

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

MUC1-Expression im Mammakarzinom und Korrelation
mit der verändert glykosylierten Variante TA-MUC1

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

Vorgelegt von

Carina Ribeiro-Fries
aus Berlin

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12.11.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturdiskussion.....	3
2.1	Mammakarzinom	3
2.1.1	Epidemiologie	3
2.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	3
2.1.3	Histopathologische Klassifikation und klinisches Grading	4
2.1.4	Prognostische und prädiktive Faktoren.....	8
2.1.5	Diagnostik.....	11
2.1.6	Therapie.....	14
2.2	Tumorantigene.....	18
2.2.1	Mucin1.....	19
2.2.2	Mucin1 im Tumor.....	22
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Materialien	26
3.2	Methoden	29
3.2.1	Patientenkollektiv und Gewebeproben.....	29
3.2.2	Kontrollfärbungen	29
3.2.3	Immunhistochemie	30
3.2.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	33
3.2.5	Statistische Auswertung	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Patientenkollektiv und klinische Parameter.....	40
4.2	MUC1-Expression im Brustdrüsengewebe	42
4.2.1	MUC1-Expression im gesunden Gewebe.....	42
4.2.2	MUC1-Expression im Tumorgewebe	43
4.3	Korrelation zwischen Gesamtexpression und subzellulärer Lokalisation von MUC1.....	46
4.4	Korrelation von MUC1 mit patientenbezogenen und histopathologischen Daten.....	50
4.4.1	Expression von MUC1 in Abhängigkeit des Alters bei Erstdiagnose	50
4.4.2	Expression von MUC1 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp.....	51
4.4.3	Korrelation von MUC1 und T-Stadium im Tumorgewebe.....	54
4.4.4	Korrelation von MUC1 im Tumorgewebe und dem Nodalstatus	56
4.4.5	Korrelation von MUC1 und dem Tumorigradung	57

4.4.6	Korrelation von MUC1 und molekularen Subtypen im Tumorgewebe ...	61
4.4.7	Korrelation von MUC1 in Abhängigkeit zur Herdlokalisation	64
4.5	MUC1-Expression in Bezug auf das Überleben und als prognostischer Faktor.....	65
4.5.1	Gesamtexpression von MUC1 in Bezug auf das Gesamtüberleben	65
4.5.2	Subzelluläre Expression von MUC1 in Bezug auf das Gesamtüberleben	67
4.5.3	Gesamtexpression von MUC1 in Bezug auf das metastasenfrie Überleben.....	75
4.5.4	Subzelluläre Expression von MUC1 in Bezug auf das metastasenfrie Überleben.....	77
4.5.5	Gesamtexpression von MUC1 in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben.....	86
4.5.6	Subzelluläre MUC1-Expression in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben.....	87
5	Diskussion.....	96
5.1	Vergleich der Expression von MUC1 und TA-MUC1 im Mammakarzinom	97
5.2	MUC1 und TA-MUC1 als tumorspezifische Marker des Mammakarzinoms.....	101
5.3	Betrachtung der subzellulären Lokalisation von MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe.....	103
5.4	Korrelation von MUC1 und biologischen Markern des Mammakarzinoms.....	105
5.5	Korrelation der MUC1-Expression mit klinisch histopathologischen Daten.....	106
5.6	Einfluss von MUC1 und TA-MUC1 auf die Prognose von Brustkrebspatientinnen	109
6	Fazit und Ausblick	113
7	Zusammenfassung	115
8	Literaturverzeichnis.....	a
9	Danksagung.....	p

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Immunantwort nach Antigenklassifikation (89).....	18
Abbildung 2 Schematische Darstellung von Mucin1 im gesunden Epithel.....	21
Abbildung 3 Veränderungen von Mucin1 in gesundem Epithelgewebe gegenüber Mucin1 im Tumorgewebe (97).....	23
Abbildung 4 Cytoplasmatische MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5	34
Abbildung 5 Cytoplasmatisch-membranöse MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5.....	35
Abbildung 6 Membranös-cytoplasmatische MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5.....	36
Abbildung 7 Cytoplasmatische MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5	37
Abbildung 8 MUC1-Expression im gesunden Brustdrüsengewebe durch den mAK VU4H5 .	42
Abbildung 9 Häufigkeitsverteilung der MUC1-Gesamtexpression im Tumorgewebe mittels VU4H5	43
Abbildung 10 Gesamtexpression MUC1 vs. TA-MUC1 im Tumorgewebe.....	44
Abbildung 11 Häufigkeitsverteilung der subzellulären Lokalisationen von MUC1 im Tumorgewebe mittels VU4H5	45
Abbildung 12 Gegenüberstellung der subzellulären Expression von MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe.....	46
Abbildung 13 Verteilung der subzellulären MUC1-Expressionen nach IRS.....	47
Abbildung 14 Gegenüberstellung der subzellulären MUC1-Lokalisationen nach Mediengruppen	48
Abbildung 15 Gegenüberstellung einzelner subzellulärer MUC1-Lokalisationen nach Mediengruppen	49
Abbildung 16 MUC1-Gesamtexpression in Korrelation zum Alter bei Erstdiagnose	51
Abbildung 17 MUC1-Gesamtexpression unterteilt nach histologischem Subtyp	52
Abbildung 18 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation mit der Tumorhistologie.....	54
Abbildung 19 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum Tumorstadium	56
Abbildung 20 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum Lymphknotenstatus	57
Abbildung 21 MUC1-Gesamtexpression in Korrelation mit Gradingstadien	58
Abbildung 22 MUC1-Gesamtexpression nach Mediengruppen in Abhängigkeit der Gradingstadien	59
Abbildung 23 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum Grading.....	60
Abbildung 24 MUC1-Gesamtexpression in Korrelation zum molekularen Subtyp	62
Abbildung 25 MUC1 Gesamtexpression in Korrelation zum HER2-Status	63
Abbildung 26 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum HER2-Status	64
Abbildung 27 Überlebenszeitkurven der MUC1-Gesamtexpression in Bezug zum Gesamtüberleben.....	66
Abbildung 28 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben.....	70
Abbildung 29 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression unterteilt nach Median auf das Gesamtüberleben.....	72

Abbildung 30 Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das metastasenfreie Überleben....	76
Abbildung 31 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das metastasenfreie Überleben.....	80
Abbildung 32 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression unterteilt nach Median auf das metastasenfreie Überleben	83
Abbildung 33 Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das krankheitsfreie Überleben	86
Abbildung 34 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das krankheitsfreie Überleben	90
Abbildung 35 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression unterteilt nach Median auf das krankheitsfreie Überleben.....	93
Abbildung 36 Schematische Darstellung des Mucin1-Moleküls mit den Epitopen MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe.....	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Histologisches Grading des Mammakarzinoms	6
Tabelle 2 TNM-Klassifikation nach UICC Kriterien (21).....	7
Tabelle 3 UICC- TNM-Klassifikation der malignen Tumoren (Tumorstadieneinteilung in der 8. Auflage) (21)	8
Tabelle 4 intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms (S3Leitlinie, Version 08/2019)(21).....	11
Tabelle 5 Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 6 Gebrauchsmaterialien	27
Tabelle 7 Lösungen und Puffer	27
Tabelle 8 Substanzen.....	28
Tabelle 9 Kit-Systeme	28
Tabelle 10 Antikörper	28
Tabelle 11 Tumor- und patientenbezogene Daten für das Mammakarzinomkollektiv.....	40
Tabelle 12 Einteilung der Risikoprofile anhand molekularpathologischer Marker.....	61
Tabelle 13 Vergleich der Überlebensraten für das OVS in Abhängigkeit der MUC1-Gesamtexpression	66
Tabelle 14 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das OVS beim Mammakarzinom	67
Tabelle 15 Vergleich der Überlebensraten für das OVS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Expression.....	68
Tabelle 16 Vergleich der Überlebensraten für das OVS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation unterteilt nach Median	71
Tabelle 17 : Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (cytoplasmatische vs. restliche).....	73
Tabelle 18 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (mc vs. restliche).....	73
Tabelle 19 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (cm vs. restliche).....	74
Tabelle 20 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (negative vs. restliche)	75
Tabelle 21 Vergleich der Überlebensraten für das MFS in Abhängigkeit der MUC1-Gesamtexpression	76
Tabelle 22 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das MFS beim Mammakarzinom.....	77
Tabelle 23 Vergleich der Überlebensraten für das MFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation.....	78
Tabelle 24 Vergleich der Überlebensraten für das MFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation unterteilt nach Median	81
Tabelle 25 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (cytoplasmatische vs. restliche).....	84
Tabelle 26 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (mc vs. restliche).....	84

Tabelle 27 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (cm vs. restliche).....	85
Tabelle 28 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (negative vs. restliche)	85
Tabelle 29 Vergleich der Überlebensraten für das DFS in Abhängigkeit der MUC1-Gesamtexpression	86
Tabelle 30 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der MUC1-Gesamtexpression bezogen auf das DFS beim Mammakarzinom	87
Tabelle 31 Vergleich der Überlebensraten für das DFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation.....	88
Tabelle 32 Vergleich der Überlebensraten für das DFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation unterteilt nach Median	91
Tabelle 33 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (cytoplasmatisch vs. restliche)	94
Tabelle 34 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (mc vs. restliche)	94
Tabelle 35 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (cm vs. restliche)	95
Tabelle 36 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (negative vs. restliche).....	95

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie	DSF	<i>disease-free survival</i>
AGO	die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie	ED	Erstdiagnose
AG	Antigen	EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
adj.	adjustiert	ER	Östrogenrezeptor
ATM	<i>ataxia teleangiectasia mutated</i>	ERB1	<i>epidermal growth factor receptor 1</i>
AI	Aromataseinhibitor	et al.	<i>et alii und andere</i>
BEO	Brusterhaltende Operation	FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin- eingebettetes Gewebe
BET	Brusterhaltende Therapie	HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
BMI	<i>Body-mass-index</i>	HPF	<i>high power field</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>	HR	<i>Hazard Ratio</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>	IRS	<i>Immunoreactive Score</i>
c	cytoplasmatisch	ILC	invasiv lobuläres Karzinom
cm	gemischt zytoplasmatisch- membranös	IHC	Immunhistochemie
CTA	<i>Cancer-testis-antigen</i>	JÜR	Jahres-Überlebensrate
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>	KI	Konfidenzintervall
C- terminal	carboxyl-Terminus	LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
cyt.	cytoplasmatisch	LN	lobuläre Neoplasie
DCIS	duktales Carcinoma in situ	LK	Lymphknoten
df	<i>number of degrees of freedom</i>	m	membranständig
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mAK	monoklonaler Antikörper

mc	membranös-cytoplasmatisch	TNBC	<i>Triple negative Breast Cancer</i>
MCF7	<i>Michigan Cancer Foundation 7</i>	TNM	<i>tumor nodes metastasis</i> Klassifikation solider Tumoren
MFS	metastasenfreies-Überleben	TNF	<i>Tumor-necrosis-factor</i>
MUC1	Antigenvariante von Mucin1	TSA	tumorspezifisches Antigen
MRT	Magnet-Resonanz- Tomographie	UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
NST	invasives Karzinom vom nicht- spezifischen Typ	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
OVS	<i>Overall Survival,</i> Gesamtüberleben	VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
PARP	Poly (ADP-ribose) - Polymerase-Enzyme	VE- Wasser	vollentsalztes Wasser
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	WHO	<i>World Health Organization</i>
PR	Progesteronrezeptor		
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase		
SD	<i>Standard deviation,</i> Standardabweichung		
SEA	<i>sea-urchin sperm protein,</i> <i>enterokinase and agrin</i>		
sTN	sialyliertes Thomsen- Friedenreichtantigen		
STP- Region	Serin-, Threonin- und Prolin- Aminosäuresequenzen		
TAA	tumorassoziiertes Antigen		
TA- MUC1	tumorassoziiertes Mucin 1		

1 Einleitung

Das Verständnis für die molekularen Grundlagen der Tumorbologie sowie die Weiterentwicklung personalisierter, zielgerichteter Therapieansätze ist in den letzten Jahren deutlich gewachsen. Dies spiegelt sich in der Tatsache wider, dass zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) und Immuntherapien den größten Anteil aktuell angemeldeter Neuzulassungen in der Krebstherapie innerhalb der EU ausmachen (2). Als Angriffspunkt werden molekulare Strukturen genutzt, die während der malignen Transformation von Zellen neu entstehen oder aberrant im Tumor exprimiert sind. Im Idealfall liegen diese nicht bzw. nur in geringem Maß in gesunden Zellen vor, so dass durch eine entsprechend zielgerichtete Therapie das Tumorgewebe spezifisch eliminiert werden kann bei gleichzeitig günstigerem Nebenwirkungsprofil. Für das Mammakarzinom konnten bereits verschiedene Rezeptoren, wie der Östrogen- und Progesteronrezeptor sowie der Wachstumsfaktorrezeptor HER2, identifiziert werden, welche mit einer zielgerichteten Therapie adressiert werden und nun bereits fester Bestandteil adjuvanter Therapien sind.

Von den vielen verschiedenen als Targets genutzten Angriffspunkten wird in dieser Arbeit das Augenmerk auf das im Brustkrebs exprimierte Antigen Mucin1 gelegt. Mucin1 ist ein physiologisch im Brustgewebe apikal an der Basalmembran exprimiertes Glykoprotein, das im Mammakarzinom in bis zu 90% überexprimiert vorliegt. Zudem weist es eine qualitativ stark veränderte Expression im Tumorgewebe auf, sodass es ein ideales Zielantigen darstellt. Viele der gegen Mucin1 gerichteten Antikörper binden sowohl das im Tumor als auch das im gesunden Gewebe exprimierte Mucin1.

Um Mucin1 als Target in der zielgerichteten Therapie oder auch in der Immuntherapie nutzen zu können, wurde in der Immunologie der Universitätsmedizin Mainz der monoklonale Antikörper GGSK-1/30 entwickelt. Dieser ist im Gegensatz zu herkömmlichen Mucin1-Antikörpern ausschließlich gegen eine im Tumor exprimierte Antigensequenz (TA-MUC1) gerichtet und bindet das Antigen somit tumorspezifisch. Basierend auf dieser Grundlage werden in dieser Dissertation der Mucin1-Typ-unspezifische monoklonale MUC1-Peptid-Antikörper VU4H5 mit dem neuen tumorspezifischen Glykopeptid-Antikörper GGSK-1/30 bezüglich ihres Expressionsverhalten im Tumor und ihrer prognostischen Wertigkeit verglichen.

An einem Brustkrebs-Patientenkollektiv, an dem in der Dissertation von Herrn Dr. Peter Fries die (TA)-MUC1-Expression mittels des Antikörper GGSK-1/30 bestimmt wurde (1), wurde MUC1 mittels des Antikörpers VU4H5 immunhistochemisch nachgewiesen. Ziel dieser Untersuchung war es, mögliche Unterschiede im Expressionsverhalten im Tumorgewebe

Einleitung

unter Verwendung der beiden Antikörper zu identifizieren. Dabei sollte insbesondere auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

1. Kann GGSK-1/30 gleichwertig Tumorzellen im Brustgewebe detektieren bzw. binden, wie der bereits etablierte MUC1-Antikörper VU4H5?
2. Zeigen sich Unterschiede in der Korrelation zwischen den Antikörpern gegen MUC1 und gegen TA-MUC1 mit folgenden Parametern: Histopathologische Daten, Follow-up-Daten, klinischen Daten, subzelluläre Expression?
3. Ist (VU4H5) MUC1 ein geeigneter unabhängiger Prognostikator bzw. für therapeutische Zwecke im Mammakarzinom einsetzbar?

2 Literaturdiskussion

2.1 Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist in Deutschland mit ca. 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Jede 8. Frau erkrankt in ihrem Leben an Brustkrebs. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren. In den letzten Jahren konnte ein Absinken der Mortalität beobachtet werden. Die relative 10-Jahres-Überlebensrate lag zuletzt bei 83 %. Dennoch bleibt das Mammakarzinom die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen und stellt mit ca. 18.500 Todesfällen pro Jahr in Deutschland eine in der Gesellschaft relevante Erkrankung dar (2).

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die zugrundeliegende Ursache für die Entstehung von Brustkrebs ist noch nicht abschließend geklärt (3). Dennoch lassen sich einige Risikofaktoren identifizieren, die eine Entwicklung invasiver Tumoren der Brustdrüse begünstigen. Diese können in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Risikofaktoren unterteilt werden:

Zu den beeinflussbaren Risiken gehören zum einen Lifestylefaktoren, wie ein vermehrter Alkoholkonsum, ein *BMI* über 25 und Nikotinabusus (4). Zum anderen zählen hierzu aber auch reproduktive Faktoren, wie ein höheres Lebensalter der Frau zum Zeitpunkt der ersten Geburt, Nulliparität sowie das Nicht-Stillen, die alle mit einem höheren Risiko für die Entstehung von Brustkrebs assoziiert sind (5, 6).

Ein hohes Lebensalter, eine familiäre (genetische) Belastung, sowie die Brustgewebisdichte und der Hormonstatus gehören zu den nicht-beeinflussbaren Risikofaktoren. Bei letzterem spielen die Hormone Östrogen und Progesteron eine wesentliche Rolle in der Tumorentwicklung. Eine frühe Menopause und ein damit einhergehender fallender Östrogenspiegel senken das Brustkrebs-Risiko, wohingegen prämenopausal eingesetzte orale Kontrazeptiva (7) und langjährige postmenopausale Östrogensersatztherapien das Risiko für Brustkrebs erhöhen können (8).

Etwa 5 % aller Neoplasien der Brust lassen sich auf eine *hereditäre* Form zurückführen, 25 % davon auf eine Keimbahnmutationen im *Breast Cancer 1*- oder *Breast Cancer 2*-Gen (BRCA1,

BRCA2) (9). Beide Gene haben unterschiedliche regulatorische Funktionen als Tumorsuppressorgene und beeinflussen das DNA-Reparatursystem der Zelle (10). Das kumulative Risiko an Brustkrebs zu erkranken beträgt bei *BRCA1*-Mutationen 65 % und bei *BRCA2*-Mutationen 45 % (11). Hereditäre Formen treten vermehrt bereits im mittleren Erwachsenenalter auf und haben oft gemeinsame Charakteristika (12). Histologisch werden bei *BRCA1*-Mutationen häufig *triple-negative* Mammakarzinome gefunden. Tumoren mit *BRCA2*-Mutationen zeigen meist ein höheres Grading. Es existieren weitere Brustkrebsbegünstigende Mutationen, wie die der Tumorsuppressorgene *TP53*, *PALB2* und *ATM*, die jedoch einen wesentlich geringeren Anteil hereditärer Mammakarzinome ausmachen (13-15).

2.1.3 Histopathologische Klassifikation und klinisches Grading

2.1.3.1 Histopathologische Klassifikation

Die histologische Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt anhand der WHO-Klassifikation von 2012 in der vierten Auflage. Sie unterscheidet anhand des morphologischen Erscheinungsbildes in unterschiedliche histologische Typen. Folgend werden nur die im Studienkollektiv erfassten und zugleich am häufigsten vorkommenden Entitäten aufgeführt:

Nichtinvasive Karzinome

Nichtinvasive Karzinome, bzw. *in situ*-Karzinome sind prä-maligne Vorläuferläsionen. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt eine Proliferation maligner epithelialer Zellen vor, ohne dass dabei die Basalmembran durchbrochen wird. Sie bilden keine Metastasen aus, werden jedoch als Präkanzerosen eingestuft, da eine Progression zum invasiven Karzinom möglich ist (16). Das **duktale Carcinoma in situ (DCIS)** ist eine Präkanzerose des Mammakarzinoms, das durch unterschiedliche histologische Wachstumsmuster eine heterogene Gruppe darstellt, die sich in ihrem Malignitätsgrad unterscheidet (16, 17). Seinen Ursprung hat das DCIS in den Milchgängen der Brustdrüse. Es liegt häufig begleitend zu invasiven Karzinomen im Gewebe vor (18, 19). Davon abzugrenzen ist die **lobuläre Neoplasie (LN)**, die sowohl das **lobuläre Carcinoma in situ (LCIS)** als auch die **atypische lobuläre Hyperplasie** umfasst (20). Die LN wird nach der aktuellen S3-Leitlinie als nicht-obligate Vorläuferläsion definiert und hat ihren Ursprung in den Drüsenläppchen, vorzugsweise in den terminalen duktulo-lobulären Einheiten (21).

Invasive Karzinome

Die invasiven Karzinome lassen sich wie folgt einteilen:

Das invasive Karzinom **ohne speziellen Typ (NST)**: Dieses ist mit 50-80 % die vorherrschende invasive Entität des Mammakarzinoms. In dieser Gruppe sind alle Tumortypen erfasst, die keinem speziellen Typ zugeordnet werden können. Die äquivalente Bezeichnung invasiv duktales Karzinom wird heutzutage immer mehr verlassen, da es einen duktalem Ursprung annehmen lässt, der nach heutigem Forschungsstand nicht eindeutig nachzuweisen ist (22). Zweithäufigster Vertreter der invasiven Karzinome ist das **invasiv lobuläre Karzinom (ILC)**, mit einem Anteil von 5-15 %. Es reiht sich mit anderen Formen in die Gruppe des invasiven Karzinoms des speziellen Typs ein und ist charakterisiert durch ein vermehrt kleinzelliges, infiltrierendes Wachstum (22). Wesentlich seltener sind der **tubuläre** und der **kribriforme Zelltyp**. Zusammen machen sie weniger als 3 % aller Tumorentitäten im Brustgewebe aus und stellen vorwiegend gut differenzierte Tumoren dar. Ähnlich präsentiert sich das **muzinöse** invasive Karzinom, das mit einem Anteil von 2 % vertreten ist. Es zeigt selten Zellatypien und ist charakterisiert durch ein vorwiegend langsames Wachstumsmuster (23).

2.1.3.2 Grading / histologischer Differenzierungsgrad

Das Grading dient zur weiteren Klassifizierung invasiver Tumoren und gibt Auskunft über den jeweiligen Malignitätsgrad. In der Mammaphathologie wird der Differenzierungsgrad nach dem *Elston und Ellis Schema* semiquantitativ bestimmt (Tabelle 1). Hierfür werden die morphologischen Parameter Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate herangezogen (24). Daraus ergibt sich eine Einteilung in drei Tumorgade (G1-G3), die für die Prognosebestimmung und Therapieentscheidung herangezogen werden.

Tabelle 1 Histologisches Grading des Mammakarzinoms

Modifiziert nach Elston und Ellis (21). Die Beurteilung der Gradingstadien im Mammakarzinom setzt sich aus drei mikroskopisch erhobenen Kategorien zusammen: tubuläre Differenzierung, Zellkernpolymorphien und die Mitoserate. Jede Kategorie erhält einen Scorewert von 1-3. Die Scoresumme entspricht einem Gradingstadium (G1-G3). High power field (HPF), Gesichtsfeldgröße mit einem Gesichtsfelddurchmesser von 0,45 mm entsprechend einem einfachen Lichtmikroskop mit Sehfeldzahl 18 ohne Großfeldtubus.

Scorewerte	Tubulusausbildung	Kernpolymorphie	Mitosen je HPF
1	>75 %	gering	0-5/10HPF
2	10-75 %	mittelgradig	6-11/10HPF
3	<10 %	stark	>12/10HPF

G-Gruppe	Scoresumme	Definition	Malignitätsgrad
G1	3-5	gut differenziert	gering
G2	6-7	mäßig differenziert	mäßig
G3	8-9	schlecht differenziert	hoch

2.1.3.3 Histopathologisches Staging

Das Mammakarzinom wird klinisch anhand der UICC-TNM-Klassifikation (UICC: Union Internationale Contre le Cancer) in der aktuellen Version von 2017 eingeteilt (Stand 2023) (25). Es wird sowohl die lokale als auch die überregionale Tumorausbreitung beurteilt (Tabelle 2). Verwendete Parameter sind das **Tumorstadium (T)**, das die Ausbreitung des Primärtumors angibt, der **regionäre Lymphknotenbefall (N)** und das Vorliegen von **Fernmetastasen (M)**. Die Klassifikation hat eine große prognostische und therapeutische Relevanz und dient der einheitlichen internationalen Vergleichbarkeit. Zur vereinfachten Handhabung teilt die UICC die TNM-Klassifikation nochmals in einzelne Tumorstadien von I-IV ein, die im klinischen Gebrauch Einzug gefunden haben (Tabelle 3). Darüber hinaus werden weitere Kriterien im Staging mit prognostischer Relevanz berücksichtigt, wie die Lymphgefäßinvasion (L) und Veneninvasion (V) in der Tumorumgebung (26, 27).

