2001;197(6):419-25.

9. Lebenslauf

9. Lebenslauf

Ausbildung

- 11/ 2023 - heute **Assistenzarzt Kinder- und Jugendmedizin**
Helios Klinik Berlin-Buch
- 01/ 2023 Zusatzbezeichnung „ABS-beauftragter Arzt in der Pädiatrie“
- 07/ 21 – 10/ 23 **Assistenzarzt Kinder- und Jugendmedizin**
Klinikum Westbrandenburg, Standort Universitätsklinikum
Brandenburg a.d.H.
- 01/ 2021 – 05/2021 **Assistenzarzt Innere Medizin**
Evangelisches Krankenhaus Hubertus, Berlin-Zehlendorf
- Dezember 2020 **Approbation als Arzt**
- 06/ 2016 – 11/2023 **Promotion** – experimentelle Doktorarbeit
Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und
Frauengesundheit, Universitätsmedizin der JGU Mainz
Titel: „*Korrelation eines neuen tumorassoziierten Glykopeptids (TA-
MUC1) mit dem Follow-Up von Brustkrebs-Patientinnen*“.
Betreuerin: Prof. Walburgis Brenner
- 04/ 2014 – 11/ 2020 **Studium der Humanmedizin**, Gesamtnote: gut (2,1)
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Mainz
- 10/ 2011 – 03/ 2014 **Ausbildung zum staatlich geprüften Rettungsassistenten**
Malteser Hilfsdienst e.V., Feuerwehr der Stadt Köln
Abschluss: Staatlich geprüfter Rettungsassistent (2,0)
- 2002 – 2011 Europaschule, Integrierte Gesamtschule Paffrath, Bergisch Gladbach
Abschluss: Abitur (1,7)

10. Danksagung

Mein großer Dank gilt Frau Professor Walburgis Brenner und Frau Dr. Anne-Sophie Heimes für ihre immer herzliche, kritische und engagierte Betreuung meiner Arbeit. Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeiter*innen und Doktorand*innen des Forschungslabors für die schöne und produktive Zeit im Labor bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei den zuständigen Mitarbeiter*innen des IMBEI für die statistische Beratung sowie beim Institut für Pathologie der Unimedizin Mainz für die Unterstützung bei der immunhistochemischen Auswertung.

Ich danke meiner Frau Carina, für das Vorantreiben in den vielen zähen Phasen dieser Arbeit und für ihren immerwährenden scharfen Blick für Ordnung und Struktur.

Zum Schluss möchte mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in meinem Weg immer bedingungslos unterstütz haben. Ich empfinde das nicht als selbstverständlich und weiß dieses große Glück sehr zu schätzen.