Tabelle 2 TNM-Klassifikation nach UICC Kriterien (21)

T- Tumorstadium		
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
Tis		Carcinoma in situ: DCIS/LCIS/Morbus Paget der Mamille ohne Tumornachweis
T1		Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser
	T1mi	Mikroinvasion 0,1 cm
	T1a	> 0,1 cm bis 0,5 cm
	T1b	> 0,5 cm bis 1,0 cm
	T1c	> 1 cm bis 2 cm
T2		> 2 cm bis maximal 5 cm
T3		> 5 cm
T4		Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
	T4a	Ausdehnung auf Brustwand
	T4b	Ödem oder Ulzeration der Haut
	T4c	Kriterien 4a und 4b
	T4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom
N: befallene Lymphknoten		
N1		Metastasen ipsilateral axillär Level I und II
N2	N2a	Metastasen ipsilateral Lymphknoten miteinander verbunden oder an anderen Strukturen fixiert Metastasen entlang A. mammaria interna
	N2b	
N3	N3a	Metastasen ipsilateral infraklavikulär
	N3b	Metastasen ipsilateral entlang A. mammaria interna und axillär
	N3c	Metastasen ipsilateral supraklavikulär

M: Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

*Tabelle 3 UICC- TNM-Klassifikation der malignen Tumoren (Tumorstadieneinteilung in der 8. Auflage) (21)
(is = in situ, mi = Mikroinvasion)*

UICC- Stadieneinteilung			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T0, T1	N1mi	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	Alle T	N3	M0
Stadium IV	Alle T	Alle N	M1

2.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) definiert einen prognostischen Faktor als einen mit dem Krankheitsverlauf in Korrelation stehenden Einflussfaktor. Die Einteilung erfolgt in klassische und in molekularpathologische Faktoren. Beide zusammen ermöglichen eine detaillierte Tumorcharakterisierung und somit eine individuelle Risikoeinschätzung und angepasste Therapieplanung. Demgegenüber können prädiktive Faktoren bis zu einem gewissen Grad das Therapieansprechen vorhersagen (28). Zu den klassischen Prognosefaktoren beim Mammakarzinom zählen unter anderem **Tumorgroße** und **Lymphknotenstatus**. Beide haben eine direkte, unabhängige Korrelation zur Überlebensrate. So korreliert ein vermehrter axillärer Lymphknotenbefall von vier oder mehr

Lymphknoten (LK) unabhängig von der Tumorgröße mit einer geringeren Überlebensrate und einem vermehrten Auftreten von Rezidiven. Die Tumorgröße hat ihren größten Effekt auf die Mortalität bei gleichzeitigem positivem LK-Status (29).

Das **Alter** zum Zeitpunkt der Diagnosestellung spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle in der Prognoseabschätzung. Prämenopausal erkrankte Patientinnen haben eine deutlich schlechtere Prognose bei einem Ersterkrankungsalter unter 35 Jahren. Verglichen mit älteren Patientinnengruppen weisen diese Tumoren ein aggressiveres Wachstum auf und gehören vermehrt Subtypen an, die mit einem schlechten Outcome assoziiert sind (30, 31).

Weitere prognostische Aussagen können durch die Bestimmung der **histologischen Typen** getroffen werden. Die beste Prognose haben das tubuläre und das kribriforme Mammakarzinom mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von fast 90-100 %. Ähnlich zeigt sich das muzinöse Karzinom mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 80-100 %. Charakteristisch sind hier ein positiver Hormonrezeptorstatus und eine fehlende HER2-Expression. Auch das invasiv lobuläre Karzinom hat anfangs durch sein geringes Progressionsrisiko eine gute Prognose. Diese verschlechtert sich bei Betrachtung der Langzeitüberlebenskurven jedoch durch ein vermehrt multizentrisches Vorkommen. Das am häufigsten vorkommende NST zeigt im Vergleich zu anderen Typen das schlechteste Outcome; zur endgültigen Beurteilung muss der weitere histologische Subtyp hinzugezogen werden. Das **Grading** hat neben der Prognoseeinschätzung einen wesentlichen Einfluss auf die therapeutische Entscheidung. So wird aufgrund eines hohen Gradingstadiums bevorzugt eine neoadjuvante Therapie in Betracht gezogen (32). Der Differenzierungsgrad korreliert signifikant mit dem rezidivfreien Überleben und dem Gesamtüberleben (24), sodass schlecht differenzierte Tumoren (G3) eine ungünstigere Prognose als gut differenzierte Karzinome (G1) haben.

Die Aussagekraft der einzelnen Parameter ist durch bestimmte Risikokonstellationen begrenzt und bedarf bspw. bei Tumoren mit niedrigem T-Status und negativem LK-Status weiterer Instrumente zur Risiko- und Prognoseabschätzung (33). Dieser Problematik konnte durch die Erhebung neuer Biomarker bereits zum Teil entgegengewirkt werden.

Molekularbiologische Differenzierung

Die Erhebung molekularbiologischer Eigenschaften des Tumors präzisiert die Prognose und Prädiktion des Mammakarzinoms. Die Bestimmung folgender Marker hat sich dabei bereits als geeignet erwiesen: Hormonrezeptoren, HER2-Status und Ki67-Index.

Gesundes Brustdrüsengewebe unterliegt hormonellen Einflüssen, die über **Progesteron-** und **Östrogenrezeptoren** (ER; PR) zelluläre Signaltransduktionen regulieren und unter anderem

die Zellproliferation beeinflussen. Je nach Differenzierungsgrad von Brusttumoren kann es zum Verlust dieser Rezeptoren kommen und somit zu einem Verlust der endokrinen Kontrolle. Dies betrifft etwa ein Drittel aller Brusttumoren und ist mit einem schlechteren Outcome assoziiert (34, 35). Die Hormonrezeptorbestimmung ermöglicht die Vorhersage über das Ansprechen einer endokrinen Therapie.

HER2 ist ein Protoonkogen, welches in manchen Tumoren amplifiziert vorliegt und sowohl als Prädiktor für das Rezidivrisiko als auch für das Gesamtüberleben dient. Eine Genamplifikation oder Überexpression von HER2-Proteinen führen zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf, einer höheren Rezidivrate und einer erhöhten Mortalität (36, 37). Auch **Ki67**, ein Parameter, der die Proliferationsrate angibt, gehört heute zur Routinediagnostik. Vor allem bei HR-positiven Tumoren gibt er prädiktive Auskunft über das Therapieansprechen auf Chemotherapeutika. Ein einheitlicher *Cut-off-Wert* existiert nicht; dennoch spricht sich die aktuelle S3-Leitlinien bei der Entscheidung zur adjuvanten Chemotherapie HR-positiver Tumoren für die Hinzunahme von Ki67 aus (26, 38).

Die St. Gallener Konsensus Konferenz fassen aus den molekularbiologischen Parametern vier **intrinsische Subtypen** zusammen (Tabelle 4). Anhand dieser können der klinische Verlauf und das Therapieansprechen eingeschätzt werden. Die genaue Bestimmung erfolgt anhand von RNA-Genexpressionsprofilen. Vereinfacht können diese auch aus immunhistochemischen Analysen der Gewebeproben erfolgen. Tumoren vom Typ Luminal A sind mit fast 60 % am häufigsten vertreten und durch eine weniger aggressive Tumorbilogie mit der besten Prognose assoziiert. Luminal B gilt als deutlich aggressiverer Subtyp, was durch einen hohen Proliferationsindex bzw. HER2-positiver Rezeptorexpression bedingt ist. Zuletzt sind noch der Basal-ähnliche Typ und der HER2-Typ zu nennen. Sie sind beide HR-negativ und unterscheiden sich in ihrer HER2-Expression. Beide haben eine schlechte Überlebensrate und ein geringes rezidivfreies Überleben (39, 40).

Die Grundlage der Entscheidungsfindung für die Auswahl der bestmöglichen Brustkrebstherapie hat sich zunehmend in den letzten Jahren gewandelt. Die klassische Tumoranalyse wird von der molekularen Analyse ergänzt. Erst durch die Hinzunahme dieser prognostischen und prädiktiven Faktoren konnte eine individuelle Prognoseabschätzung und Verbesserung der Therapie erzielt werden.

Tabelle 4 *intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms (S3Leitlinie, Version 08/2019)(21)*

Intrinsischer Subtyp	Histologische Parameter
Luminal A	Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positiv, HER2-negativ, Ki67 niedrig
Luminal B	HER2-negativ, Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positiv, Ki67 hoch oder HER2-positiv, Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positiv, jedes Ki67
HER2-positiv	HER2-positiv, Östrogen- und Progesteronrezeptor negativ
Basal-ähnlich	Triple negativ (HER2-negativ, Östrogen- und Progesteronrezeptor-negativ)

2.1.5 Diagnostik

Das Mammakarzinom ist im Frühstadium meist asymptomatisch, sodass ohne geeignete Früh-Diagnostik Karzinome der Brust erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt werden. Die Detektion von Karzinomen im Frühstadium ermöglicht den Einsatz weniger belastender und häufiger kurativer Therapie-Optionen.

Ein wichtiges Instrument in der Früherkennung von Brustkrebs ist die Anamnese. Sie ermöglicht es, familiäre Belastungen und Risikofaktoren, die zur Entwicklung von Brustkrebs beitragen, zu erkennen und diagnostische Maßnahmen einzuleiten. Jede Frau ab dem 30. Lebensjahr hat Anspruch auf eine ärztliche Untersuchung mit Inspektion und Palpation der Brust (41). Bei der Inspektion der entkleideten Brust wird auf klinische Zeichen geachtet, die mit einer Brustkrebserkrankung assoziiert sein können, wie Orangenhaut, Mamillenretraktion, Ausfluss, Rötungen und Schwellungen bzw. Größenunterschiede der Brust. Anschließend erfolgt die systematische Palpation der Brust unter Einschluss der supra- und infraklavikulären sowie axillären Lymphknotenstationen. Die Brust wird dabei in vier Quadranten unterteilt. Die häufigste Lokalisation von Tumoren ist im äußeren, oberen Quadranten zu verzeichnen (42). Jede Frau wird außerdem angehalten einmal monatlich eine Selbstuntersuchung durchzuführen. Es konnte laut Studien zwar keine Senkung der Mortalitätsrate durch Palpation alleine nachgewiesen werden (43). Allerdings kann dies laut AGO das Brustbewusstsein und somit die Wahrnehmung auftretender Veränderungen erhöhen (44).

Mammographie

Die Mammographie ist eine nicht-invasive, bildliche Darstellung der Brust mit Hilfe von Röntgenstrahlung. Sie gehört zu den Früherkennungsuntersuchungen, die der Sekundärprävention dienen. Zwischen dem 50. und dem 70. Lebensjahr werden alle versicherten Frauen in Deutschland schriftlich im Abstand von zwei Jahren zum Mammographie-Screening eingeladen (41).

Die Untersuchung erfolgt in sog. *Screening*-Zentren, die einem Zertifizierungsverfahren unterliegen. Jede Bildgebung wird zur Qualitätserhöhung von zwei unabhängigen Fachärzten beurteilt. Die Mammographie ermöglicht bereits die Darstellung von Frühläsionen, wie Mikrokalk und DCIS, die sich zu invasiven Karzinomen entwickeln können und in einer klinischen Untersuchung nicht erfasst werden. Die Mammographie ist in Deutschland ein geeignetes, standardisiertes Verfahren zur Erkennung von Brustkrebs und führt nachgewiesen zur Mortalitätssenkung (45). In den letzten Jahren stand das *Screening*-Verfahren trotz der signifikanten Mortalitätssenkung immer wieder in der Kritik, zu Überdiagnostik und Überbehandlung zu führen und nicht im angemessenen Verhältnis zur erreichten Reduktion der Sterblichkeit zu stehen (46, 47). Ein weiteres Mammographieverfahren ist die Tomosynthese, die durch einzelne Schichtaufnahmen ein digitales 3D-Bild erstellt und überlappendes Gewebe besser darstellen kann. Diese Untersuchung soll besonders bei dichtem Brustdrüsengewebe von Vorteil sein (48).

Sonographie

Die Sonographie stellt eine nicht-invasive Möglichkeit zur Darstellung des Brustgewebes dar. Sie ist eine schnell verfügbare und kostengünstige Untersuchungsmethode. Im Gegensatz zur Mammographie ist sie strahlenfrei. Sie sollte jedoch nicht alleine zum Ausschluss von Brusttumoren genutzt werden (21). So dient die Sonographie als Ergänzung zur weiteren Abklärung in der Mammographie erhobener suspekter Befunde und kann besonders bei hoher Brustgewebsdichte die Sensitivität der Mammographie erhöhen (49, 50). In der Abklärung etwaiger axillärer Lymphknotenmetastasen wird die Ultraschalldiagnostik präoperativ eingesetzt. In Kombination mit der axillären Feinnadelbiopsie erhöht sich die Sensitivität und Spezifität der Ultraschalldiagnostik (51).

Magnetresonanztomographie (MRT)

Zur erweiterten Diagnostik bei Verdacht auf Brustkrebs kann die MRT eingesetzt werden, sofern anhand der konventionellen Diagnostik keine eindeutige Diagnose gestellt werden kann. Die MRT hat eine vergleichsweise hohe Sensitivität, ist jedoch geringer in der Spezifität als die Mammographie (52). Zudem ist sie eine kostspielige, zeitaufwendige und nicht überall verfügbare Untersuchungsmethode, sodass sie nicht für das gesetzliche Screening verwendet wird. Weitere Indikationen sind die Nachsorge von Brustkrebspatientinnen, bei denen eine Mammographie nicht möglich ist und die regelmäßige Kontrolle von jungen Patientinnen, die ein erhöhtes hereditäres Risiko haben und nicht der vermehrten Strahlendosis durch Mammographie-Kontrollen ausgesetzt werden sollen (53).

Gewebebiopsie

Zur histologischen Sicherung bildmorphologisch suspekter Befunde und zur präoperativen Therapieplanung werden Gewebeproben benötigt. Es stehen verschiedene Methoden zur Gewinnung von Tumorzellen zur Verfügung. Die sogenannte Stanzbiopsie ist heutzutage das Standardverfahren und wird meist unter Ultraschall-, Mammographie- oder MRT-Kontrolle durchgeführt (54). Die durch diese Methode einzeln gewonnenen zylinderförmigen Proben werden im Falle der Identifizierung eines Tumors noch weiter auf spezifische Eigenschaften wie Grading, HER2- und Hormonrezeptorstatus untersucht.

Ein weiteres Verfahren ist die Vakuumbiopsie der Brust, bei der unter bildgebender Kontrolle, ähnlich der Stanzbiopsie, mehrere Gewebeproben gleichzeitig entnommen werden. Die dabei größere Menge gewonnenen Materials (bis ca. 20 Biopsien) erhöht die Sicherheit in der Diagnosestellung und senkt die Rate der Re-Biopsien (55). Zu beachten gilt, dass es zu einer Tumorzell dissemination in den Stichkanal der Nadel kommen kann. Daher muss bei brusterhaltender Therapie ohne Radiatio der Stichkanal mit entfernt werden (21).

Die offene Exzisionsbiopsie, die durch eine wesentlich größere Invasivität geprägt ist, sollte Ausnahmefällen vorbehalten sein. Sie weist die höchste diagnostische Sicherheit aller Entnahmemethoden auf (56).

2.1.6 Therapie

Operative Therapie

Beim primären nicht metastasierten Mammakarzinom wird die brusterhaltende Operation (BEO) durchgeführt. Nach diesem Therapieprinzip wird in kurativer Absicht der Tumor unter Belassung des angrenzenden gesunden Brustdrüsengewebes entfernt. Im Anschluss wird diese durch neoadjuvante oder adjuvante Therapien in Form einer brusterhaltenden Therapie (BET) ergänzt. Mehrere Studien zeigten, dass die brusterhaltende Operation mit anschließender Radiatio einer Mastektomie ebenbürtig ist und als neuer Therapie-Goldstandard angesehen wird (57, 58). Unter bestimmten Voraussetzungen wird die Indikation zur radikalen Mastektomie weiterhin gestellt, wie zum Beispiel beim Vorliegen eines multizentrischen Mammakarzinoms oder wenn eine R0-Resektion nicht gewährleistet werden kann. Auch persönliche Therapiewünsche der Patientinnen beeinflussen die Wahl der Operationsmethode. So wird bei Mastektomiewunsch oder bei Ablehnung einer adjuvanten Bestrahlung die Mastektomie der BEO vorgezogen (59, 60).

Begleitend zur Tumorexzision wird intraoperativ ein nodaler Befall untersucht. Dafür stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die komplette Axilladisektion und die Wächterlymphknoten-biopsie. Bei Letzterem werden präoperativ farblich markierte oder radioaktive Tracer peritumoral, subareolär, intradermal oder subdermal injiziert. Die am nächsten zum lymphatischen Abflussgebiet des Tumors liegenden LK, die den Tracer aufnehmen, werden als Wächterlymphknoten (*Sentinel-Node*) definiert. Diese werden nach Entnahme in einem Schnellschnittverfahren histologisch auf *Filiae* untersucht und bei nachgewiesenem Befall wird die Indikation einer weiteren Lymphknotenentnahme gestellt (61, 62). Gegenüber der kompletten Axilladisektion führt die selektive Lymphknotenentnahme zu einer Minimierung des Risikos eines postoperativen Lymphödems (63, 64). Nach einer Untersuchung des Cochrane-Instituts ist die *Sentinel*-Methode, nach präoperativ klinisch unauffälligem LK-Status, nicht mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert als die zuvor gängige komplette axilläre LK-Exzision (63). Im Falle des primär metastasierten Mammakarzinoms lässt sich nach aktuellem Forschungsstand keine eindeutige Empfehlung bezüglich einer Operation geben (65).

Radiatio

Die Radiatio ist ein Verfahren, bei dem durch den Einsatz ionisierender Strahlung die lokale Tumorkontrolle angestrebt wird. Sie wird an eine BEO obligatorisch angeschlossen und kann,

verglichen mit einer alleinigen BEO, das postoperative Rezidivrisiko von 39 % auf 14 % senken (57). Beim Mammakarzinom kommen zwei gleichwertige Methoden zum Einsatz: die fraktionierte und die hypofraktionierte Bestrahlung. Die hypofraktionierte Radiatio hat pro Zeitintervall eine höhere Dosis, die Gesamtdosis der Bestrahlung ist jedoch niedriger als bei der fraktionierten Radiatio (66). Auf das ehemalige Tumorbett wird zusätzlich eine sogenannte *Boost*-Bestrahlung gerichtet. Durch die einmalig erhöhte Strahlendosis erhöht sich die lokale Tumorkontrolle (67, 68).

Die Bestrahlung kommt auch palliativ beim metastasierten Mammakarzinom zum Einsatz und dient dann der Symptomkontrolle. Durch gezielte Bestrahlung von Knochenmetastasen, können Schmerzen reduziert und durch Stabilisierung der Knochen das Frakturrisiko gesenkt werden (69). Einen neuen therapeutischen Bereich bietet die Entdeckung von strahlungsinduzierten Effekten auf den Tumor und die Tumorumgebung. Es konnten intratumorale Immunreaktionen mit vermehrter Antigenpräsentation, T-Zell-Rekrutierungen und Chemokin- und Cytokin-Ausschüttung nachgewiesen werden (70). Dies lässt vermuten, dass in Zukunft eine Kombination der Bestrahlung mit Immuntherapien mit synergistischem Effekt möglich ist (71).

Chemotherapie

Chemotherapeutika sind systemisch wirkende Medikamente, die zur Bekämpfung von malignen Tumoren dienen und an verschiedenen Stellen im Zellzyklus eingreifen. Sie sind besonders gegen sich schnell teilende Zellen gerichtet, wie sie gehäuft in Tumoren vorkommen. Da sie jedoch nicht selektiv gegen maligne Zellen gerichtet sind, wirken sie auch gegen andere, insbesondere hochproliferative Zellen wie Haarzellen und Schleimhautzellen, die zu den bekannten Nebenwirkungen wie Haarausfall und Mukositis führen. Beim Mammakarzinom konnte die Rezidivrate und Mortalität durch den Einsatz von Chemotherapeutika gegen bestimmte Tumorsubgruppen signifikant gesenkt werden. Dazu gehören laut Leitlinie HER2-positive und triple-negative-Karzinome sowie die zu den Luminal B zählende Tumoren. Das Chemotherapie-Schema der ersten Wahl ist die neoadjuvant oder adjuvant verabreichte Kombination aus einem Taxan und Anthrazyklin (21, 72, 73).

Endokrine Therapie

Sowohl adjuvant als neoadjuvant zu einer operativen Therapie kann mit Hilfe der endokrinen Therapie bei bestimmten Karzinomen signifikant das Rezidivrisiko gesenkt werden.

Bei rund 75-80 % aller Mammakarzinome liegt eine vermehrte Expression von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren (ER+/PR+) vor. Werden diese stimuliert, so führt dies zur Proliferation des Karzinoms. Im Umkehrschluss kann eine Inhibition dieser Signalwege das Wachstum hemmen (74-76). Dabei werden zwei Wirkmechanismen verfolgt: Zum einen können durch Tamoxifen, einem Antiöstrogen, über eine kompetitive Hemmung die Hormonrezeptoren blockiert werden, zum anderen kann durch Aromatasehemmer das endogene Enzym Aromatase gehemmt werden, das für die Synthese von Östrogenen zuständig ist. Beide Mechanismen führen zu einem hormonellen Entzug, sodass die wachstumsfördernde Wirkung vor allem auf die Tumorzellen, aber zu einem gewissen Teil auch auf gesunde Zellen, verhindert wird. Die heute zum Einsatz kommenden Aromatasehemmer sind Letrozol, Anastrozol und Exemestan. Sie werden bevorzugt postmenopausal eingesetzt (77, 78) und konnten in mehreren Studien eine Überlegenheit gegenüber Tamoxifen in der Postmenopause nachweisen (79, 80). Prämenopausal gilt die Tamoxifen-Therapie als Goldstandard. Die St. Galler Konsensus Kriterien empfehlen den Einsatz endokriner Therapien mit einer Mindestdauer von fünf Jahren mit dem Verweis einer Therapieverlängerung bei hohem Rezidivrisiko (78). Während der antihormonellen Therapie besteht die Möglichkeit zeitgleich eine Strahlentherapie zu applizieren. Bei einer Therapie mit Chemotherapeutika wird jedoch erst im Anschluss an diese die endokrine Therapie begonnen.

Zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*)

Zielgerichtete Therapien bzw. Targettherapien rücken mit dem Fortschritt im Verständnis zu den molekularen Grundlagen von Tumoren immer mehr in den Vordergrund. Sie setzen eine genaue biologische Charakterisierung von Tumoren voraus und erweitern so die Möglichkeiten einer individualisierten Tumorthherapie. Durch Adressierung identifizierter Zielstrukturen, die idealerweise ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert vorliegen, wird, gegenüber der bisher zum Einsatz kommenden Therapien, eine höchstmögliche therapeutische Wirksamkeit unter gleichzeitiger Minimierung von Nebenwirkungen auf gesunde Zellen erzielt. Essenziell für die Auswahl von geeigneten Patientinnen für eine zielgerichtete Therapie sind prädiktive Marker, die eine Vorhersage zum Therapieansprechen ermöglichen.

Als *Target* können verschiedene Strukturen in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise Rezeptoren, Tyrosinkinasen, Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARP) und Proteasomen. Durch eine Inhibierung werden einzelne Signalkaskaden unterbunden oder DNA-

Strangbrüche provoziert, was bspw. das unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen verhindern oder die Apoptose einleiten kann.

Eine bereits etablierte zielgerichtete Therapie des Mammakarzinoms ist der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab. Dieser ist gegen HER2 gerichtet, ein der *Epidermal Growth Factor* Familie zugehöriger Rezeptor, der im Mammakarzinom in 25-30 % überexprimiert vorliegt oder eine Genamplifikation aufweist (81). HER2 besitzt eine intrinsische Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität, die wachstumsstimulierende Signalwege einleitet (82). Die Bindung von Trastuzumab an dem Rezeptor führt zur Inhibierung der proliferativen Wirkung von HER2 und gleichzeitig zur Rekrutierung zusätzlicher Immunzellen, die eine Apoptose einleiten können (83). Der Anwendungsbereich bei HER2-positiven Tumoren gilt für das frühe sowie metastasierte Brustkrebsstadium (84). Es konnten synergistische Wirkungen mit Chemotherapeutika nachgewiesen werden. Die adjuvante sowie neoadjuvante Kombinationstherapie von Anthrazyklinen gefolgt von Taxanen in Ergänzung mit Trastuzumab erzielte eine signifikant niedrigere Rezidivrate von ca. 45 % sowie eine Mortalitätssenkung um 30 % (21, 85, 86). Obwohl zielgerichtete Therapien einen exklusiven Effekt auf Tumorzellen vermuten lassen, gibt es dennoch Nachweise systemischer Nebenwirkungen. Das Nebenwirkungsprofil von Trastuzumab weist ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auf und bedarf einem besonderen Monitoring bzw. Nachsorge (88,89). Im metastasierten Stadium verlängert sich das progressionsfreie Überleben unter Hinzunahme eines weiteren, komplementär wirkenden anti-HER2-AK Pertuzumab (87).

Die Tatsache, dass zielgerichtete HER2-Antikörper ein so erfolgreiches Therapieansprechen zeigen, dieser Therapieansatz jedoch nur bei einem Viertel aller Brustkrebspatientinnen indiziert ist, verdeutlicht das Potential, das in der Erforschung weiterer *Targets* für die zielgerichtete Therapie im Mammakarzinom liegt. Einen weiteren Ansatzpunkt für die zielgerichtete Therapie, die ebenfalls die Identifizierung neuer Zielantigene voraussetzt, ist die Immuntherapie, die eine spezifische Aktivierung des Immunsystems erzielt. Dies kann unter anderem durch sogenannte Immunvakzine erfolgen, die Tumorantigene präsentieren, wodurch schließlich eine Aktivierung von T-Zellen und damit körpereigene Ressourcen zur Tumorbekämpfung generiert werden. Eine besondere Herausforderung stellen dabei die *Immune-Escape-Mechanismen* von Tumorzellen dar. Ziel der Immuntherapie ist es, durch Präsentation eines präzisen Antigens mit ggfs. Kopplung an einen immunogenen Vektor, eine ausgeprägte Immunantwort auszulösen.

2.2 Tumorantigene

Während der Karzinogenese unterliegen gesunde Zellen morphologischen und biochemischen Veränderungen. Durch veränderte enzymatische Prozesse kommt es zu Hyper- und Hypoglykosylierungen verschiedener Proteine, die zu einer Freilegung von Epitop-Strukturen führen können. Zudem kommt es durch einen zunehmenden Polaritätsverlust im Tumorgewebe zu einer Neupositionierung von Antigenen auf der Zelloberfläche, was ebenfalls in der Entstehung neuer Epitope, sogenannter Neoantigene, auf der Tumorzelle resultiert. In einem gesunden Organismus werden pathologische Veränderungen von Oberflächenstrukturen meist vom Immunsystem wahrgenommen und führen bspw. über eine Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten zu einer effektiven Immunantwort. Die Immunogenität der neu entstehenden Tumorantigene präsentiert sich sehr unterschiedlich und wird maßgeblich durch *Immune-Escape*-Mechanismen von Tumoren beeinflusst.

Allgemein können Tumorantigene in drei Klassen unterteilt werden. Tumorspezifische Antigene (TSA), Tumorassoziierte Antigene (TAA) und *cancer-germline/cancer testis* Antigene (CTA) (Abbildung 1) (88).

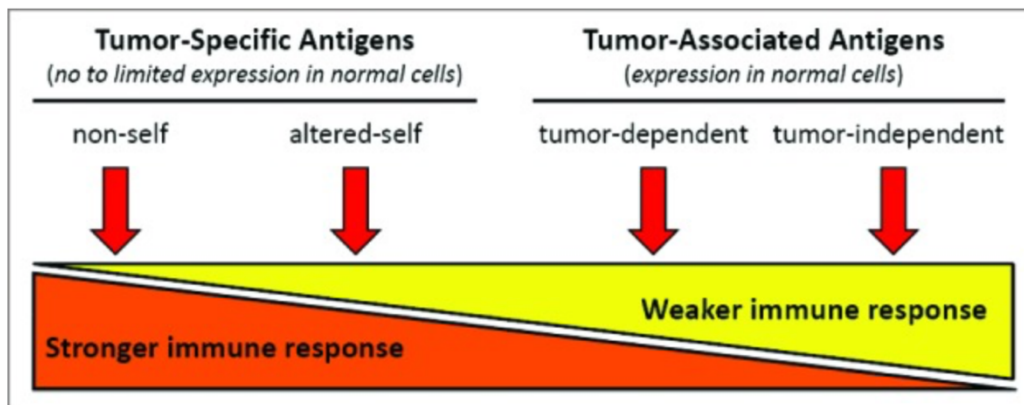


Abbildung 1 Immunantwort nach Antigenklassifikation (89)

Overexpressed oncogenic tumor-self antigens: New vaccine targets, Bright, R. K., Bright, J. D., & Byrne, J. A., Human Vaccines & Immunotherapeutics, ©2014, reprinted by permission of Informa UK Limited, trading as Taylor & Taylor & Francis Group

Tumor-spezifische Antigene (**TSA**) sind Antigene, die nicht im gesunden Gewebe nachweisbar sind. Unterschieden werden *non-self*-Antigene und Neoantigene, die aus Mutationen oder Virusinfektionen heraus entstehen und in dieser Form nicht zuvor im Genom kodiert vorlagen (90). Sie stellen besonders immunogene Strukturen dar. Eine weitere Gruppe sind die sogenannten *Self*-Antigene. Diese sind aberrant bzw. verändert exprimierte Proteine, die

tumorspezifisch oder tumorassoziiert sein können. Eine hiergegen gerichtete Immunantwort ist im Vergleich zu *non-self*-Antigenen in der Regel geringer ausgeprägt.

Cancer-testis antigens (CTA) sind Antigene, deren Expression auf wenige Gewebe beschränkt ist. Sie lassen sich während der Embryonalentwicklung nachweisen und werden im adulten Gewebe im Hoden und der Plazenta exprimiert (91). Diese Antigene sind im Physiologischen nicht für das Immunsystem zugänglich, da in Keimzellen keine HLA-Klasse-Exprimierung stattfindet und somit auch keine Antigenpräsentation erfolgt. Im restlichen Gewebe ist der Promotor für den jeweiligen DNA-Abschnitt durch Methylierung stillgelegt. CTAs konnten in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden, die sowohl eine starke humorale, als auch zellbasierte Immunantwort auslösen (92). Die starke Geweberestriktion und die Immunogenität ermöglichen es, CTAs als tumor-spezifische *Targets* zu nutzen (91).

Tumor-assoziierte Antigene (**TAA**) sind Proteine, die sowohl im normalen Genom als auch in Tumoren vorhanden sind. In Tumoren liegt eine veränderte Expression vor, die sich beispielsweise durch eine reine Überexpression des Proteins unterscheidet. Des Weiteren können aberrante Proteine durch posttranslationale Modifikation als TAA eingeordnet werden. Zwei Vertreter dieser Gruppe im Mammakarzinom sind der HER2-Rezeptor und Mucin1. Da diese Form von Antigenen auch im gesunden Gewebe vorkommt, hängt die Antigenität vom Ausmaß der abnormen Expression ab, und die Immunantwort weist, verglichen mit TSAs, meist eine geringere T-Zell-Aktivierung auf.

Das Glykoprotein Mucin1 ist kein, wie lange angenommen, einzelnes Tumorantigen, sondern stellt vielmehr eine Vielzahl an Epitopen dar, die, je nach Ursprung, als TAA oder TSA eingeordnet werden können und potenzielle immunogene Zielstrukturen im Mammakarzinom darstellen.

2.2.1 Mucin1

Herkunft

Die Familie der Mucine repräsentiert eine Gruppe heterogener Glykoproteine. Unter Ausbildung einer mukösen Gelschicht schützen sie das epitheliale Gewebe. Sie kleiden die Oberfläche glandulärer und duktaler Organe aus und bilden eine selektive Barriere zwischen dem Extrazellularraum und dem Zellinneren (93). Charakteristisch für die Mucine ist die gemeinsam vorkommende *Tandem Repeat* Struktur (VNRT), die eine hohe Anzahl von Serin-, Threonin- und Prolin-Aminosäuresequenzen aufweist (STP-Region) und eine besonders hohe Dichte an O-Glykosylierungen beinhaltet (94). Es können zwei Gruppen von Mucinen

unterschieden werden: Die sekretorischen Mucine (MUC2, MUC5AC, MUC6, MUC7, MUC8) und die membrangebundenen Mucine (MUC1, MUC3, MUC3, MUC11-13, MUC15-17, MUC20). Im Folgenden wird der Schwerpunkt auf das membrangebundene Mucin Mucin1 gelegt, da dieses das in dieser Arbeit untersuchte Zielantigen darstellt.

Aufbau Mucin1

Mucin1 ist als integrales Membranprotein der Gruppe der membrangebundenen Mucine angehörig. Es wird in epithelialen Organen wie der Mamma, dem Ösophagus, dem Magen, dem Duodenum, dem Pankreas und der Lunge exprimiert. Die Höhe der Expression im Brustgewebe unterliegt hormonellen und zellulären Einflüssen. In der frühen Entwicklung der Brustdrüse können nur geringe Expressionen von Mucin1 nachgewiesen werden, wohingegen sich in der Schwangerschaft, Stillzeit und bei Entzündungsprozessen eine Zunahme der Mucin1-Expression nachweisen lässt (95).

Mucin1 wird apikal auf der Zellmembran exprimiert. Das heterodimere Glykoprotein besteht aus zwei Untereinheiten, die über eine nicht-kovalente Bindung miteinander verknüpft sind. Posttranslational liegt es zunächst als einzelnes (monomeres) Peptid vor und wird nach Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum über mehrere N-Glykosylierungen an der SEA-Domäne (*Sea urchin sperm protein-Enterokinase-Argin*) in ein dimeres Peptid gespalten (96). Anschließend Modifikationen im Golgiapparat führen zur charakteristischen hohen Anzahl von Polysaccharid-Verknüpfungen in Form von O-glykosydischen Bindungen innerhalb des Moleküls (94). Das fertige Mucin1-Molekül unterteilt sich in eine N-terminale und in eine C-terminale Untereinheit (Abbildung 2). Die N-terminale Untereinheit ist größer und liegt ausschließlich extrazellulär vor. Sie besteht aus der genannten SEA-Domäne, einem Signalpeptid und der Tandem-Repeat-Domäne. Letztere unterliegt dabei genetischen Polymorphismen und kann zwischen 20 und 120 Wiederholungen aufweisen, die aus jeweils 20 Aminosäuren (AHGV**T**SAPDTRPAPG**S**TAPP) bestehen (94). Jedes *Tandem-Repeat* bietet insgesamt fünf mögliche Glykosylierungsstellen an den Serin- und Threonin-Seitenketten (54). Dabei hängt das spezifische Glykosylierungsmuster von der Expression und Aktivität der Glykosyltransferasen im jeweiligen Gewebe ab und ist somit gewebespezifisch (97). Die transmembranäre C-terminale-Untereinheit von Mucin1 ermöglicht die Verankerung im Epithel. Zusätzlich besitzt sie eine kurze extrazelluläre Domäne sowie eine zytosolisch gelegene stark konservierte C-terminale Sequenz.

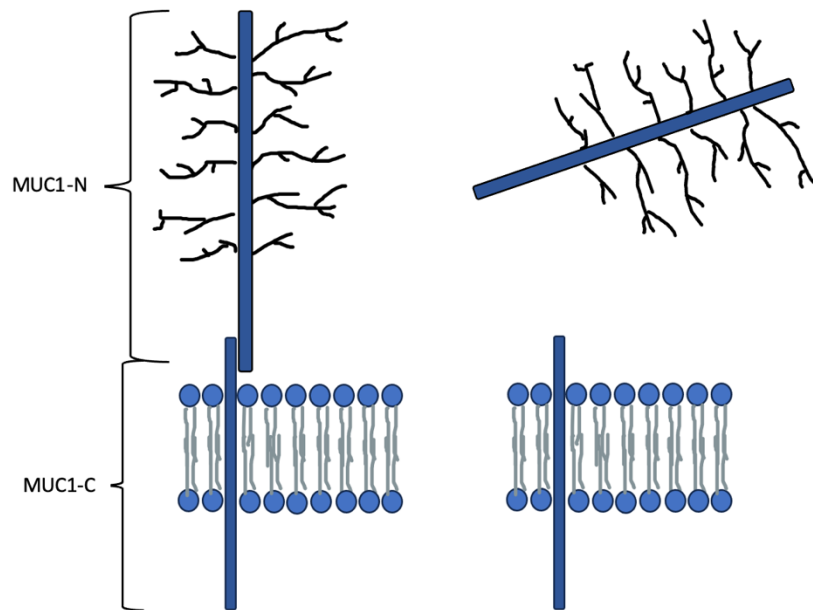


Abbildung 2 Schematische Darstellung von Mucin1 im gesunden Epithel.

Expression von Mucin1 an der apikalen Zellmembran, bestehend aus zwei Untereinheiten Mucin1-N und Mucin1-C. Eine Dissoziation der N-terminalen Untereinheit ist im physiologischen Zustand im Rahmen von Entzündungsprozessen und während der Stillzeit möglich. Abbildung modifiziert nach Kufe. (98)

Insgesamt liegt das Gewicht von Mucin1 zwischen 250 und 500 kDA und hängt überwiegend von der Anzahl an Tandem-Repeats sowie der Glykosylierungsdichte ab. Die räumliche Struktur präsentiert sich starrförmig und ragt ca. 200-500 nm über die Zellmembran und damit auch über die Glykokalix hinaus (99). Eine Besonderheit ist, dass Mucin1-N kovalent gebunden vorliegen kann, aber auch in dissoziierter, löslicher Form als CA 15-3 im Blutplasma nachweisbar ist (Abbildung 2). Diese lösliche Form von Mucin1 wird bereits zum Therapiemonitoring des Mammakarzinoms genutzt (100).

Funktionen und Interaktionen von Mucin1 in der Mamma

Indem es das Epithel mit einer mukösen Schicht auskleidet, übernimmt Mucin1 in der Brustdrüse eine Schutzfunktion. Darüber hinaus ermöglicht es, durch seine intrinsische Aktivität, der Zelle, auf stetig ändernde Umgebungsbedingungen adäquat zu reagieren. Die hohe Zahl an Polysacchariden an der extrazellulären Domäne von Mucin1 sorgt für eine hohe Wasserbindungskapazität und schützt, durch den Aufbau eines hydrophilen Milieus, das Gewebe vor Austrocknung (101). Gleichzeitig führen die ausgeprägten Zuckerketten zu einer Abschirmung des Proteinerückrats und verhindern so dessen Abbau durch Proteasen (97). Des Weiteren erschwert die starre Architektur von Mucin1 mit seiner einzigartigen Zucker-Protein-Struktur die Adhäsion und das Eindringen pathogener Keime in das Gewebe (95).

Mucin1 selbst besitzt keine Kinaseaktivität, weist jedoch an der Mucin1-C-Untereinheit eine stark konservierte Domäne auf, die Tyrosin-Bindungsstellen besitzt und über die eine Phosphorylierung mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und die Interaktion mit weiteren Enzymen stattfindet (102). Durch eine rein apikale Expression von Mucin1 liegt physiologisch eine räumliche Trennung zu den basolateral exprimierten RTK vor. *Tight-Junctions* gewährleisten die Aufrechterhaltung der Zellpolarität. Als Reaktion auf zellulären Stress, bspw. im Rahmen von Entzündungsreaktionen, kommt es zu einem reversiblen Polaritätsverlust, und infolgedessen zu einer strukturellen Umverteilung von Mucin1 über die gesamte Zellmembran. Hierdurch kommt es zu einer Interaktion von Mucin1 mit den basolateral exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Der EGF-Rezeptor ist in der Lage, über Phosphorylierungen an der Mucin1-C-Untereinheit des YEKV-Motivs intrazelluläre Prozesse zu regulieren. Darüber hinaus beinhaltet die Mucin1- C-Untereinheit eine Bindungsstelle für Galectin am Asp-36, die ebenfalls eine Interaktion mit dem EGFR ermöglicht (103). Bisher konnte keine eigene DNA-Bindungsstelle für Mucin1 nachgewiesen werden, jedoch kann Mucin1 eine Beteiligung in den regulatorischen Transkriptionsprozessen und bei der Rekrutierung von Co-Transkriptionsfaktoren zugesprochen werden (104, 105). Durch die bereits beschriebene Phosphorylierung von Mucin1 kommt es zu einer gesteigerten Initiation von β -Catenin und Mucin1. Der β - Catenin/Mucin1 Komplex ist in der Lage, den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu aktivieren und über eine Blockierung des Tumorsuppressors APC-Protein, den Abbau von β -Catenin zu verhindern. β -Catenin kann an Mucin1-C gebunden weiter in den Zellkern transportiert werden und dort als Transkriptionsfaktor wirken (102, 106).

Des Weiteren wird durch die Bindung von β -Catenin und Mucin1 eine Interaktion zwischen α -Catenin und E-Cadherin, die wesentlich an der Ausbildung von *Adherens-Junctions* und somit einer Zell-Zellverbindung verantwortlich sind, unterdrückt. Mucin1 kann trotz seiner Membranverankerung durch TNF alpha und anderen proinflammatorischen Zytokinen von der Membran abgespalten werden und sowohl extrazellulär als auch in einzelnen Komponenten intrazellulär vorliegen (97). Zu den weiteren Bindungspartnern von Mucin1 gehören unter anderem: erbB2, erbB3, erbB4, c-Src, PKCd, Grb2, β -Catenin, GSK3 β und p120.

2.2.2 Mucin1 im Tumor

Die Multifunktionalität von Mucin1 lässt sich auch während der Tumorgenese beobachten. In vielen epithelialen Tumoren liegt eine Überexpression von Mucin1 vor. Im Mammakarzinom konnte diese bei ca. 90 % verzeichnet werden (99, 107, 108). Während der Tumorprogression kommt es, wie bei Entzündungsreaktionen auch, zu einem irreversiblen Polaritätsverlust der

Zelle mit Aufhebung der apikalen Zellausrichtung. Dies führt zu einer Umverteilung von Mucin1 auf der gesamten Zellmembran und eine daraus resultierende Auflösung von **Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen**, was eine vereinfachte Ablösung der Zelle aus dem Zellverbund ermöglicht (99) (Abbildung 3). Mucin1 besitzt zudem extrazelluläre Bindungsstellen, die eine vereinfachte Zelladhäsion maligner Zellen ermöglichen. Diese sind unter anderem ICAM1-Rezeptoren auf Endothelzellen, Galectin-3 sowie E-Selectin. Durch die bivalente Eigenschaft von Mucin1 kann somit einerseits die Ablösung und der Ausstrom von Tumorzellen begünstigt und andererseits Migrations- und Invasionsprozesse von Tumorzellen während der Metastasierung vereinfacht werden (109). Dies zeigt sich auch durch die Erkenntnisse, dass eine vermehrte Mucin1-Expression mit einem schlechten Gesamtüberleben sowie geringem rezidivfreien Überleben assoziiert ist (108).

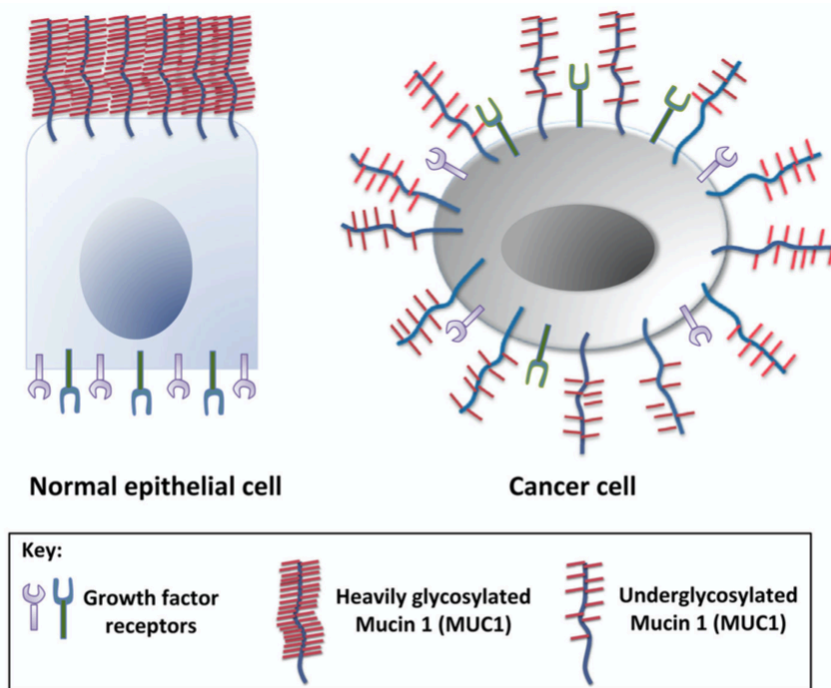


Abbildung 3 Veränderungen von Mucin1 in gesundem Epithelgewebe gegenüber Mucin1 im Tumorgewebe (97)
 MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression, Sritama Nath, Pinku Mukherjee,
 Trends in Molecular Medicine, ©2014 Elsevier

Die zelluläre Umverteilung von Mucin1 und die so entstehenden Interaktionen mit basolateral exprimierten RTKs stellt einen wesentlichen Aspekt der Malignitätsentwicklung von Tumorzellen dar (Abbildung 3). Eine Bindung am EGF-Rezeptor ErbB1 (EGFR) führt zu dessen Aktivierung und zur Stimulation von Zellwachstum sowie zur Ausschüttung anti-apoptischer Überlebenssignale. Im gesunden Gewebe wird die Aktivierung von ErbB1 streng

reguliert. Die im Tumor entstehende Komplexbildung von Mucin1/ErbB1 verhindert den Abbau von aktiviertem ErbB1 und unterstützt somit eine prolongierte Signaltransduktion, die über das physiologische Maß hinausgeht (110). Des Weiteren fördert Mucin1 über Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges (96) eine vermehrte Synthese des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), die zur Angiogenese führen und so eine verbesserte Nährstoffzufuhr des Tumors gewährleisten kann (111).

Neben der Überexpression konnte in mehreren Arbeiten ein aberrantes Mucin1-Protein im Tumorgewebe nachgewiesen werden, das sich deutlich vom physiologischen Mucin1 unterscheidet. Dafür verantwortlich ist eine im Tumormilieu veränderte Transferasenaktivität. Im Brustkrebs ist die Aktivität der **β 6-GlcNAc-Glykosyl-Transferase**, die für die Mucin1-typischen Glykosylseitenketten sorgt, vermindert. Gleichzeitig zeigt sich eine Überaktivität der **alpha2,3-Sialyl-Transferase**, die durch Sialylierung zu einem verfrühten Abbruch der Seitenketten führt. Aus beiden Effekten resultiert ein im Tumor verändertes Glykosylierungsmuster von Mucin1, was durch die verkürzten Zucker-Seitenketten unter anderem in der Freilegung des Kohlenhydratpeptids resultiert und zu der Entstehung neuer immunogener Mucin-Antigene und Peptid-Epitope im Tumor führt (112). Die existierenden körpereigenen Antikörper können dabei gegen folgende Peptid-Epitope gerichtet sein: RPAPGS, PPAHGVT, PDTRP und GSTA, (113, 114) wobei sich PDTRP als besonders immunogen erwies (115). Weitere immunogene Strukturen stellen die verkürzten Zuckerseitenketten in Form von Glykopeptid-Epitopen dar: **Tn** GalNAc α 1-O-Ser/Thr, **STn** (NeuA α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr)(114), **T** (Gal β 3 GalNAc) und **ST** (Neu5Ac α 6 Gal β 3 GalNAc) (116, 117).

Zusammenfassend ist das im Tumor aberrant exprimierte Mucin1 sowohl quantitativ als auch qualitativ in seinem Glykosylierungsmuster verändert. Es kann sowohl tumorspezifische als auch tumorassoziierte Antigene aufweisen, die bspw. eine MHC I-vermittelte oder T-Zell vermittelte Immunantwort auslösen können (118, 119). Diese immunogenen Eigenschaften und die ausgeprägte Expression von Mucin1 in Brustkrebstumoren machen es zu einem potenziell geeigneten *Target* in der Immuntherapie des Mammakarzinoms, was bereits zu der Entwicklung verschiedener synthetischer Mucin1-Antikörper geführt hat. Diese Antikörper sind gegen verschiedene Zielstrukturen von Mucin1 gerichtet, wobei sie dabei unterschiedliche Bindungsaffinitäten aufweisen. Antikörper, die gegen das Proteinrückrat von Mucin1 gerichtet sind, zeigen oftmals eine verbesserte Bindungsaffinität an hypoglykosyliertes Mucin1, da das Proteinrückrat nicht von den Zuckerseitenketten „abgeschirmt“ wird. Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper (mAK) VU4H5 ist gegen den extrazellulären Anteil der Mucin1-N-Untereinheit (MUC1) gerichtet. Durch die verkürzten Seitenketten im Tumor zeigt

Literaturdiskussion

sich eine besonders hohe Bindung des Antikörpers. Der dieser Arbeit dienende Vergleichsantikörper GSK1/30 bindet das neu beschriebenes Glykopeptid-Antigen TA-MUC1, das im Vergleich zu MUC1 tumorspezifisch exprimiert vorliegt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Dampfgarer MultiGourmet FS10	Braun GmbH, Kronberg im Taunus
accu-jet® pro Pipette Kontrolle	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Transferpipette® S-Pipette 10-100 µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Masterpipette MR® Pipette 100-1000 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
IKA Vortex-Schüttler VF2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen im Breisgau
Leitz Dialux 22EB -Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Leica Leitz DMRB -Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Leica DFC290 HD - Kamera	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
SafeSeal-Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Cellstar® - Polypropylen Röhrchen, 15 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Tubes® 5.0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S.® Standard/Bulk-Pipettenspitzen, 2 – 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S.® Standard/Bulk-Pipettenspitzen, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Greiner CELLSTAR®-Serological Pipette, 5ml in 1/10 ml	Greiner Bio One International GmbH, A-4550 Kremsmünster Österreich
Menzel-Gläser-Deckgläser 24x32 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Menzel-Gläser-Deckgläser 24x50 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Menzel-Gläser-Deckgläser 24x60 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Diagonal Deckgläser 18x18 mm	Diagonal GmbH & Co. KG 48161 Münster
Dako Pen Code S2002	Dako Denmark A/S Glostrup, Denmark
Hico-Mic-Mikroskopier-Einschlussmittel	Hirtz & Co. KG, Köln
Einweg-Pipette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Menzel-Glas-Objektträger Superfrost plus	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Gebrauchsmaterialien

Tabelle 6 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	Hersteller
Eppendorf-Objektträger-Halterung	Eppendorf AG, Hamburg
Edelstahlpinzette, flach und spitz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Deckglaspinzette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hirschmann® EM Duran®-Messzylinder 250:2 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Vitlab®-Trichter	Vitlab GmbH, Großostheim
Färbe-Trog Glas mit Halterung	Carl Roth GmbH + Co. KG
Laborflaschen	Carl Roth GmbH + Co. KG

Lösungen und Puffer

Tabelle 7 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Referenznummer	Hersteller
Ampuwa® 1000 ml Plastipur® - Spüllösung		Fresenius Kabi Deutschland GmbH ©, 6 1346 Bad Homburg
PBS pH7,4 – Waschpuffer 0,2 g KCl 0,2 g KH₂PO₄ (wasserfrei) 8,0 g NaCl 0,9 g Na₂HPO₄ (wasserfrei) Ad 1 l		
Wasserstoffperoxid 30 % ROTIPURAN® p.a., stabilisiert, 250 ml	8070.2	Carl Roth GmbH + Co. KG
DAKO Target Retrieval Solution, low-pH, 10 x Konzentrat, 500 ml	S1699	Dako Denmark A/S Glostrup, Denmark
Mayer's Häkalaunlösung, 500 ml	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt
BSA - Bovine Serum Albumin Lyophilized Powder, >96 % (agarose gel electrophoresis)	A2153-100G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Material und Methoden

Substanzen

Tabelle 8 Substanzen

Substanzen	Referenznummer	Hersteller
Xylol Isomerengemisch, 2,5 l	131769.1612	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 99,8 % vergällt mit IPA, MEK und Bitrex Reinst, 5 l	147194.147194.1214	AppliChem GmbH, Darmstadt
DAKO REAL™ Antibody Diluent, 250 ml	S2022	Dako Denmark A/S Glostrup, Denmark

Kit-Systeme

Tabelle 9 Kit-Systeme

Kit-System	Referenznummer	Hersteller
DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/ DAB+Rabbit/ Mouse	K5007	Dako Denmark A/S Glostrup, Denmark

Antikörper

Tabelle 10 Antikörper

Antikörper	Isotyp	Hersteller
MUC1 VU4H5	Mouse IgG1	Cell Signaling Technology Inc., Frankfurt am Main

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Für den Nachweis von MUC1 im Tumorgewebe wurden 241 Gewebeproben ausgewählt, die von der Gewebe-Biobank, Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz in Form von FFPE-Gewebeschnitten (*Formalin-fixed, paraffin-embedded*) zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben entstammten einem Patientenkollektiv, das in einem Zeitraum von 2009 bis 2016 in der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mainz wegen eines erstdiagnostizierten Mammakarzinoms operiert wurde. Das entnommene Gewebe wurde in der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz histopathologisch aufgearbeitet. Die Auswertungen standen in Form von pathologischen Befunden zur Verfügung. Für das Kollektiv wurden ausschließlich primäre, nicht fernmetastasierte Mammakarzinome eingeschlossen.

3.2.2 Kontrollfärbungen

Positivkontrolle: MCF-7-Zellen

Die MCF-7-Zelllinie (ATCC®HTB-22™) wurde erstmals 1970 von der *Michigan Cancer Foundation* aus dem Pleuraexsudat eines metastasierten Mammakarzinoms isoliert. Sie wird heute als etablierte Zelllinie in der Brustkrebsforschung eingesetzt (120, 121). MCF-7-Zellen zeichnen sich durch Östrogen- und Progesteronrezeptor-Positivität sowie HER2-Negativität aus. Zudem sind sie hoch positiv für das Tumorentigen Mucin1 (122), weshalb sich diese Zelllinie als Positivkontrolle der immunhistochemischen Färbung dieser Arbeit als geeignet erwies. Die Zellen wurden auf *SuperFrost®*-Objektträgern für drei Tage ausgesät und anschließend in 4,5 % Formalin fixiert.

Technische Negativkontrolle

Zum Ausschluss unspezifischer Färbungen wurde für jeden immunhistochemischen Durchlauf ein Tumorschnitt des Kollektivs in zweifacher Ausführung verwendet und einmal ohne Primärantikörper nach dem weiteren Färbeprotokoll behandelt.

Inhaltliche Negativkontrolle: Gesundes Brustgewebe

Neben der Untersuchung karzinöser Brustgewebeschnitte wurden in jedem Färbedurchgang gesunde Brustgewebeschnitte gefärbt. Das gewonnene Material entstammte dabei aus Brustreduktionsplastiken, die an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wurden und nach schriftlicher Einwilligung der Spenderinnen für wissenschaftliche Zwecke freigegeben wurden. Das Gewebe wurde vor der weiteren Aufarbeitung histologisch vom pathologischen Institut der Universitätsmedizin als benigne befundet.

Vorbehandlung des Gewebes

Die Tumorgewebeschnitte wurden von der Gewebe-Biobank für das immunhistochemische Färbeverfahren aufbereitet. Dabei wurde nach einem standardisierten Protokoll der Universitätsmedizin gearbeitet, bei dem nach der Entnahme des Tumors das Tumorgewebe in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) wird, um so lysosomale Enzyme zu blockieren und das Gewebe in seiner Struktur zu konservieren. Mittels Mikrotom wurden aus den Tumorblöcken jeweils 4m dicke Präparate geschnitten und auf *Superfrost®Plus* Menzel Gläser aufgezogen. Diese speziellen Objektträger binden zytologisches Material durch elektrostatische Anziehung und sollen das Risiko eines späteren Ablösens während der Antigendemaskierung vermindern (123). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 60C inkubiert, damit geschmolzenes Paraffin ablaufen kann.

3.2.3 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen bieten die Möglichkeit, durch spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen Epitope von Antigenen in Gewebeschnitten zu detektieren und somit neue Zielstrukturen für die Diagnostik und die gezielte Tumortherapie zu identifizieren (123). Mittels immunhistochemischer Färbungen sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression des Tumorantigens MUC1 im Brustkrebsgewebe untersucht werden. Dafür wurde eine indirekte Methode verwendet, bei der der unkonjugierte Primärantikörper VU4H5 das gesuchte Antigen (MUC1) bindet und in einem zweiten Schritt durch einen sekundären Antikörper mittels enzymgekoppelter Färbereaktion nachweist. Nachfolgend wurde das Produkt über ein Detektionssystem visualisiert. Für den hier verwendeten Primärantikörper VU4H5 wurden verschiedene Verdünnungsreihen getestet und mit der geeignetsten Antikörperkonzentration ein Immunhistochemie-Protokoll entwickelt, das sich wie folgt darstellt.

Arbeitsprotokoll

Für jeden Färbedurchgang wurde eine Positivkontrolle in Form von MCF-7-Zellen sowie eine technische Negativkontrolle mitgefärbt. Des Weiteren erfolgte je Durchgang eine Färbung von gesundem Brustgewebe, was als inhaltliche Negativkontrolle diente.

1. Entparaffinierung, Antigendemaskierung

Die FFPE-Gewebeproben waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Sie wurden in einem ersten Schritt durch Xylol für insgesamt 30 Minuten entparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert sowie einmalig in demineralisiertem Wasser (VE-Wasser) gewaschen.

- 3x 10 Min Xylol
- 2x 2 Min Ethanol 100 %
- 1x 2 Min Ethanol 96 %
- 1x 2 Min Ethanol 70 %
- 1x 1 Min H₂O

Die Antigendemaskierung ist ein Verfahren, das die Wiederherstellung der tertiären Proteinstruktur und somit eine Bindung des Antikörpers an das freigelegte Antigen ermöglicht. Die dafür verwendete HIER (*heat-induced epitope retrieval*)-Methode kann formalininduzierte Veränderungen der Epitopstruktur wiederherstellen (123). Dazu werden die Gewebeschnitte in einem Citrat-Puffer für 30 Minuten in dem vorgeheizten Steamer erwärmt. Anschließend werden die Schnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten abgekühlt. Um Rückstände zu vermeiden, werden alle Gewebeschnitte nachfolgend durch VE-Wasser gezogen. Anschließend werden die Objektträger für 10 Minuten mit Wasserstoffperoxid benetzt, um die endogene Peroxidase zu blockieren, und nachfolgend erneut in VE-Wasser getaucht. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt.

- 1x 30 Min low pH Puffer (1:10)
- 1x 20 Min Abkühlen bei RT
- 1x 10 Min 3 % H₂O₂
- 1x in VE-Wasser tauchen

2. Spezifische Färbung

Die spezifische Färbung erfolgt manuell und in Form eines indirekten Nachweises. Verwendet wurde der Primärantikörper Anti-MUC1 VU4H5. Er ist ein aus einer Maus isolierter monoklonaler Antikörper der gegen die Tandemrepeats des Proteinrückrats des totalen Mucin1-Antigens gerichtet ist (124). Nach mehreren Verdünnungsreihen wurde eine Verdünnung von 1:100 für das Protokoll festgelegt. Trägerlösung war das Antibodydiluent *Dako REAL*. Für die gleichmäßige Verteilung des Antikörpers wurde das Gewebe zuvor mit einem Fettstift umrandet. Die Gewebeproben werden für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert. Im Nachfolgenden werden die Proben mehrmals in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und von überschüssigen mAK befreit.

- 1 h RT VU4H5 (1:100)
- 3x 2 Min PBS

Zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers diente die *EnVision*-Methode. Dafür wurde das Gewebe für 30 Minuten mit dem Zweitantikörper, *Dako REAL EnVision* in der feuchten Kammer inkubiert. Über ein Dextrangerüst ist der Sekundärantikörper mit zahlreichen Peroxidasen konjugiert und wandelt enzymatisch farbloses Chromogen in einen sichtbaren Niederschlag um (125). Als Chromogen diente das 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) in einer Verdünnung von 1:50. Dieses wirkte für 5 Minuten ein und wurde bei positivem Nachweis als dunkelbraune Färbung sichtbar. Anschließend wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser gespült und zur Kontrastierung der Kerne mit dem Farbstoff Meyers-Hämalaun im Verhältnis 1:5 für fünf Minuten gegengefärbt. Zum Abschluss wurden die Proben nochmals mit fließendem Leitungswasser gebläut.

- 1x 30 Min Dako EnVision
- 1x 5 Min DAB+ H₂O₂ (1:50)
- 1x 10 Min fließendes VE-Wasser
- 1x 5 Min Meyers-Hämalaun-Lösung
- 1x 10 Min fließendes VE-Wasser

3. Einbettung

Die Gewebeproben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mehrfach in Xylol eingelegt, um anschließend in Eukitt fixiert zu werden.

- 1x 2 Min Ethanol 70 %
- 1x 2 Min Ethanol 96 %
- 2x 2 Min Ethanol 100 %
- 3x 5 Min Xylol

3.2.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Jörg Jäkel, Facharzt für Pathologie des Instituts für Pathologie der UM Mainz, sowie zwei weiteren, voneinander unabhängigen Beobachtern ausgewertet. Es wurden hierbei lediglich Tumorschnitte mit invasiven Karzinom-Anteilen ausgewertet und Gewebeproben, die ausschließlich DCIS-Anteile aufwiesen, ausgeschlossen. Zur immunhistochemischen Auswertung diente der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele et al. (126), der als semiquantitative Auswertung zwei Parameter betrachtet, deren Punktwerte miteinander multipliziert werden. Er setzt sich zusammen aus der Intensität der Färbung 0=keine; 1=schwach; 2=mäßig; 3= stark sowie dem Anteil positiv gefärbter Zellen 0 %=0; <10 %=1; <11-50 %=2; <51-80 %=3 und >80 %=4 (126). Daraus ergibt sich ein möglicher Punktwert von 0 bis 12. Zusätzlich erfolgte die Auswertung nach Kompartimenten der zellulären Färbung. Es wurde unterschieden in cytoplasmatische und membranöse Färbungen sowie in gemischte Färbungen aus der Kombination beider. Daraus ergaben sich folgende mögliche Expressionsmuster: rein cytoplasmatisch (c), vorrangig cytoplasmatisch und teilweise membranös (cm), vorrangig membranös und teilweise cytoplasmatisch (mc) sowie rein membranös (m) (Abb. 4-7). Als Grundlage für den angestrebten Vergleich der Antikörperfärbungen von VU4H5 und dem Vergleichsantikörper GGSK-1/30 war die Erfassung der jeweiligen Expressionen an denselben Tumorblöcken mittels des methodisch gleichen immunhistochemischen Färbeprotokolls.

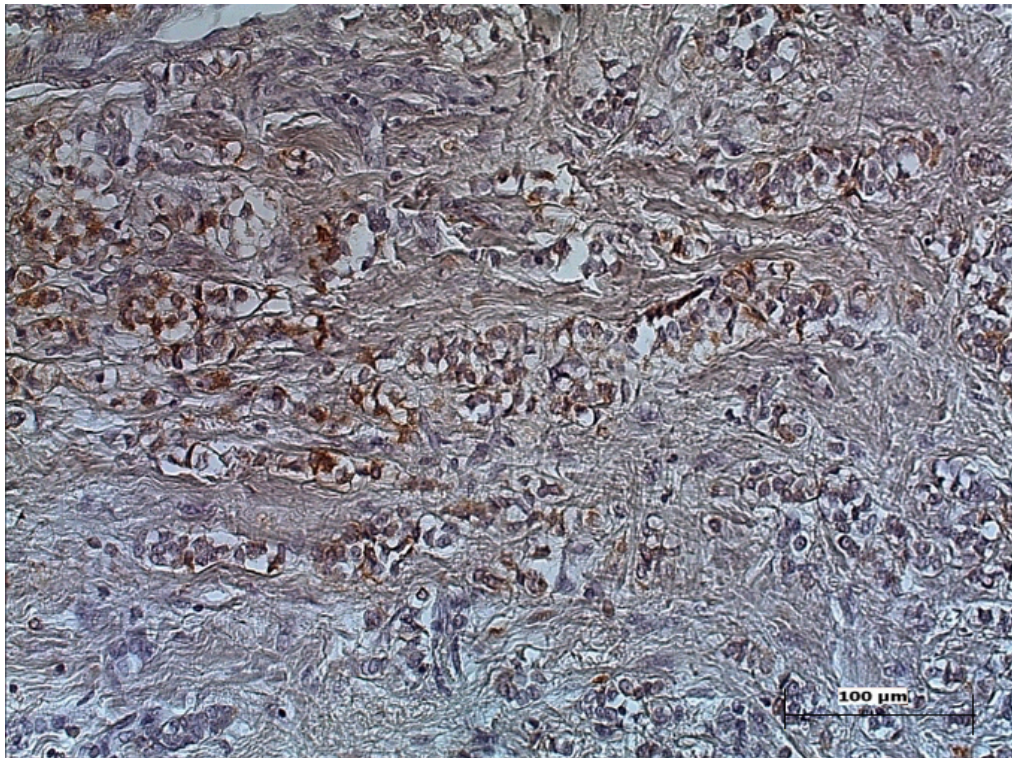
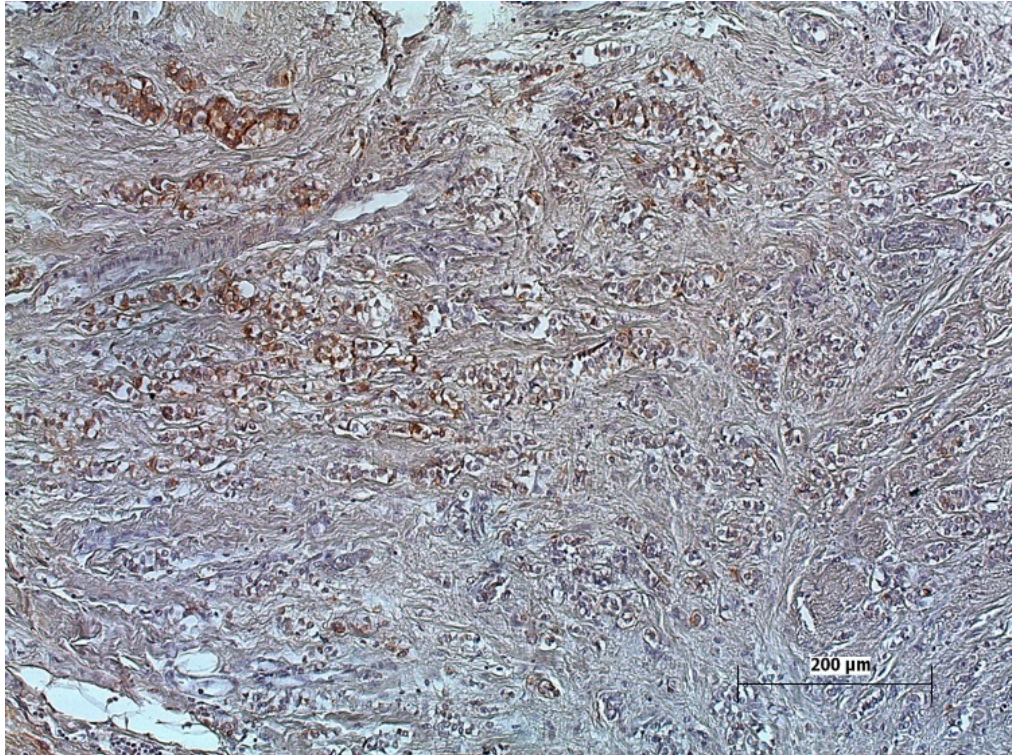
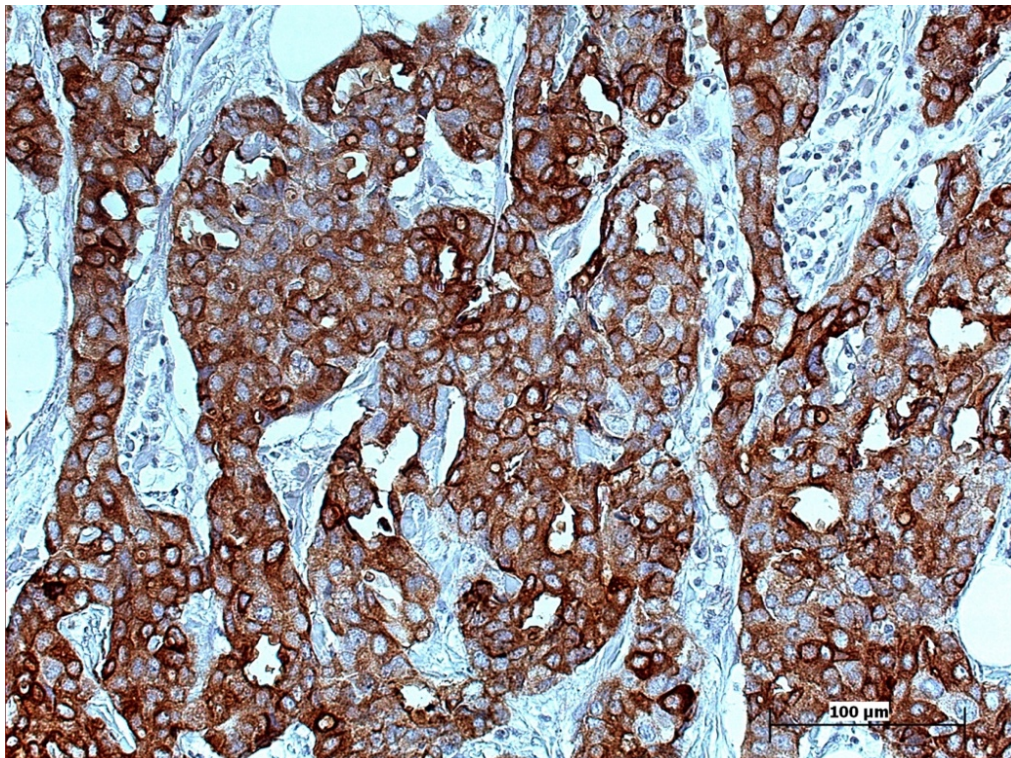
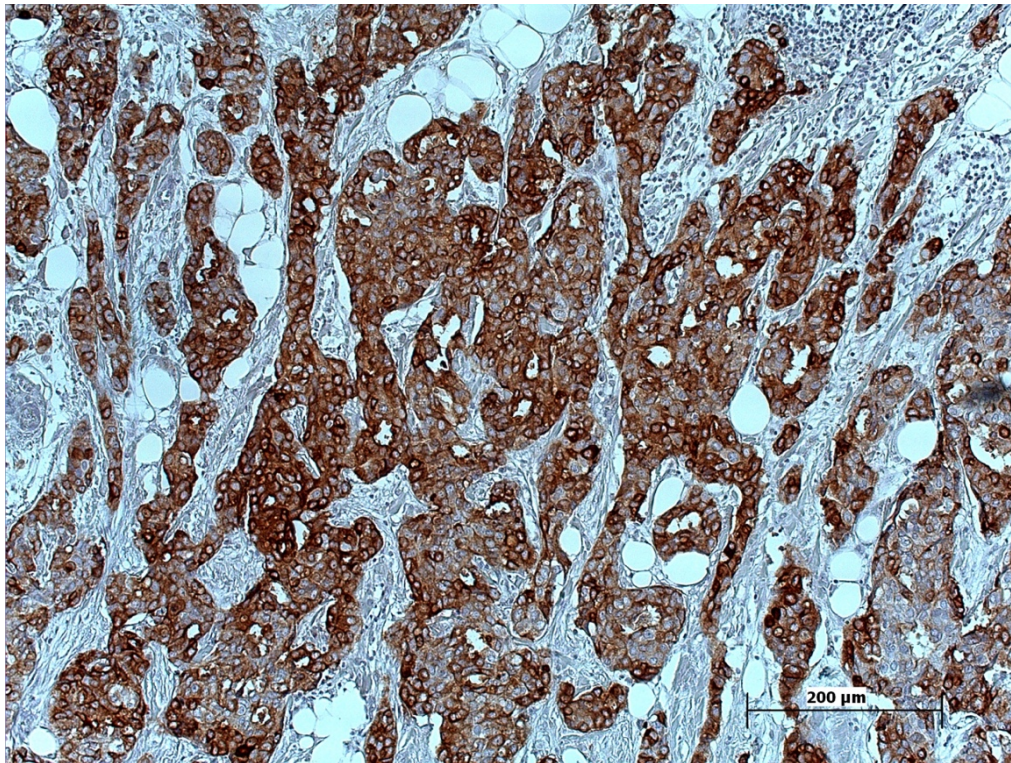


Abbildung 4 Cytoplasmatische MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5 IRS 2: Farbintensität mäßig, Anteil positiv gefärbter Zellen $\leq 10\%$. Histologie: gemischt invasiv duktal /lobulärem Mammakarzinoms, ER/PR+, HER2 –



*Abbildung 5 Cytoplasmatisch-membranöse MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5
IR Score von 9: Färbintensität stark (3), Anteil positiver Tumorzellen 51-80 % (3) invasiv-duktales
Mammakarzinom ER/PR +, HER2-*

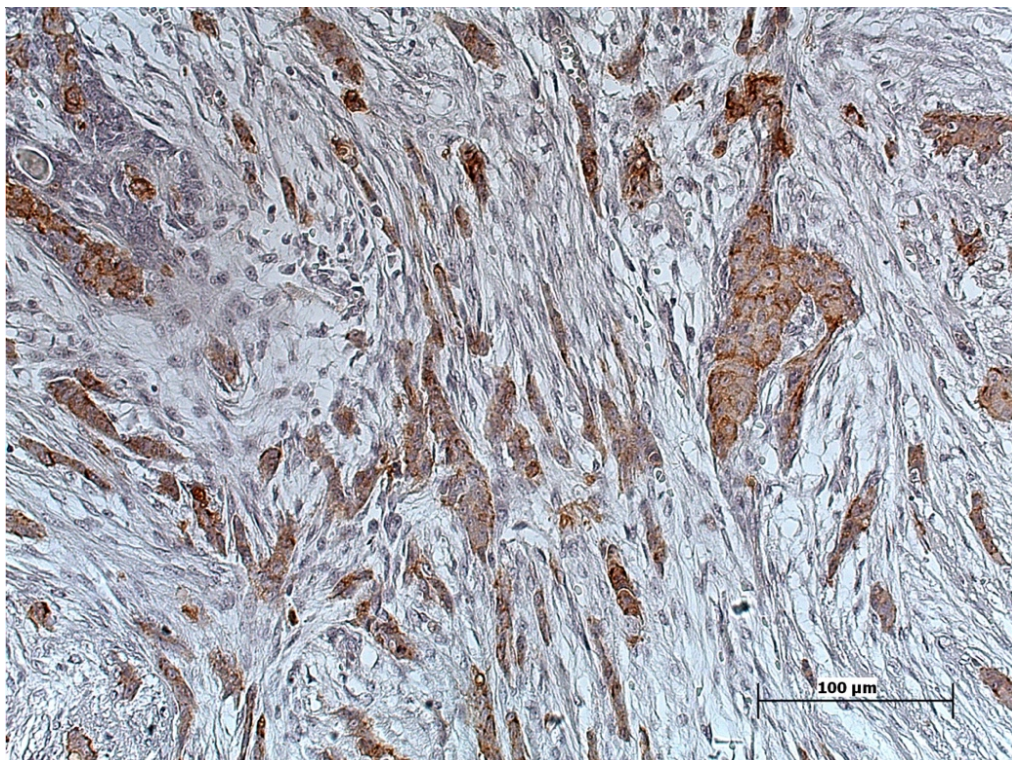
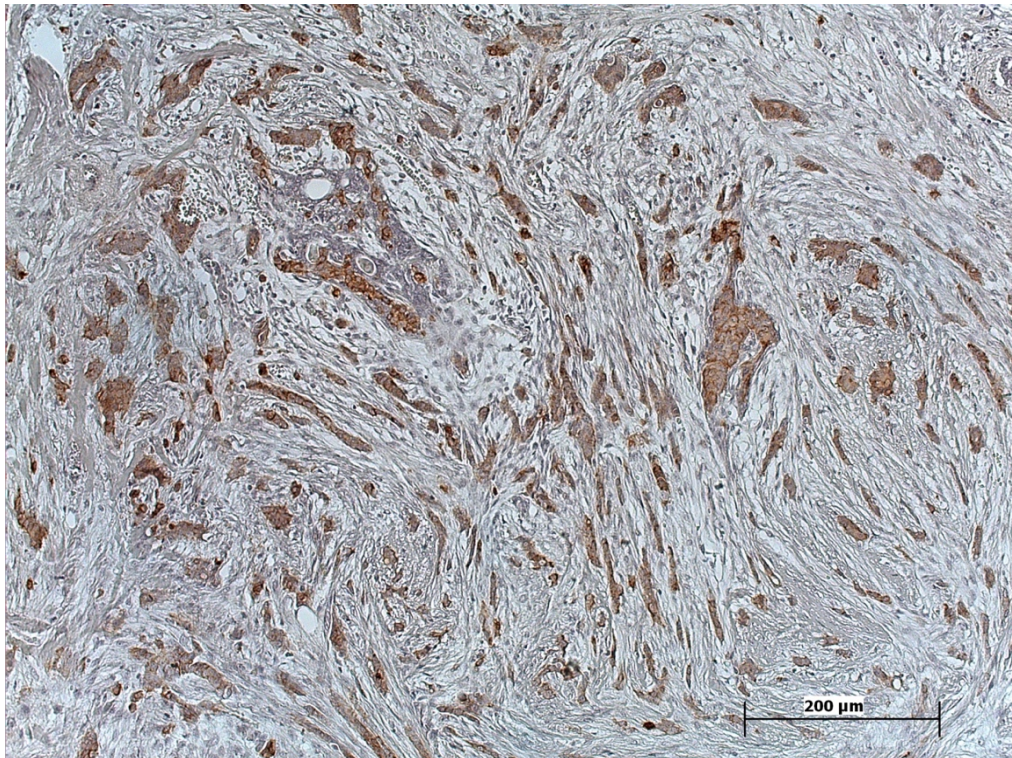
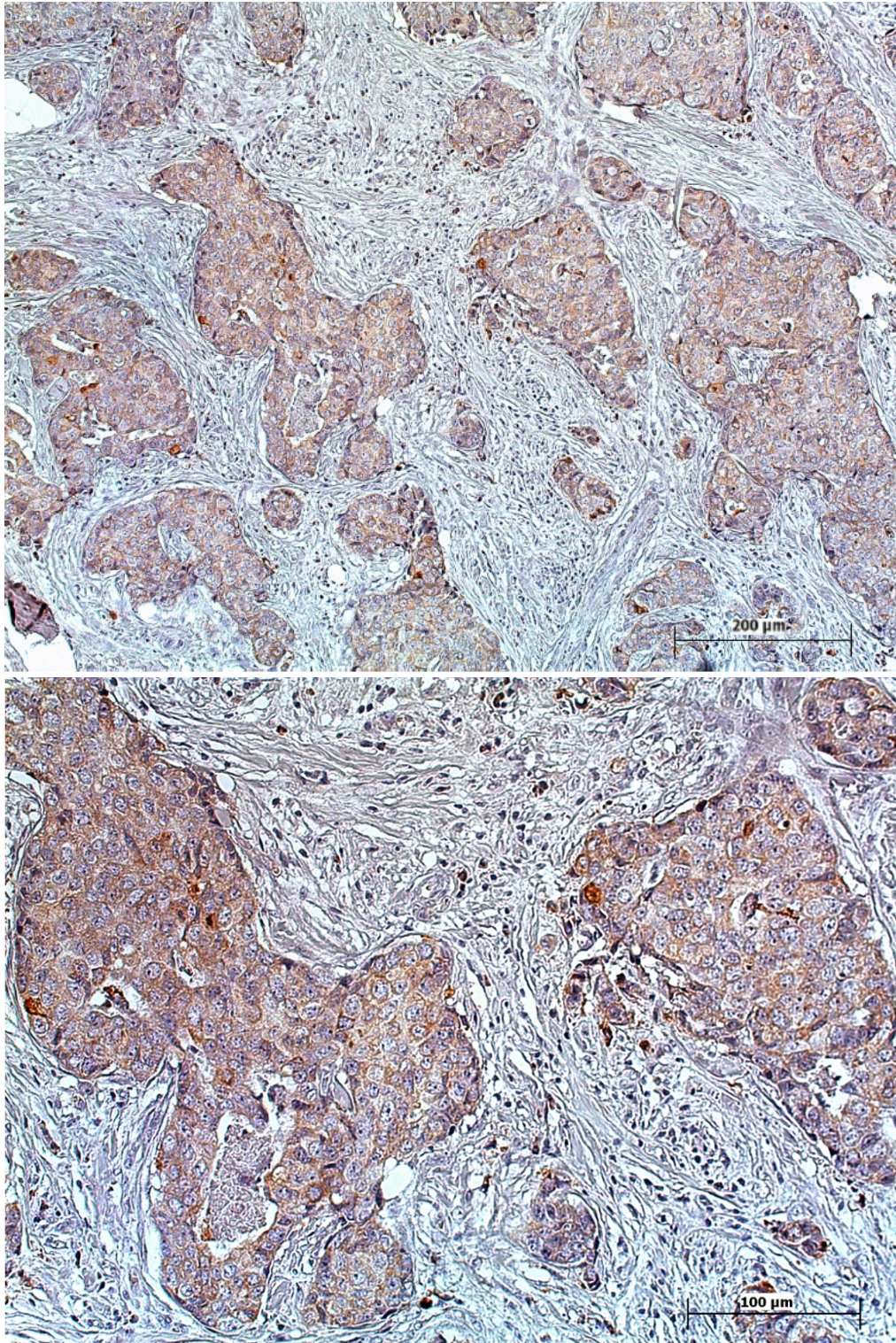


Abbildung 6 Membranös-cytoplasmatische MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5
IRS Beurteilung von 6 Färbintensität: stark (3) prozentualer Anteil positiv gefärbter Zellen 11-50 % (2), NST Mammakarzinom ER/PR +, HER2 –



*Abbildung 7 Cytoplasmatische MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den mAK VU4H5
IRS Beurteilung von 8 Färbintensität: mäßig (2) prozentualer Anteil positiv gefärbter Zellen
>80%(4), invasiv-duktales Mammakarzinom ER/PR -, HER2 +*

3.2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Statistikprogramm IBM®-SPSS®-Statistics 23.0 verwendet. Die deskriptive Analyse erfolgte anhand klinischer und histopathologischer Daten aus dem Krankenhausinformationssystem SAP der Universitätsmedizin Mainz sowie aus der Datenbank des Krebsregisters Rheinland-Pfalz. Kategoriale Variablen wurden unter Angabe von relativen und absoluten Häufigkeiten dargestellt. Stetige Variablen wurden anhand von Mittelwerten mit jeweiliger Standardabweichung und 95 %-Konfidenzintervall aufgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 angegeben, wobei bei einem explorativen Studiendesign von einer statistischen Auffälligkeit gesprochen werden muss.

Zur Korrelation der MUC1-Expression und TA-MUC1-Expression wurden Normalverteilungstest in Form des Shapiro-Wilk-Tests angewandt. Die Korrelationen zwischen den ordinalen Skalen der IR-Scores von MUC1 und TA-MUC1 wurden als abhängige Variablen behandelt.

Für die Korrelationsanalysen wurden zur Erhebung der Verteilung der MUC1-Expression über kategoriale Variablen nichtparametrische Tests (Mann-Whitney-U Test bzw. bei Variablen \geq zwei Kategorien der Kruskal-Wallis-Test) angewandt. Bei Variablen mit mehr als zwei Kategorien wurde ein paarweise-Vergleich unter Angabe der nicht-adjustierten p-Werte durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand von Boxplot-Diagrammen.

Zur Untersuchung der Verteilung der MUC1-Expression anhand von Median-Gruppen erfolgten Hypothesentests (Chi-Quadrat – oder Likelihood-Quotienten-Test). Die Ergebnisse wurden anhand von Kreuztabellen unter Angabe des nicht-adjustierten p-Wertes dargestellt. Für das Zusammenhangsmaß wurden der Phi-Koeffizient und Cramers V bestimmt. Im Anschluss wurde ein post-hoc-Chi-Quadrat-Test mit Angabe der adjustierten p-Werte (Bonferroni-Korrektur) durchgeführt. Das globale Signifikanzniveau wurde hierbei nicht gehalten, da durch die selektive Korrektur lediglich zum lokalen Signifikanzniveau α getestet wurde.

Nachfolgend wurde der Einfluss der MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben (*overall survival* (OVS)), metastasenfrie Überleben (*metastasis-free survival* (MFS)) und krankheitsfreie Überleben (*desease-free survival* (DFS)) anhand von Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt und die Signifikanz mittels Log-Rank-Test untersucht. Zensierte Patientinnen wurden miteingeschlossen (kein Eintritt des untersuchten Ereignisses in der gewählten Beobachtungszeit).

Material und Methoden

Abschließend wurde der unabhängige prognostische Einfluss für die Gesamtexpression und die subzelluläre Expression von MUC1 durch multivariate Cox-Regressionssanalysen mittels Rückwärtselimination (LR-Methode) in Bezug auf das OVS, MFS und DFS untersucht. Eine Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand des 95 %-Konfidenzintervalls und dem Hazard-Ratio sowie dem ermittelten p-Wert. Der Einschluss der aufgeführten Variablen erfolgte durch vorausgegangene univariate Cox-Regressionssanalysen sowie unter Berücksichtigung klinisch-relevanter Tumoreigenschaften.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv und klinische Parameter

Das Kollektiv umfasste 241 Patientinnen, die im Zeitraum von 2009 bis 2016 im Rahmen der Erstdiagnose eines Mammakarzinoms an der Universitätsmedizin Mainz in der Klinik für Frauenheilkunde behandelt wurden. Zum Zeitpunkt der Erhebung konnten für sieben Patientinnen keine klinischen Daten erfasst werden, diese wurden als *Lost-to-follow-up* eingestuft (n=234). Die Follow-Up-Rate betrug 97,1 %. Das durchschnittliche Patientenalter bei Erstdiagnose lag bei 60,3 Jahren (SD \pm 12,7 Jahre, 95 %-KI 58,7-61,9). Der mittlere Beobachtungszeitraum betrug 5,9 Jahre (SD \pm 2,3 Jahre, 95 %-KI 5,6-6,2). Das mediane Überleben konnte zum Zeitpunkt der Erhebung nicht bestimmt werden, da weniger als 50 % des Kollektivs das definierte Ereignis (Tod) erreicht hatten. Innerhalb des Beobachtungszeitraums verstarben 35 Patientinnen. Die 5-Jahres-Überlebensrate des Kollektivs betrug 92,3 %, die 10-Jahres-Überlebensrate lag bei 85 %.

Der überwiegende Anteil der Patientinnen (46,5 %) wies bei Erstdiagnose ein T2 Stadium auf, gefolgt von 44,8 % der Patientinnen im T1 Stadium und dem weitaus selteneren T3-Stadium mit 7,9 %. Bei Erstdiagnose zeigte sich bereits in 34,9 % der Fälle eine Lymphknotenbeteiligung und bei 31,1 % eine Infiltration des umliegenden Lymphgewebes und/oder Venengefäßsystems (Pn/L/V-positiv). Eine primäre Metastasierung galt als Ausschlusskriterium und kam somit nicht vor. Die weiteren im Follow-Up erhobenen Charakteristika sind im Folgenden aufgeführt (Tabelle 11).

Tabelle 11 Tumor- und patientenbezogene Daten für das Mammakarzinomkollektiv

Charakteristika der Patientinnen mit Mammakarzinom				
		Mittelwert	SD	95 %-KI
Alter (Jahren) zum Zeitpunkt der ED		60,3	\pm 12,66 Jahre	58,7-61,9
		n	%	
Lokalisation	links	132	54,7 %	
	rechts	109	45,3 %	
	unifokal	199	82,6 %	
	multizentrisch	42	17,4 %	
Invasiv-duktral/ NST		189	78,4 %	

Ergebnisse

Histologische Klassifikation	Invasiv lobulär	31	12,9 %
	gemischt duktal-lobulär/duktal-muzinös	12	5,0 %
	tubulär	2	0,8 %
	kribriform	1	0,4 %
	muzinös	6	2,5 %
T Status	T1	108	44,8 %
	T2	112	46,5 %
	T3	19	7,9 %
	Tx	2	0,8 %
Lymphknotenstatus	Negativ	156	64,7 %
	Positiv	84	34,9 %
	Nx	1	0,4 %
DCIS/ LIN	Negativ	62	25,7 %
	DCIS/LIN	179	74,3 %
Grading	G1	37	15,4 %
	G2	112	46,5 %
	G3	90	37,3 %
	Gx	2	0,8 %
Residualstatus	R0	225	93,4 %
	R1	16	6,6 %
Pn/L/V Status	L positiv	63	26,1 %
	V positiv	12	5,0 %
	Pn positiv	12	5,0 %
ER-Status	Positiv	183	75,9 %
	Negativ	58	24,1 %
PR-Status	Positiv	164	68,0 %
	Negativ	77	32,0 %
HER2-Status	Positiv	26	10,8 %
	Negativ	215	89,2 %

Ergebnisse

Lokalrezidiv	Rezidiv 1	16	6,5 %
	Rezidiv 2	4	1,2 %
Sekundäre Metastasierung	positiv	23	9,5 %

(ED = Erstdiagnose, SD= *Standard Deviation*, KI= Konfidenzintervall, n = Anzahl, Pn =Invasion der Perineuralscheide, L = Lymphgefäßinvasion, V = Venengefäßinvasion)

4.2 MUC1-Expression im Brustdrüsengewebe

4.2.1 MUC1-Expression im gesunden Gewebe

Neben der Färbung von Tumorpräparaten erfolgte als Negativkontrolle eine immunhistochemische Färbung von gesundem Brustdrüsengewebe mittels des mAK VU4H5. Hierbei zeigte sich eine positive Expression von MUC1 im Gesunden (Abb. 8). Es konnte überwiegend ein cytoplasmatisches Expressionsmuster gesunder Brustdrüsenzellen gezeigt werden, wobei sich auch geringe membranständige Anteile nachweisen ließen.



Abbildung 8 MUC1-Expression im gesunden Brustdrüsengewebe durch den mAK VU4H5

4.2.2 MUC1-Expression im Tumorgewebe

Gesamtexpression von MUC1 und der Vergleich mit TA-MUC1 im Tumorgewebe

Fünf Tumorschnitte wurden für die Korrelationen ausgeschlossen, da in diesen lediglich Carcinoma-in-Situ-Anteile (DCIS) und keine invasiven Karzinomanteile nachgewiesen werden konnten (n=236/241). Im Nachweis mittels des Antikörpers VU4H5 zeigte sich ein Anteil von 81,8 % (n=193/236) eindeutig MUC1-positiver Tumorschnitte (IRS > 2). Der Median lag bei einem IR-Score von 6 und teilte das Kollektiv in 147 Fälle (61 %) mit einer Expression oberhalb und 89 Fällen (37 %) unterhalb des Medians (Abb. 9). In 18,2 % (n=43) der Fälle wurde keine bzw. keine eindeutige Expression von MUC1 im Tumor nachgewiesen (IRS 0-2).

Im Nachweis von TA-MUC1 durch GSK1/30 zeigte sich ebenfalls eine ausgeprägte positive Expression im Tumorgewebe (1). Anhand einer Korrelationsanalyse wurde die Gesamtexpression von MUC1 und TA-MUC1 gegenübergestellt. In der IR-Score-Verteilung zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Unter Verwendung des Antikörpers VU4H5 ließ sich ein geringerer Anteil eindeutig positiver Brusttumorschnitte nachweisen als unter Verwendung von GSK-1/30 (MUC1: 81,8 % vs. TA-MUC1 92,4 %). In der Nachweisreaktion mittels GSK-1/30 zeigte sich zudem eine stärkere Gesamtexpression von MUC1 als mittels VU4H5 (Vgl. VU4H5: Median = IRS 6 vs. GSK-1/30: Median = IRS 8 (Abb. 10) (1).

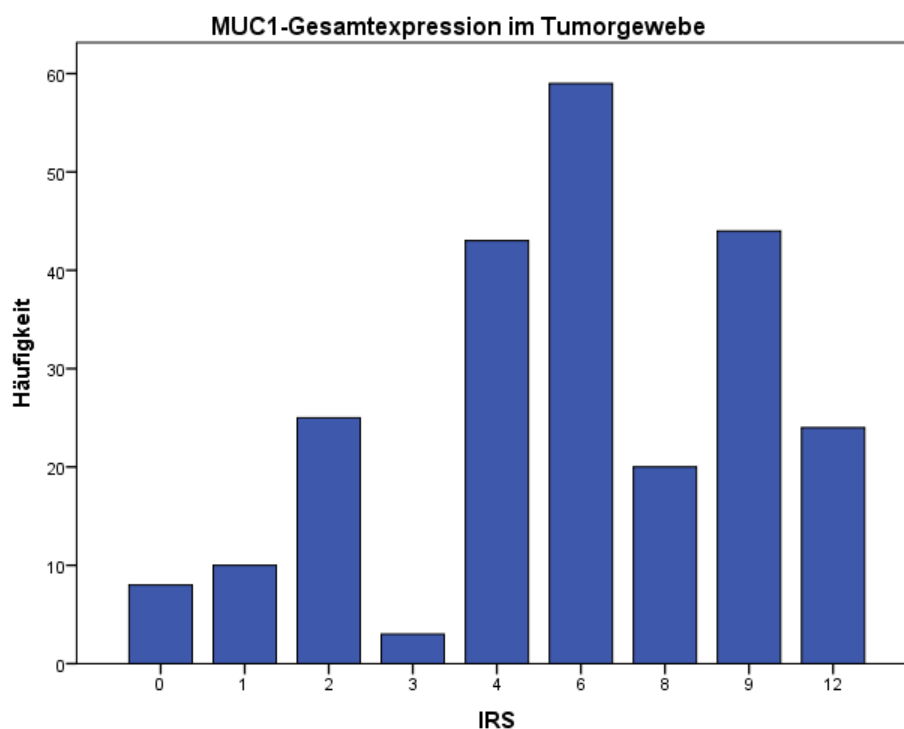


Abbildung 9 Häufigkeitsverteilung der MUC1-Gesamtexpression im Tumorgewebe mittels VU4H5 (IRS = Immunoreactive score)

Ergebnisse

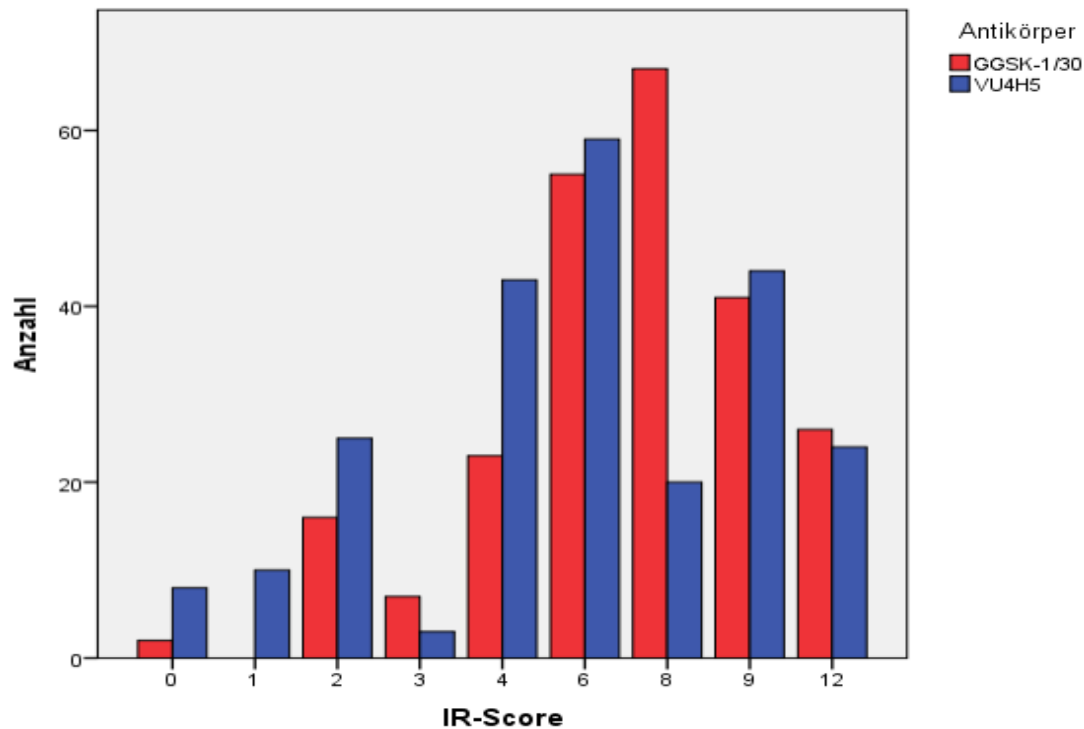


Abbildung 10 Gesamtexpression MUC1 vs. TA-MUC1 im Tumorgewebe
Vergleich der Verteilung von MUC1 und TA-MUC1 anhand des IR-Scores im Tumorgewebe. Im Vergleich zeigte GGSK-1/30 in der Verteilung einen höheren IR-Score als VU4H5. Blau: Antikörper VU4H5- gegen MUC1 gerichteter Antikörper. Die Daten wurden in dieser Dissertation erhoben. Rot: Antikörper GGSK-1/30- gegen TA-MUC1 gerichteter Antikörper. Die dargestellten Ergebnisse entstammen der Dissertation von Herrn Peter Fries, 2024, Universitätsmedizin Mainz, Fachbereich Humanmedizin.(1)

Subzelluläre Lokalisation von MUC1 und der Vergleich mit TA-MUC1 im Tumorgewebe

In der Verteilung der subzellulären Lokalisationen von MUC1 zeigte sich am häufigsten ein gemischtes cytoplasmatisch-membranöses Expressionsmuster (cm) (56,4 %, n=133). Ein rein cytoplasmatisches Expressionsmuster (c) war mit 39 % (n=92) am zweithäufigsten vertreten. Wesentlich seltener lag ein gemischtes membranös-cytoplasmatisches Expressionsmuster (mc) vor (1,7 %, n=4). Ein rein membranöses Expressionsmuster von MUC1 konnte in keinem der Tumorschnitte nachgewiesen werden. Ein doppelt-negatives Expressionsmuster (weder cytoplasmatisch noch membranär) ohne jegliche MUC1-Expression im Tumorgewebe lag bei einem Anteil von 3 % vor (n= 8) (Abb. 11).

Im Vergleich der Antikörperfärbungen von VU4H5 und GGSK-1/30 zeigte sich in Bezug auf die subzelluläre Lokalisation eine signifikant unterschiedliche Verteilung (Chi-Quadrat und Phi-Test $p < 0,001$). Der Anteil an Tumorschnitten mit cytoplasmatisch-membranösem-Expressionsmuster war im Nachweis durch VU4H5 deutlich niedriger als durch den Nachweis

Ergebnisse

mit GSK-1/30. Auch zeigte sich unter Verwendung von VU4H5 seltener ein membranös-cytoplasmatisches Expressionsmuster als bei GSK-1/30. Jedoch ließ sich bei VU4H5 häufiger ein rein cytoplasmatisches Expressionsmuster nachweisen als bei GSK-1/30. Der Anteil doppelt negativer Tumorschnitte war mittels GSK-1/30 geringer als bei Färbungen mittels VU4H5. Eine reine membranöse Expression von TA-MUC1 konnte mittels GSK1/30 ebenso wenig nachgewiesen werden wie für MUC1 durch VU4H5 (Abb. 12).

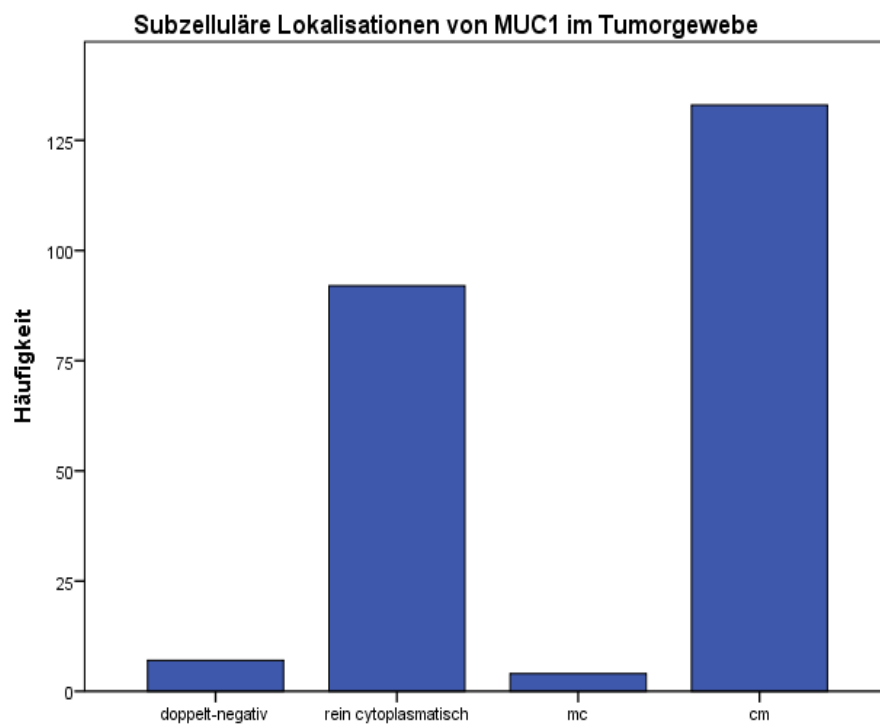


Abbildung 11 Häufigkeitsverteilung der subzellulären Lokalisationen von MUC1 im Tumorgewebe mittels VU4H5
(mc = membranös-cytoplasmatische Expression, cm = cytoplasmatisch-membranöse Expression)

Ergebnisse

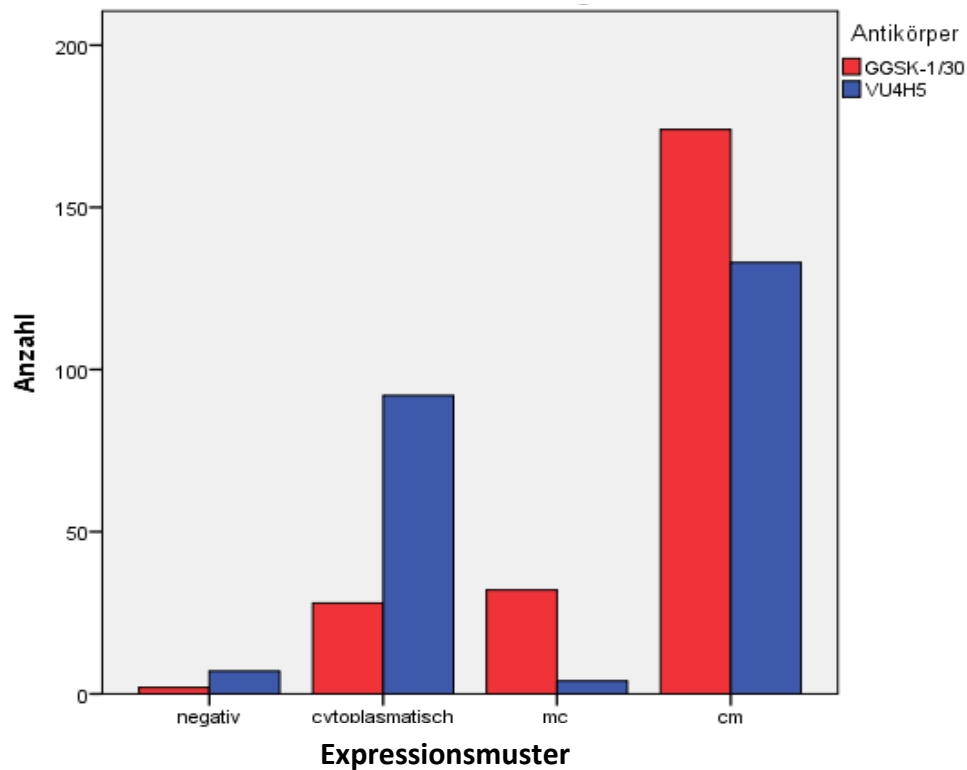


Abbildung 12 Gegenüberstellung der subzellulären Expression von MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe. Durch den Nachweis mittels GGSK-1/30 ließ sich häufiger eine mc-TA-MUC1 Expression nachweisen als durch VU4H5. Mittels VU4H5 ließ sich hingegen häufiger eine cyt.-Expression nachweisen als durch GGSK-1/30. Blau: Antikörper gegen MUC1 (VU4H5); Rot: Daten der Dissertation von Herrn Dr. Peter Fries, Antikörper gegen TA-MUC1 (GGSK-1/30) (1) Subgruppen: cytoplasmatisch (MUC1 39 % vs. TA-MUC1 11,8 %), cm= cytoplasmatisch-membranös (MUC1 56,3 %, vs. TA-MUC1 73,8 %), mc= membranös-cytoplasmatisch (MUC1 0,02 % vs. TA-MUC1 13,5 %), negativ= keine Expression (MUC1 3 % vs. TA-MUC1 0,8 %)

4.3 Korrelation zwischen Gesamtexpression und subzellulärer Lokalisation von MUC1

Nachfolgend wurde die Gesamtexpression von MUC1 in Abhängigkeit zur subzellulären Lokalisation im Tumorgewebe mittels des Antikörpers VU4H5 untersucht. In der Korrelationsanalyse konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lokalisation und der Höhe der Expression von MUC1 im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test $p < 0,001$). Die geringste MUC1-Expression zeigte sich bei einer rein cytoplasmatischen Lokalisation (Median = 4). Am höchsten war die MUC1-Expression bei Tumoren mit gemischt membranös-cytoplasmatischer Expression (Median = 9). Eine annähernd starke Expression zeigte sich in Tumoren mit cytoplasmatisch-membranöser Expression (Median = 8). Im paarweise-Vergleich ließen sich signifikante Unterschiede in der Expression von MUC1 zwischen folgenden subzellulären Gruppen nachweisen: Tumoren mit cytoplasmatischer Lokalisation zeigten eine signifikant schwächere MUC1-Expression als Tumoren mit membranös-cytoplasmatischer-Expression ($p = 0,006$) sowie eine schwächere Expression als

Ergebnisse

Tumoren mit cytoplasmatisch-membranösen-Expression ($p < 0,001$). Weitere signifikante Expressionsunterschiede zeigten sich in den Gruppen negative vs. cytoplasmatische Expression ($p = 0,005$), negative vs. cytoplasmatisch-membranöse Expression ($p < 0,001$) und negative vs. membranös-cytoplasmatische Expression ($p < 0,001$) (Abb. 13).

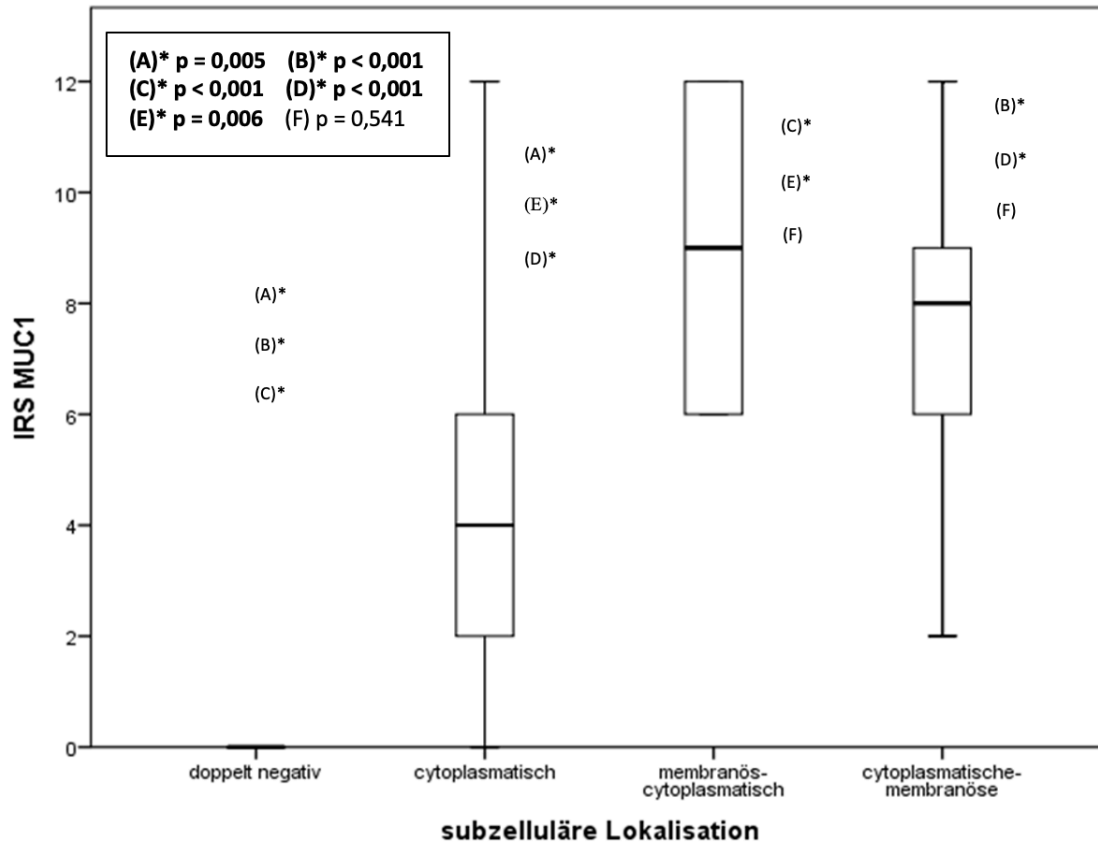


Abbildung 13 Verteilung der subzellulären MUC1-Expressionen nach IRS

Dargestellt ist die Verteilung der MUC1 Expression in Form des IR-Scores unterteilt nach subzellulärer Lokalisation. Tumoren mit cytoplasmatischer Lokalisation zeigten eine signifikant schwächere MUC1-Expression als Tumoren mit membranös-cytoplasmatischer Expression (E)*. Tumoren mit cytoplasmatischer Lokalisation zeigten eine signifikant schwächere MUC1-Expression als Tumoren mit cytoplasmatisch-membranöser Expression (D)* (Dargestellt sind der Median, die 25 % und die 75 % Perzentile (oberer und unterer Teil des Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie des Boxplots). Extremwerte werden nicht dargestellt. (IRS = Immunoreactive score))

Des Weiteren erfolgte die Betrachtung der Gesamtexpression von MUC1, in zwei Gruppen unterteilt nach Median, unter Berücksichtigung der subzellulären Lokalisation. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der einzelnen subzellulären Lokalisationen (Likelihood-Quotient $p < 0,001$, Cramers-V $< 0,557$). Tumoren mit cytoplasmatischem MUC1 lagen in ihrer Expression signifikant häufiger unterhalb des Medians als statistisch erwartet

Ergebnisse

(post-hoc-Chi-Quadrat $p < 0,001$). Tumoren mit gemischt cytoplasmatisch-membranöser MUC1-Lokalisation zeigten signifikant häufiger als statistisch erwartet eine MUC1-Expression oberhalb des Medians (post-hoc-Chi-Quadrat $p < 0,001$) (Abb. 14).

Auch bei Gegenüberstellung mit den restlichen Expressionsmustern zeigten sich signifikante Unterschiede in der Verteilung der MUC1-Expression, sowohl für cytoplasmatische Tumoren als auch Tumoren mit cytoplasmatisch-membranösen Expressionsmuster (cyt. vs. restliche: Chi-Quadrat-Test $p < 0,001$, Phi = 0,472; cm vs. restliche: Chi-Quadrat-Test $p < 0,001$, Phi = 0,514). Tumoren mit cytoplasmatischer Expression zeigten häufiger eine MUC1-Expression unterhalb des Medians als Tumoren der restlichen MUC1-Expression. In cytoplasmatisch-membranösen Tumoren hingegen wurde MUC1 häufiger oberhalb des Medians exprimiert als in der Vergleichsgruppe (Abb. 15 A-B).

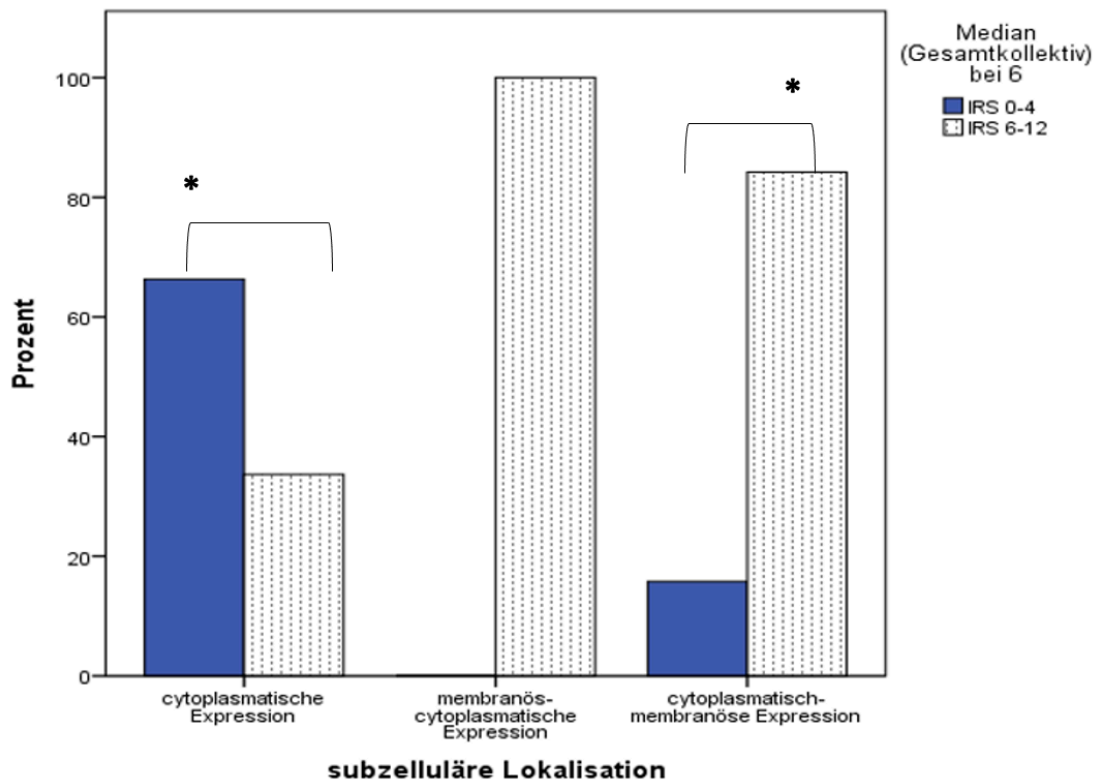


Abbildung 14 Gegenüberstellung der subzellulären MUC1-Lokalisationen nach Mediengruppen
Dargestellt ist die Verteilung der MUC1-Expression nach Mediengruppen in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation. Tumoren mit cyt.-MUC1-Expression zeigten signifikant eine Expression \leq Medians ($*p < 0,001$). Cm-MUC1-Tumoren wiesen signifikant häufiger als erwartet eine Expression oberhalb des Medians auf ($p < 0,001$). In Tumoren mit mc-MUC1-Expression wurde MUC1 ausschließlich oberhalb des Medians exprimiert.

Ergebnisse

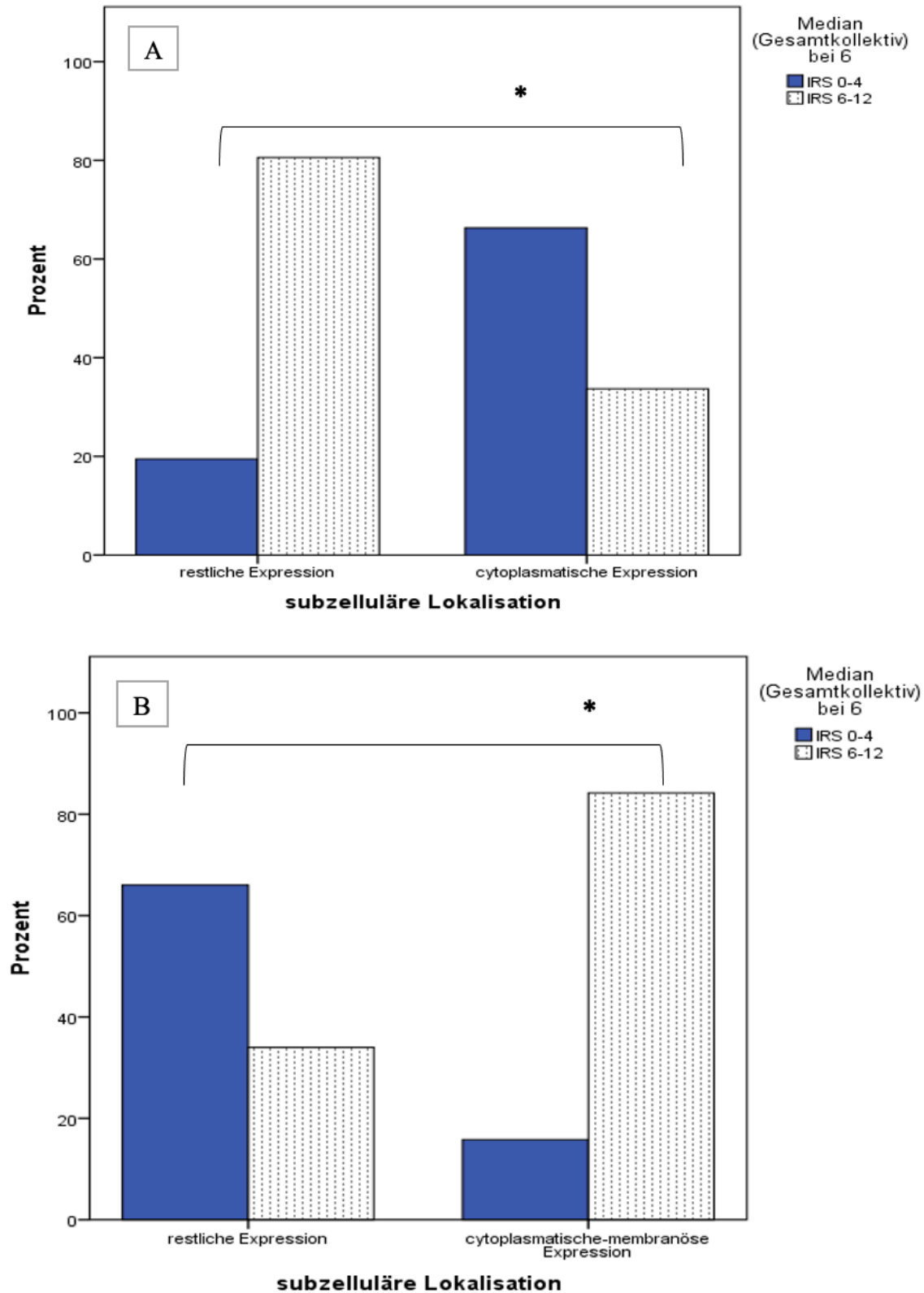


Abbildung 15 Gegenüberstellung einzelner subzellulärer MUC1-Lokalisationen nach Mediangruppen
 A: In der Gruppe cyt.- MUC1-Expression zeigte sich häufiger eine Expression unterhalb des Medians als in der Vergleichsgruppe (* $p < 0,001$). B: In der Gruppe cm-MUC1 zeigte sich in über 80% der Fälle eine Expression oberhalb des Medians (* $p < 0,001$) wohingegen in der Vergleichsgruppe überwiegend eine Expression unterhalb des Medians vorlag (* $p < 0,001$).

4.4 Korrelation von MUC1 mit patientenbezogenen und histopathologischen Daten

Die Analyse und statistische Auswertung der MUC1-Expression gegenüber histopathologischen und patientenbezogenen Daten werden im Folgenden dargestellt. Nicht signifikante Ergebnisse der MUC1-Expression wurden aufgeführt, sofern signifikante Ergebnisse für die TA-MUC1-Expression (1) vorlagen und dem Vergleich dienten. Die Ergebnisdarstellung erfolgte separat für die Gesamtexpression von MUC1 und der subzellulären Lokalisation von MUC1.

4.4.1 Expression von MUC1 in Abhängigkeit des Alters bei Erstdiagnose

Für die folgenden Korrelationen wurde das Patientinnen-Kollektiv in zwei Altersklassen unterteilt: in die Gruppe der über 55-Jährigen (n=149) und in die Gruppe der ≤ 55-Jährigen (n=87).

Gesamtexpression von MUC1 in Abhängigkeit vom Alter

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und der MUC1-Gesamtexpression im Tumorgewebe (Chi-Quadrat: $p = 0,03$, $\Phi = 0,134$). Patientinnen ≤ 55 Jahren zeigten im Tumor häufiger eine MUC1-Expression oberhalb des Medians als Patientinnen > 55 Jahren (Abb. 16). In der Vergleichsarbeit mit GGSK-1/30 ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der TA-MUC1-Gesamtexpression und dem Alter der Patientinnen nachweisen (1).

Ergebnisse

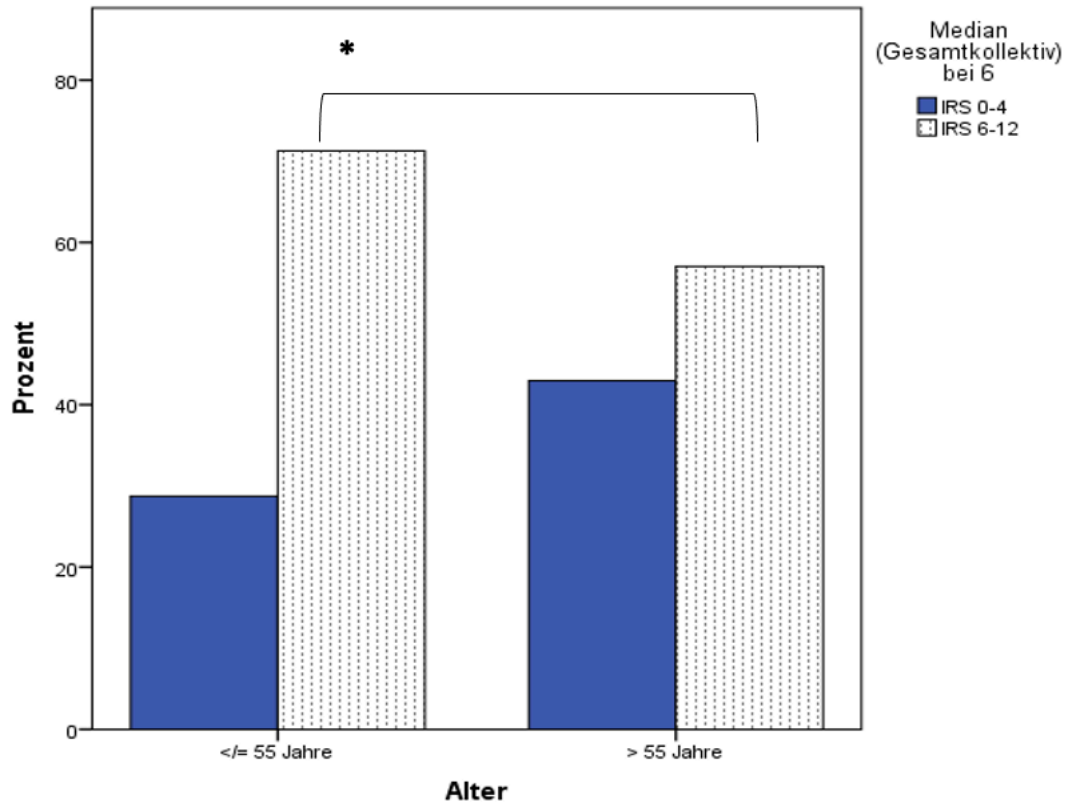


Abbildung 16 MUC1-Gesamtexpression in Korrelation zum Alter bei Erstdiagnose Patientinnen ≤ 55 Jahren zeigten innerhalb ihrer Gruppe häufiger eine MUC1-Expression oberhalb des Medians als Patientinnen > 55 Jahren (* $p = 0,03$).

Subzelluläre Lokalisation von MUC1 in Abhängigkeit vom Alter

Die subzelluläre Lokalisation von MUC1 und das Alter bei Erstdiagnose zeigten keinen signifikanten Zusammenhang. Im Vergleich zeigten die Ergebnisse der TA-MUC1-Expression unterteilt nach subzellulärer Lokalisation ebenfalls keinen signifikanten Unterschied abhängig vom Alter.

4.4.2 Expression von MUC1 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

Eine Expression von MUC1 konnte in allen vorhandenen Tumorphistologien des Kollektivs nachgewiesen werden. Die häufigste Tumorentität des Gesamtkollektivs stellte das invasiv-duktales Karzinom dar ($n=185$). Invasiv-lobuläre Karzinome waren wesentlich seltener ($n=30$). Weitere histologische Typen waren das gemischt duktales/lobulär-muzinöses Karzinom ($n=12$), gefolgt vom rein muzinösen Typ ($n=6$). Die Gruppe „sonstige“ Histologien beinhaltete das tubuläre und das kribriiforme Karzinom ($n=3$).

Gesamtexpression von MUC1 in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp

In invasiv-lobulären Karzinomen zeigte sich die stärkste MUC1-Expression (Median = 7). Das muzinöse Karzinom wies die schwächste MUC1-Expression auf (Median = 3). In NST-Tumoren und gemischten Tumoren lag eine annähernd gleich starke Expression von MUC1 vor (Median = 6). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der MUC1-Expression in Abhängigkeit von der Tumorphistologie ($p = 0,414$ (Abb.17)).

Demgegenüber konnte in der Arbeit von Herrn Fries ein signifikanter Zusammenhang zwischen der TA-MUC1-Expression und dem histologischen Subtyp nachgewiesen werden (1). Invasiv-lobuläre Karzinome zeigten hier die stärkste TA-MUC1-Expression. Muzinöse Karzinome wiesen eine signifikant schwächere TA-MUC1-Expression auf als Tumoren anderer histologischer Subtypen.

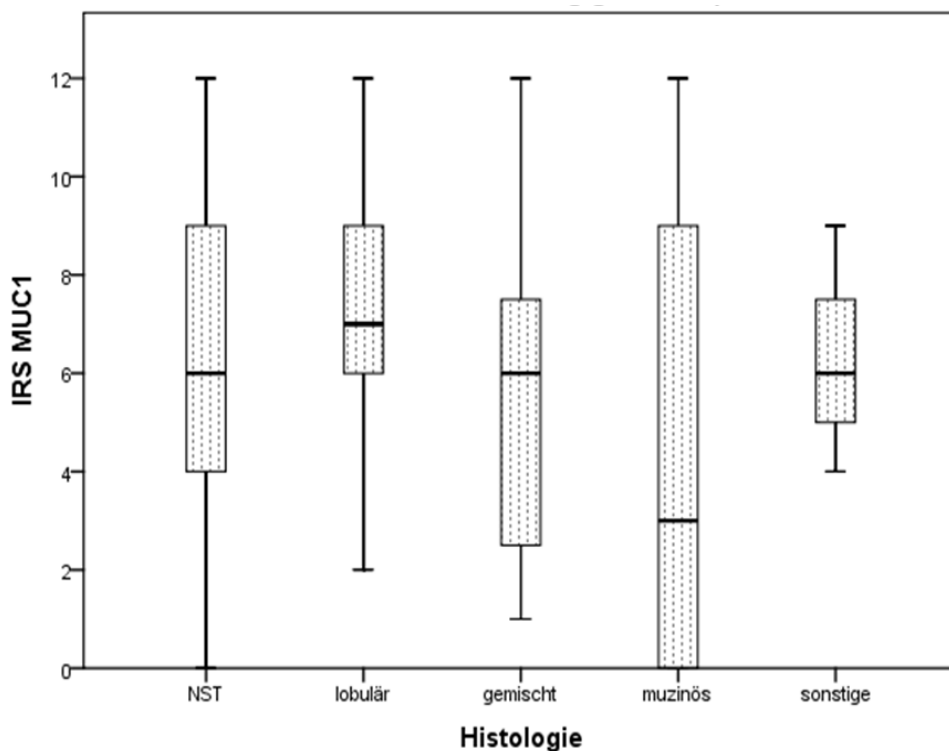


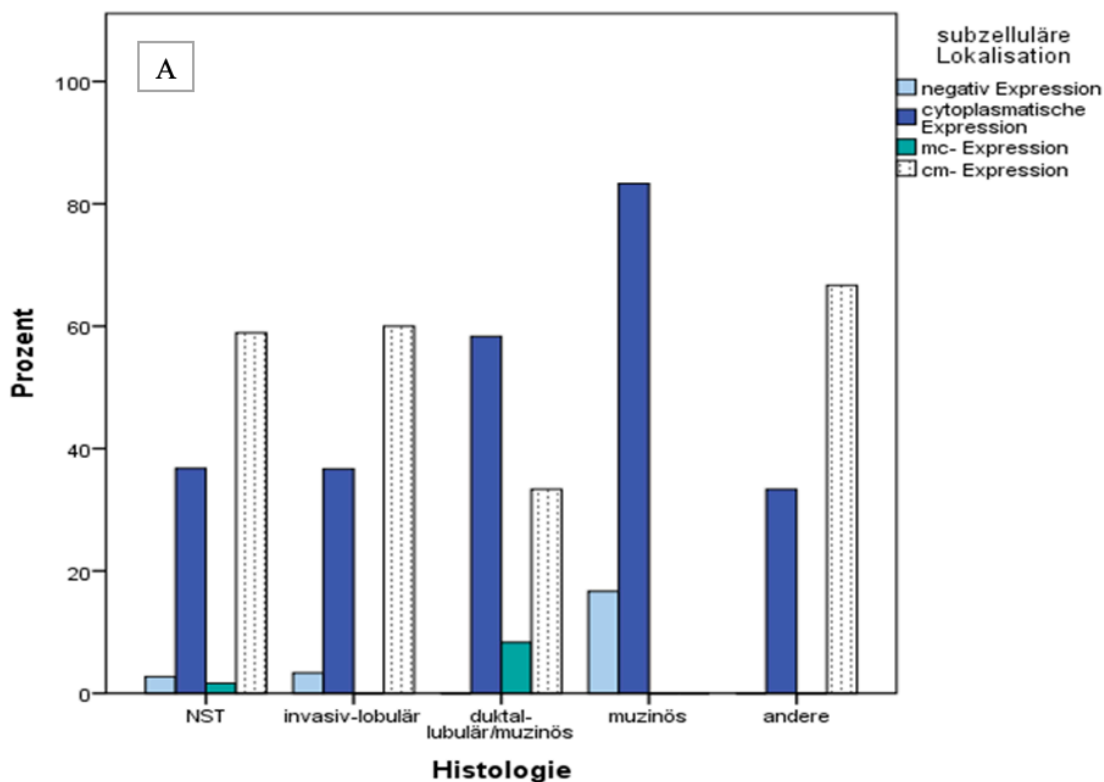
Abbildung 17 MUC1-Gesamtexpression unterteilt nach histologischem Subtyp

Abgebildet ist die MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den IR-Score, unterteilt nach histologischem Subtyp. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Gesamtexpression von MUC1 ($p = 0,414$). Die zentrale Linie der Boxplots stellt den Median dar. Dargestellt sind 25 % und die 75 % Perzentile (oberer und unterer Teil des Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie des Boxplots).

Subzelluläre Lokalisation von MUC1 in Abhängigkeit des histologischen Subtyps

Zwischen der subzellulären Lokalisation von MUC1 im Tumorgewebe und der Tumorphistologie konnte ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test $p = 0,025$, Cramers-V = 0,217). In muzinösen Tumoren wurde seltener als statistisch erwartet eine cytoplasmatisch-membranöse-Expression nachgewiesen (post-hoc-Chi-Quadrat $p = 0,039$). Muzinöse Tumoren zeigten in über 80 % der Fälle eine cytoplasmatische Expression; in keinem der muzinösen Tumoren ließ sich eine cytoplasmatisch-membranöse MUC1-Expression nachweisen (Abb. 18).

Im Vergleich zeigte die subzelluläre Verteilung von TA-MUC1 und die Tumorphistologie ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang (1). NST-Tumoren wiesen am häufigsten eine cytoplasmatisch-membranöse TA-MUC1-Expression auf. In muzinösen Tumoren waren geringe cytoplasmatisch-membranöse-Expressionen von TA-MUC1 nachweisbar. Diese waren signifikant niedriger als statistisch erwartet im Kollektiv vertreten. Gleichzeitig zeigten muzinöse Tumoren signifikant häufiger eine rein cytoplasmatische Expression von TA-MUC1 als Tumoren der übrigen Histologien (1).



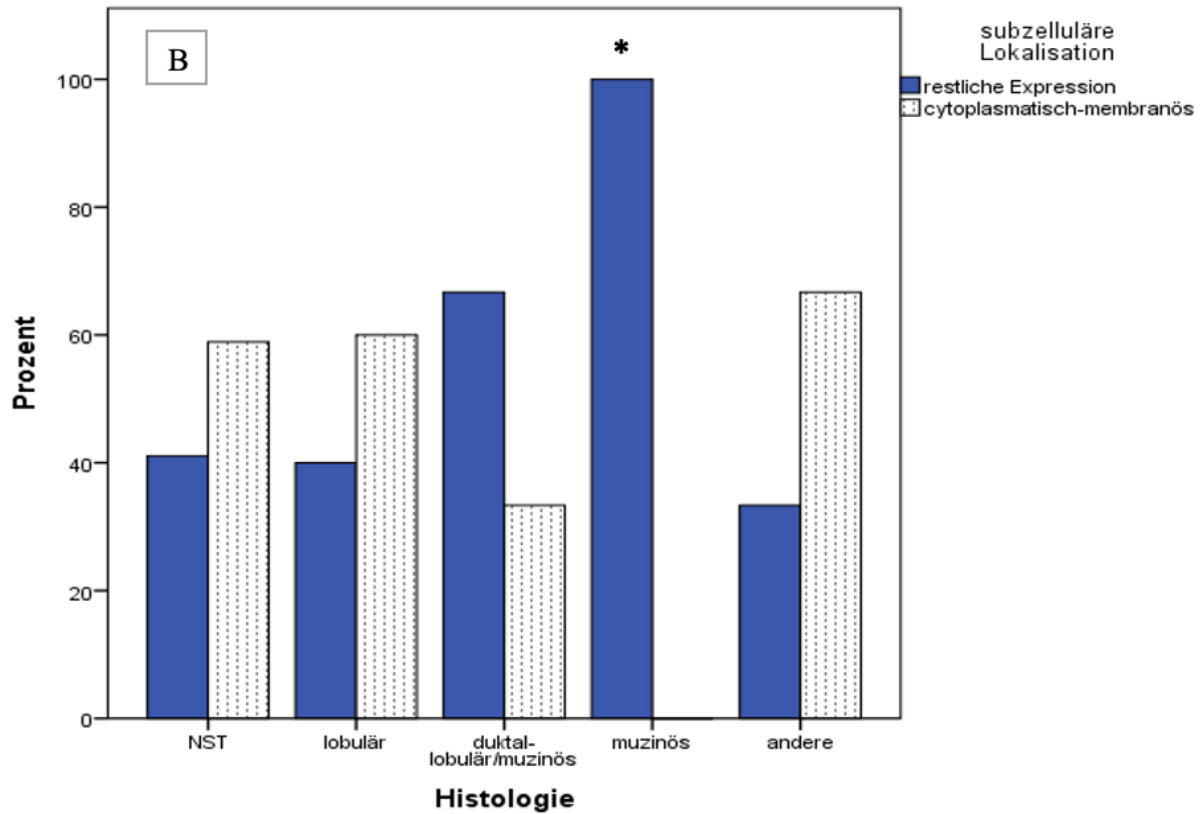


Abbildung 18 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation mit der Tumorhistologie
 A: Dargestellt ist die Verteilung der MUC1-Lokalisationen nach histologischem Subtyp, B: Dargestellt ist die Verteilung von Tumoren mit cm-MUC1-Expression im Vergleich mit den restlichen MUC1-Expressionsmustern in den jeweiligen histologischen Subgruppen. In der Gruppe von NST- und lobulären- Tumoren zeigte sich häufiger eine cm-Expression als andere Expressionsmuster. In muzinösen Tumoren wurden hingegen keine cm-Expressionen nachgewiesen (* $p = 0,03$). (mc = membranös-cytoplasmatische Expression, cm = cytoplasmatisch-membranöse Expression)

4.4.3 Korrelation von MUC1 und T-Stadium im Tumorgewebe

Die Verteilung der Tumorstadien im Patientenkollektiv lag wie folgt vor: am häufigsten waren T2-Tumoren (n=112, 46,9 %) vertreten, gefolgt vom kleineren Tumorstadium T1 (n=108, 45,2 %). T3-Tumoren machten den geringsten Anteil aus (n=19, 7,9 %).

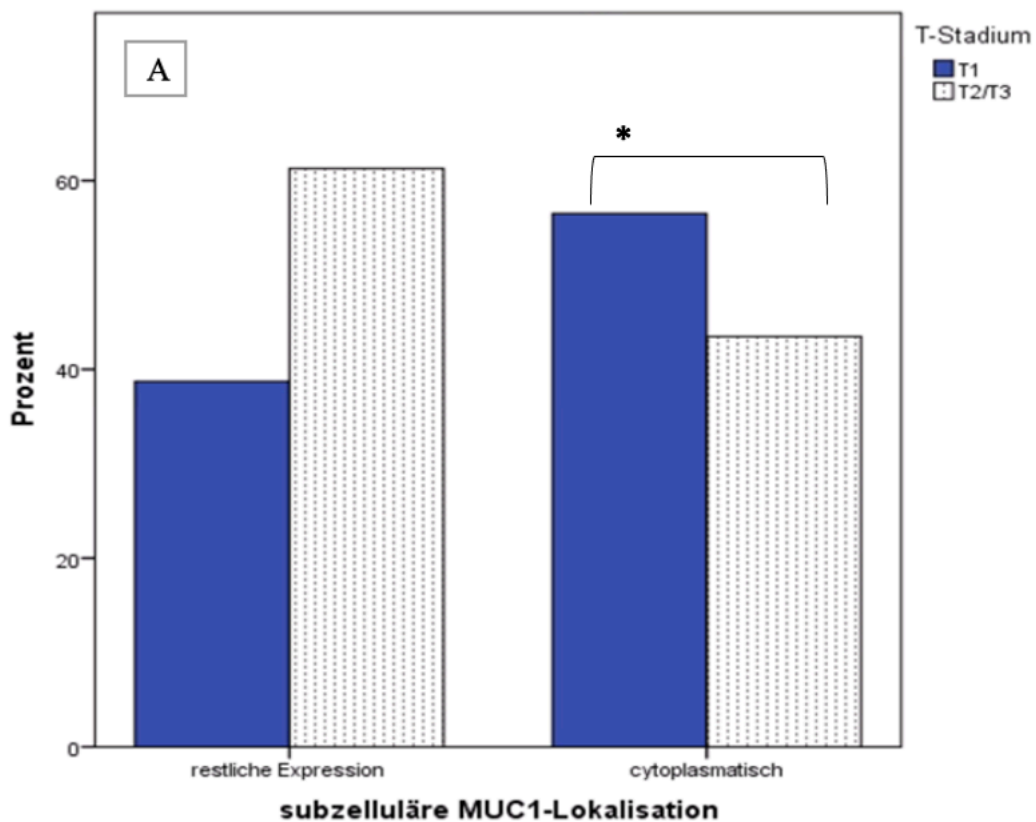
Gesamtexpression von MUC1 in Abhängigkeit des Tumorstadiums

Zwischen der MUC1-Gesamtexpression und den Tumorstadien konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Die Daten von TA-MUC1 und dem Tumorstadium zeigten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang (1).

Subzelluläre Lokalisation von MUC1 in Abhängigkeit vom Tumorstadium

Zwischen der subzellulären Lokalisation von MUC1 und dem Tumorstadium zeigte sich eine tendenzielle Abhängigkeit (Chi-Quadrat-Test: T1 vs. T2/T3 $p = 0,055$). Bei Gegenüberstellung der Gruppe cytoplasmatische MUC1-Expression mit den übrigen Expressionsformen konnte ein signifikanter Zusammenhang zum Tumorstadium nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test $p = 0,008$, Phi = 0,174). Innerhalb der cytoplasmatischen-MUC1-Gruppe lag häufiger ein niedriges T-Stadium (T1) vor (Abb. 19 A).

Ebenfalls signifikante Unterschiede zeigten sich bei Gegenüberstellung der Gruppen cytoplasmatisch-membranöse Expression und restliche Expression. Tumoren mit cytoplasmatisch-membranöser MUC1-Expression wiesen signifikant häufiger ein höheres Tumorstadium auf als Tumoren der restlichen MUC1-Lokalisationen (Chi-Quadrat-Test: T1 vs. T2/3 $p = 0,019$, Phi 0,154) (Abb. 19 B). In der Vergleichsarbeit mit GGSK-1/30 ließen sich hingegen keine signifikanten Korrelationen zwischen der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 und dem Tumorstadium nachweisen (1).



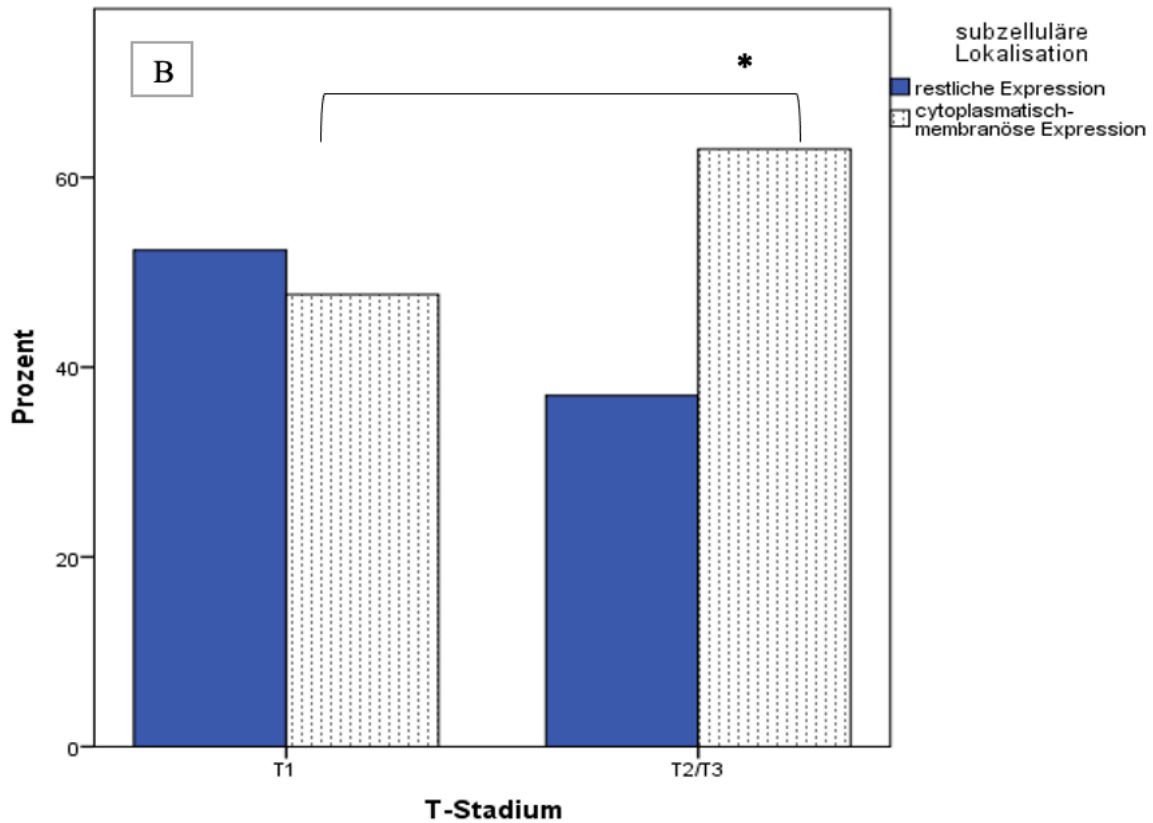


Abbildung 19 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum Tumorstadium

A: Dargestellt ist die Verteilung der cytoplasmatischen-MUC1-Expression gegenüber der restlichen Expression in Korrelation zum T-Stadium. In der Gruppe mit cytoplasmatischer-MUC1-Expression zeigte sich häufiger ein niedriges T-Stadium (T1) als in der Vergleichsgruppe (* $p = 0,008$). B: Dargestellt ist die Verteilung der cytoplasmatisch-membranösen-MUC1-Expression gegenüber der restlichen Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums. Innerhalb der Gruppe mit hohem Tumorstadium (T2/3) zeigte sich häufiger eine cytoplasmatisch-membranöse Expression als andere Expressionsmuster (* $p = 0,019$).

4.4.4 Korrelation von MUC1 im Tumorgewebe und dem Nodalstatus

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wiesen 83 Patientinnen (35,6 %) einen Lymphknotenbefall auf. In 150 Fällen (64,4 %) zeigte sich ein negativer Nodalstatus.

Korrelation der Gesamtexpression von MUC1 und dem Nodalstatus

Sowohl für die MUC1-Gesamtexpression als auch für die TA-MUC1-Expression im Tumorgewebe zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zum Lymphknotenbefall (1).

Korrelation der subzellulären Lokalisation von MUC1 in Abhängigkeit des Nodalstatus

Zwischen der subzellulären Lokalisation von MUC1 und dem Lymphknotenstatus zeigten sich signifikante Zusammenhänge (Chi-Quadrat-Test $p = 0,037$, Phi = 0,138). Tumoren mit cytoplasmatischer MUC1-Expression zeigten hierbei seltener als statistisch erwartet eine Lymphknotenbeteiligung (post-Hoc-Chi-Quadrat-Test $p = 0,036$) (Abb. 20). Auch für TA-MUC1

Ergebnisse

zeigten sich in Tumoren mit cytoplasmatischer TA-MUC1-Expression seltener ein Lymphknotenbefall als in der Gruppe der restlichen Expressionsmuster (1).

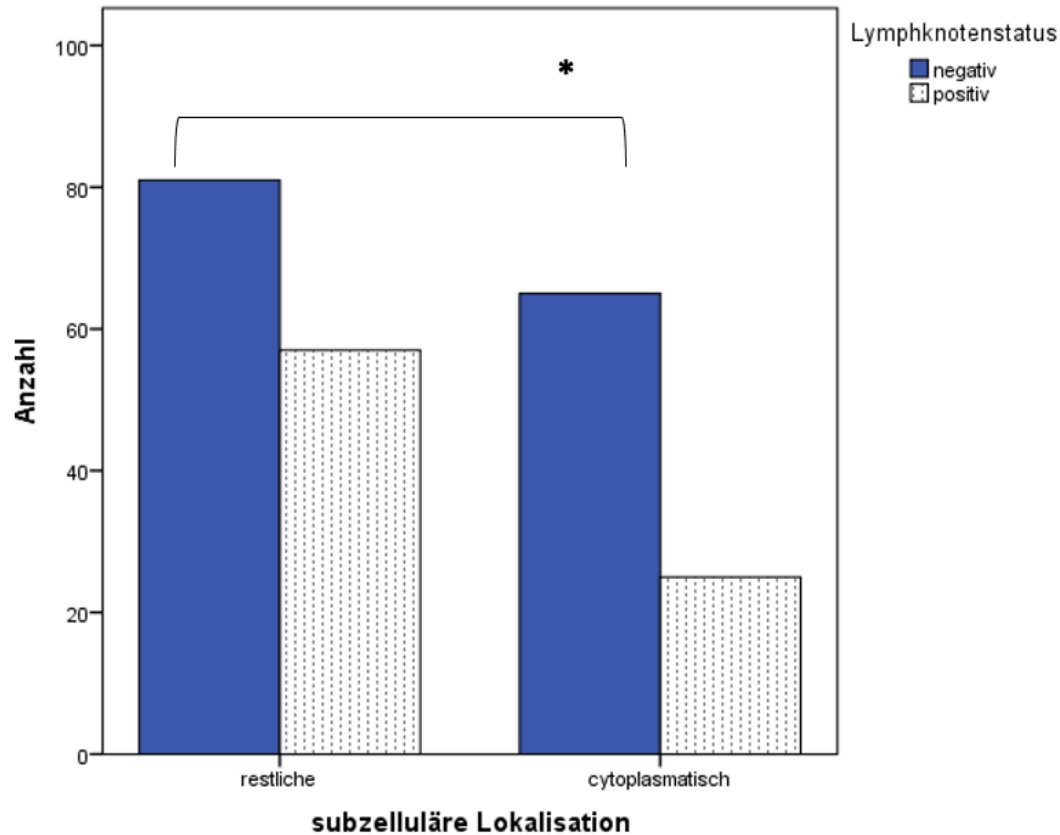


Abbildung 20 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum Lymphknotenstatus

Dargestellt ist die Verteilung von cytoplasmatischer MUC1-Expression gegenüber den restlichen Expressionsmustern nach Lymphknotenstatus. Tumoren mit cytoplasmatischer MUC1-Expression zeigten innerhalb ihrer Gruppe seltener eine Lymphknotenbeteiligung als die Gruppe der übrigen Expressionsmuster (* $p = 0,036$).

4.4.5 Korrelation von MUC1 und dem Tumorgrading

Das Grading war wie folgt im Tumorkollektiv verteilt: G1 = 15,8 % (n=37), G2 = 46,6 % (n=109) und G3 = 37,6 % (n=88).

Korrelation der Gesamtexpression von MUC1 mit dem Grading

Die Korrelation zwischen der Gesamtexpression von MUC1 und dem Tumorgrading zeigte sich statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,005$). MUC1 war in G2-Tumoren signifikant stärker exprimiert als in G1-Tumoren ($p = 0,034$). Ebenfalls zeigte sich ein

Ergebnisse

signifikanter Unterschied in der MUC1-Expression zwischen G2- und G3-Tumoren ($p = 0,017$). MUC1 war stärker in G2-Tumoren als in G3-Tumoren exprimiert (Abb. 21).

Auch nach Unterteilung der Grading-Stadien in Mediengruppen der MUC1-Expression zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zum Tumorgrading (Chi-Quadrat-Test: $p = 0,018$, Cramers-V = 0,186). Tumoren im G2-Stadium zeigten signifikant häufiger als statistisch erwartet eine MUC1-Expression oberhalb des Medians und weniger häufig eine Expression unterhalb des Medians (post-Hoc-Chi-Quadrat = 0,029) (Abb. 22).

Im Vergleich zwischen der Expression von TA-MUC1 und dem Grading war ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang nachweisbar. G1-Tumoren zeigten hier eine schwächere TA-MUC1-Expression als G2-Tumoren. Zudem wiesen G2-Tumoren häufiger eine TA-MUC1-Expression oberhalb des Medians auf. Zusätzlich war zwischen G2 und G3 Tumoren ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der TA-MUC1-Expression nachweisbar (1).

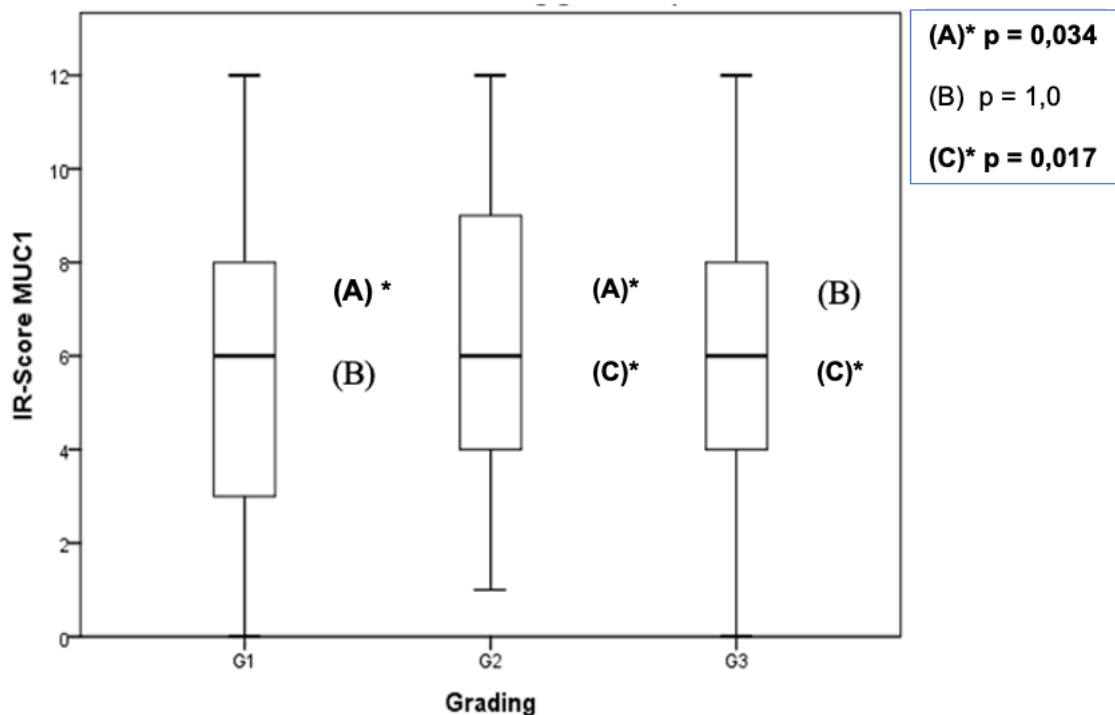


Abbildung 21 MUC1-Gesamtexpression in Korrelation mit Gradingstadien

Dargestellt ist die MUC1-Expression im Tumorgewebe durch den IR-Score, unterteilt nach Grading. Im G2 Stadium zeigte sich eine signifikant höhere MUC1-Gesamtexpression als im G1-Stadium (A). Im G2 Stadium zeigte sich ebenso eine signifikant höhere MUC1-Gesamtexpression als im G3 Stadium (C). Es sind der Median sowie die 25 % und die 75 % Perzentile gezeigt (oberer und unterer Teil des Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie des Boxplots). Extremwerte werden nicht dargestellt.

Ergebnisse

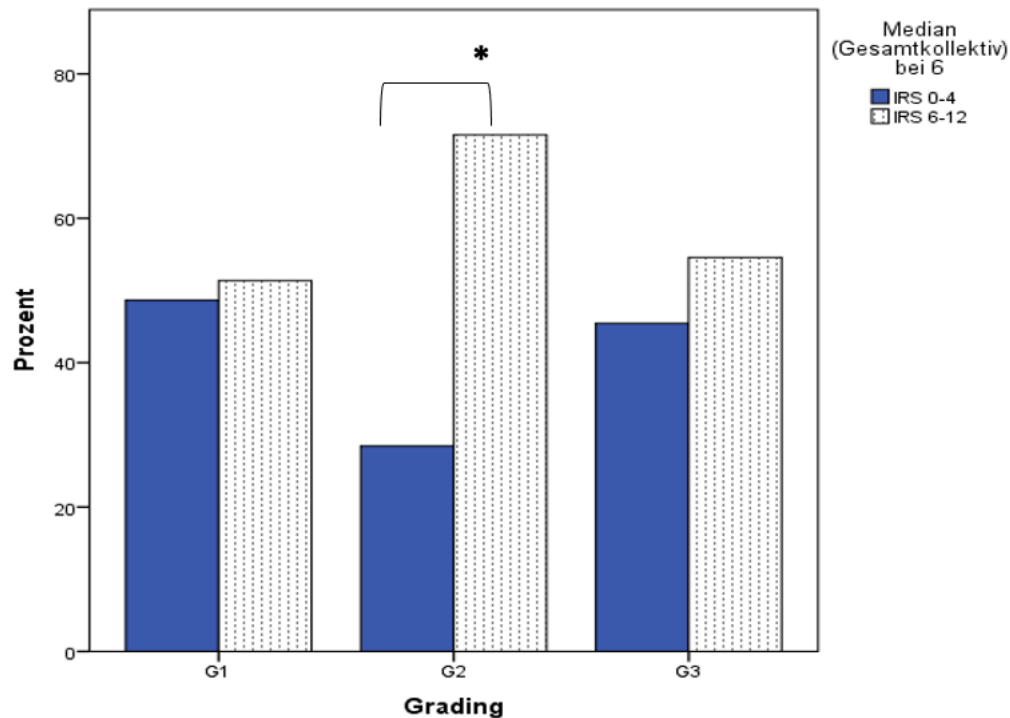


Abbildung 22 MUC1-Gesamtexpression nach Mediengruppen in Abhängigkeit der Gradingstadien
Tumoren im G2-Stadium zeigten signifikant häufiger als erwartet eine MUC1-Expression oberhalb des Medians (* $p = 0,029$). In Tumoren im G1- Stadium zeigte sich annähernd eine ausgeglichene Expression oberhalb und unterhalb des Medians.

Korrelation der subzellulären Lokalisation von MUC1 in Abhängigkeit vom Grading

Zwischen der subzellulären MUC1-Expression und dem Grading konnte ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (Likelihood-Quotient $p = 0,012$, Cramers-V = 0,166). Tumoren mit cytoplasmatischer MUC1-Expression zeigten am häufigsten ein G1-Stadium. Im Gegensatz dazu lag für Tumoren mit einer membranös-cytoplasmatischen MUC1-Expression in keinem Fall ein niedriges Grading-Stadium (G1) vor. In der Gruppe der cytoplasmatisch-membranösen Tumoren zeigte sich im Vergleich häufiger ein hohes Gradingstadium (G3) als in Tumoren anderer Expressionsmuster (Abb. 23 A).

Auch bei Gegenüberstellung von G3 vs. G2/G1-Tumoren zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der subzellulären Lokalisation (Chi-Quadrat-Test $p = 0,018$, Cramers-V = 0,155). Tumoren mit cytoplasmatischer MUC1-Expression wiesen seltener als statistisch erwartet ein G3-Stadium auf als Tumoren der restlichen MUC1-Expressionsmuster (Post-hoc-Chi-Quadrat $p < 0,07$) (Abb. 23 B). In der Vergleichsarbeit für GGSK-1/30 ergab sich zwischen der subzellulären Lokalisation von TA-MUC1 und dem Grading kein signifikanter Zusammenhang (1).

Ergebnisse

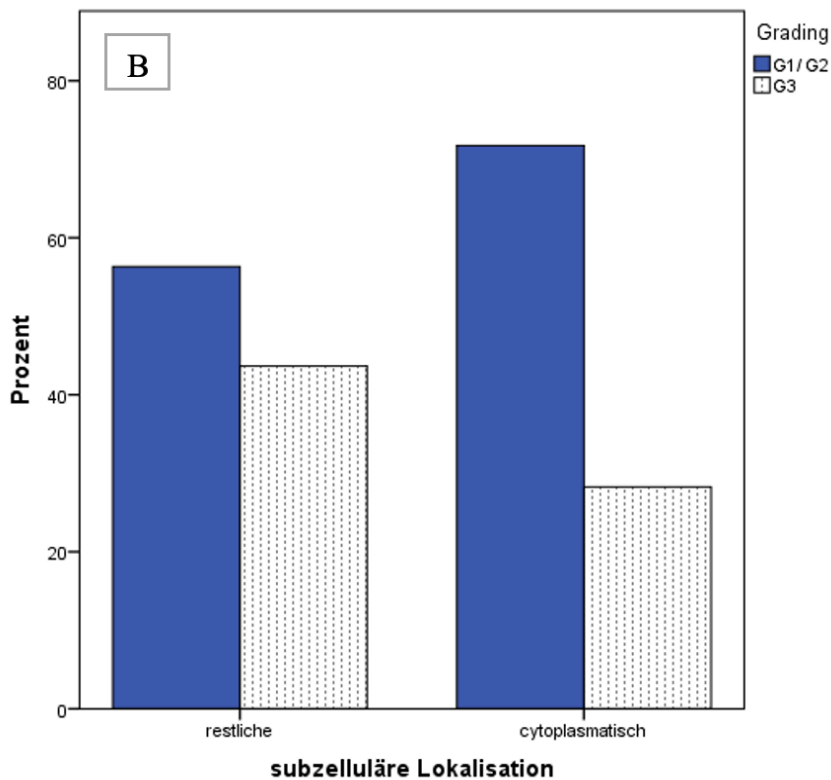
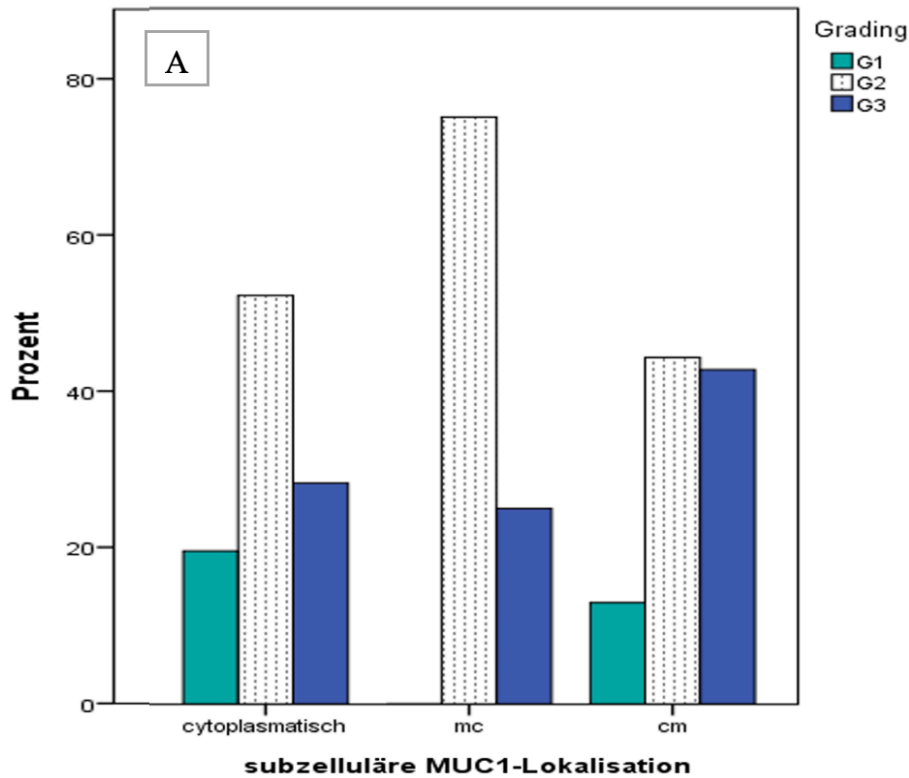


Abbildung 23 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum Grading
 A: Verteilung der Gradingstadien (G1-3) in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisationen von MUC1. Tumoren mit mc-MUC1 Lokalisation zeigten kein G1-Stadium. Innerhalb der Gruppe von cyt.-MUC1 Tumoren zeigte sich häufiger ein G1 Stadium als in Tumoren der anderen subzellulären Gruppen.
 B: Verteilung der Gradingstadien in Abhängigkeit der cytoplasmatischen-MUC1-Expression gegenüber der restlichen Expression. Tumoren mit cyt.-MUC1-Expression waren häufiger in niedrigeren Gradingstadien als Tumoren der restlichen MUC1-Expression.

4.4.6 Korrelation von MUC1 und molekularen Subtypen im Tumorgewebe

Es erfolgte eine Einteilung der im Kollektiv erfassten Tumoren nach molekularen Risikoprofilen. Dafür standen für alle Tumorpräparate Daten zum Hormonrezeptorstatus (ER/PR) und HER2-Status zur Verfügung, auf Grund derer sich vier verschiedene Risikogruppen erstellen ließen. Der Marker Ki67 konnte nur für 120 Tumoren als Parameter zur Risikobewertung erhoben werden. Tumoren mit vorhandenen Ki67-Daten wurden weiter nach den Sankt Gallener Kriterien in die intrinsischen Subtypen Luminal A und B unterteilt. Der gewählte Cut off für Ki67 lag bei 15 % (Tab. 12).

Tabelle 12 Einteilung der Risikoprofile anhand molekularpathologischer Marker

Risikogruppe	Hormon- rezeptor (ER/PR)	HER2- Status	Ki67 (%)	Anzahl (n)	Anzahl (%)
Risikogruppe 1	+	-		173	71,8
Risikogruppe 2	+	+		12	5,0
Risikogruppe 3	-	+		14	5,8
Risikogruppe 4	-	-		42	17,4
Luminal A	+	-	<15	46	
Luminal B	+	-	>15	25	
		+	jedes		

Korrelation zwischen der Gesamtexpression von MUC1 und dem molekularen Subtyp

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der MUC1-Expression und der Risikogruppe 2 ($p = 0,045$) (Abb. 24). Tumoren mit positiver HER2-Expression und positivem Hormonrezeptorstatus (ER/PR) zeigten im Vergleich mit den restlichen Risikoprofilen eine höhere Gesamtexpression von MUC1 ($p = 0,031$, $\Phi = 0,14$). Im Vergleich zeigte die TA-MUC1-Gesamtexpression keinen signifikanten Zusammenhang mit dem molekularen Subtyp (1).

Ergebnisse

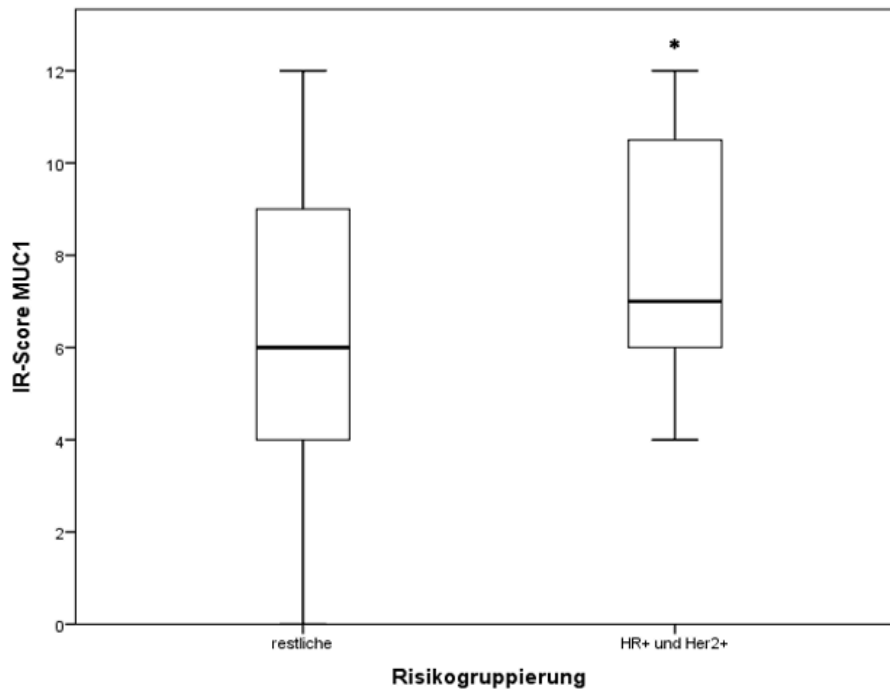


Abbildung 24 MUC1-Gesamtexpression in Korrelation zum molekularen Subtyp
Dargestellt ist die Verteilung der MUC1-Expression in den Gruppen HR+/HER2+ (Risikogruppe 2) vs. „restliche“ Expression. MUC1 zeigte eine signifikant höhere Gesamtexpression in der Risikogruppe 2 mit positivem HER2- und Hormonrezeptorstatus (* $p = 0,031$)

Korrelation zwischen der subzellulären Lokalisation von MUC1 und dem molekularen Subtyp

Zwischen den subzellulären Lokalisationen von MUC1 und den Risikogruppen 1 - 4 konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Allerdings wiesen Tumoren der Risikogruppe 2 (HR+/HER2+) tendenziell häufiger eine membranös-cytoplasmatische MUC1-Lokalisation auf ($p = 0,067$).

Für TA-MUC1 wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen subzellulärer Lokalisation und der Risikogruppe 2 (HR+/HER2+) nachgewiesen. Auch hier zeigte sich in der Risikogruppe 2 (HR+/HER2+) häufiger eine membranös-cytoplasmatische TA-MUC1-Expression als in den anderen Risikogruppen (1).

Korrelation zwischen der Gesamtexpression von MUC1 und dem HER2-Status

Zwischen der Gesamtexpression von MUC1 und dem HER2-Rezeptorstatus zeigte sich kein statistischer Zusammenhang. In HER2-positiven Tumoren zeigte sich eine höhere MUC1-Expression als bei HER2-negativen Tumoren. Der Unterschied war nicht statistisch signifikant ($p = 0,062$) (Abb25).

Ergebnisse

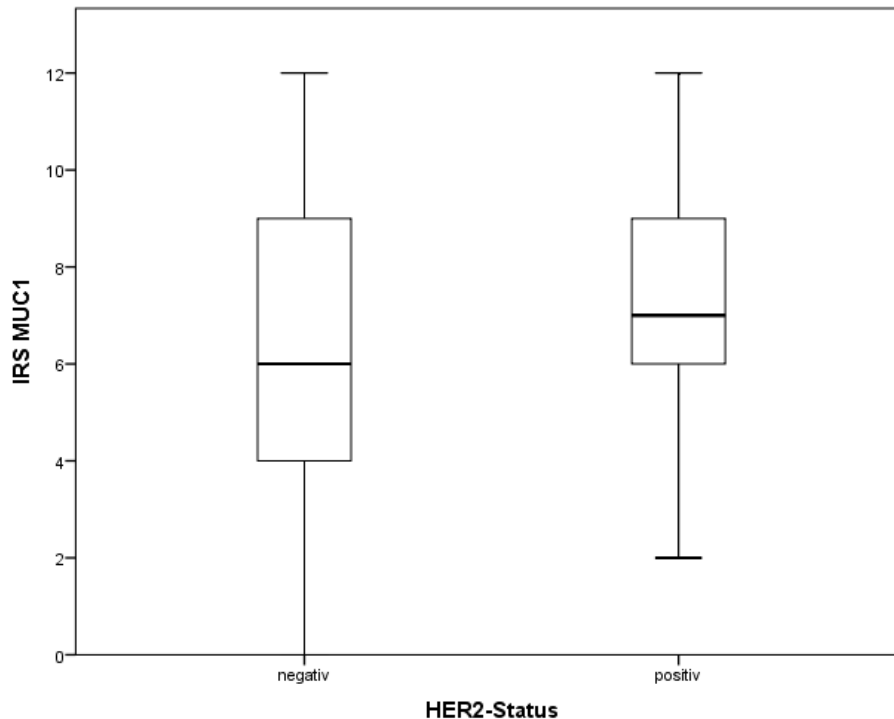


Abbildung 25 MUC1 Gesamtexpression in Korrelation zum HER2-Status

Dargestellt ist die Verteilung der MUC1-Expression in den Gruppen HER2 positiven und negativen Tumoren. In den Korrelationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von MUC1. Die zentrale Linie der Boxplots stellt den Median dar. Dargestellt sind 25 % und die 75 % Perzentile (oberer und unterer Teil des Boxplots), sowie Minimum und Maximum (untere und obere Linie des Boxplots).

Korrelation zwischen der subzellulären Lokalisation von MUC1 und dem HER2-Status im Tumorgewebe

Zwischen der subzellulären Verteilung von MUC1 und dem HER2-Rezeptorstatus konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den restlichen Expressionen zeigte sich in Tumoren mit membranös-cytoplasmatischer-MUC1-Expression häufiger ein positiver HER2-Status ($p = 0,012$, $\Phi 0,163$) (Abb. 26).

Im Vergleich dazu zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der subzellulären Expression von TA-MUC1 und dem HER2-Status. Tumoren mit einer membranös-cytoplasmatischen Expression waren tendenziell häufiger HER2-positiv als Tumoren mit anderem TA-MUC1-Expressionsmuster (1).

Ergebnisse

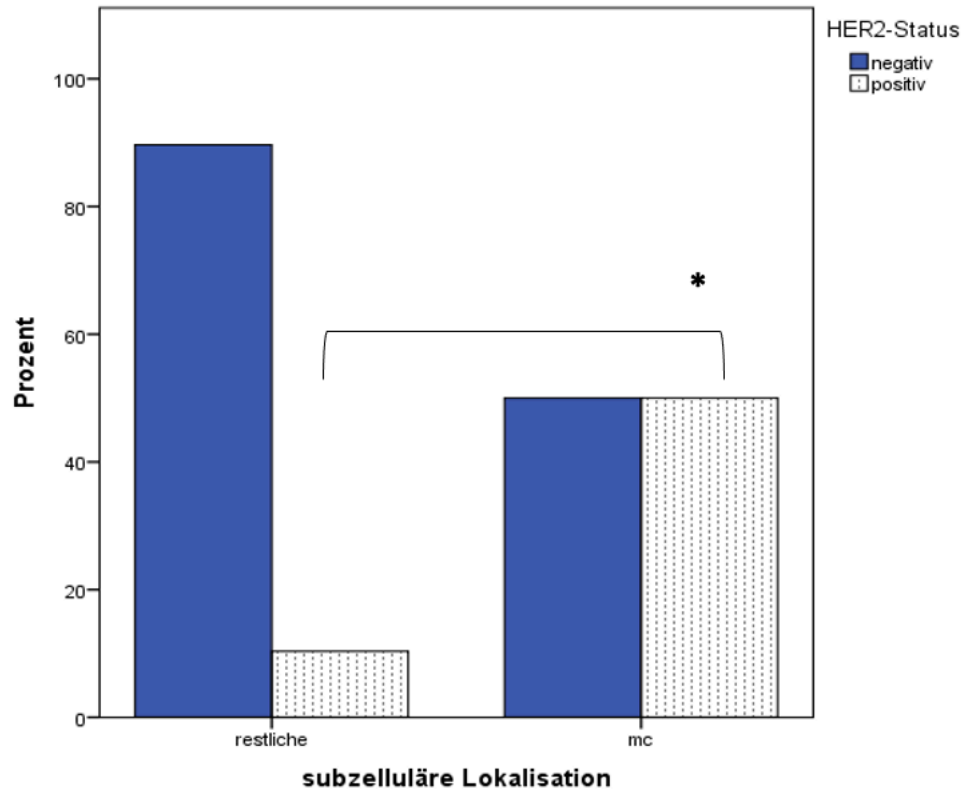


Abbildung 26 Subzelluläre MUC1-Expression in Korrelation zum HER2-Status

Dargestellt ist die Verteilung der membranös-cytoplasmatische MUC1-Lokalisation gegenüber anderen subzellulären Lokalisationen in Abhängigkeit zum HER2-Rezeptorstatus. Innerhalb der Gruppe von mc-MUC1 Tumoren zeigte sich häufiger ein positiver HER2-Rezeptorstatus als in der Gruppe anderer MUC1-Expressionen (* $p < 0,05$). (mc = membranös-cytoplasmatische Expression)

Korrelation zwischen MUC1 und dem molekularen Subtyp „Luminal-A“ im Tumorgewebe

Es zeigte sich weder für die Gesamtexpression noch für die subzelluläre Verteilung von MUC1 ein signifikanter Zusammenhang zu Luminal-A Tumoren (HR+, HER2-, niedriges Ki67). In der Vergleichsarbeit mit GGSK-1/30 waren Tumoren mit cm-TA-MUC1-Expression signifikant häufiger Luminal-A negativ als Tumoren anderer TA-MUC1-Expressionsmuster (1).

4.4.7 Korrelation von MUC1 in Abhängigkeit zur Herdlokalisierung

Es zeigte sich weder für die Gesamtexpression noch für die subzelluläre Verteilung von MUC1 ein signifikanter Zusammenhang zur Herdlokalisierung.

Im Vergleich standen die subzelluläre Lokalisation von TA-MUC1-Expression und die Herdlokalisierung in einem signifikanten Zusammenhang. In Tumoren mit cytoplasmatischer TA-MUC1-Expression zeigten sich ausschließlich unifokale Herdlokalisationen und kein multifokales Vorkommen.

4.5 MUC1-Expression in Bezug auf das Überleben und als prognostischer Faktor

Für das MUC1-Patientenkollektiv wurden Überlebenszeitanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (OVS), das metastasenfremie Überleben (MFS) und das krankheitsfreie Überleben (DFS) erstellt. Zuerst wurde die Gesamtexpression von MUC1 betrachtet. Hierfür erfolgte eine Einteilung des Gesamtkollektivs anhand des Medians in zwei Gruppen ($<$ Median/ \geq Median). Anschließend wurden Überlebenszeitanalysen hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von MUC1 durchgeführt. Hierfür erfolgte zunächst eine Gegenüberstellung der Gruppen verschiedener subzellulärer Lokalisation und anschließend eine Betrachtung der Gesamtexpression ($<$ Median/ \geq Median) einzelner subzellulärer Gruppen. In den Überlebenszeitanalysen konnten keine medianen Überlebenszeiten ermittelt werden, da bis zum maximalen Beobachtungszeitraum in weniger als 50 % der Fälle das jeweilige Ereignis (Tod, Metastase, Krankheit) eintrat. Anhand multivariater Cox-Regressionsanalysen wurden die Gesamtexpression und subzelluläre Expression von MUC1 in Bezug auf ihren unabhängigen prognostischen Einfluss auf das OVS, MFS und DFS untersucht.

4.5.1 Gesamtexpression von MUC1 in Bezug auf das Gesamtüberleben

Bei 86 Patientinnen lag die MUC1-Expression unterhalb des Medians, hiervon verstarben 14 Patientinnen (16,28 %) innerhalb des Beobachtungszeitraums. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) lag bei 89,53 %, die 10-Jahres-Überlebensrate (10-JÜR) bei 83,7 %. Die Gruppe \geq Median bestand aus 143 Patientinnen. Es traten insgesamt 21 Todesfälle (14,69 %) ein. Die 5-JÜR betrug 93,70 %, die 10-JÜR konnte nicht bestimmt werden (Tabelle 13).

In den Kaplan-Meier-Kurven wies die Gruppe $<$ Median zunächst ein schlechteres Überleben auf, zeigte sich im späteren Verlauf jedoch überlegen. Zwischen beiden Gruppen konnte keine signifikante Überlegenheit für das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Log-Rank, $p = 0,854$) (Abb. 26). Für die Gesamtexpression von TA-MUC1 zeigte sich in den Überlebenszeitanalysen ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das OVS (1). Sowohl für MUC1 als auch für TA-MUC1 war eine Expression oberhalb des Medians mit einem tendenziell besserem Gesamtüberleben assoziiert.

Ergebnisse

Tabelle 13 Vergleich der Überlebensraten für das OVS in Abhängigkeit der MUC1-Gesamtexpression

Variable	Fälle/ Todesfälle	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
<Median	86/ 14	89,53 %	83,7 %	n.s.
≥Median	143/ 21	93,70 %		

(ÜL = Überleben, n.s. = nicht signifikant)

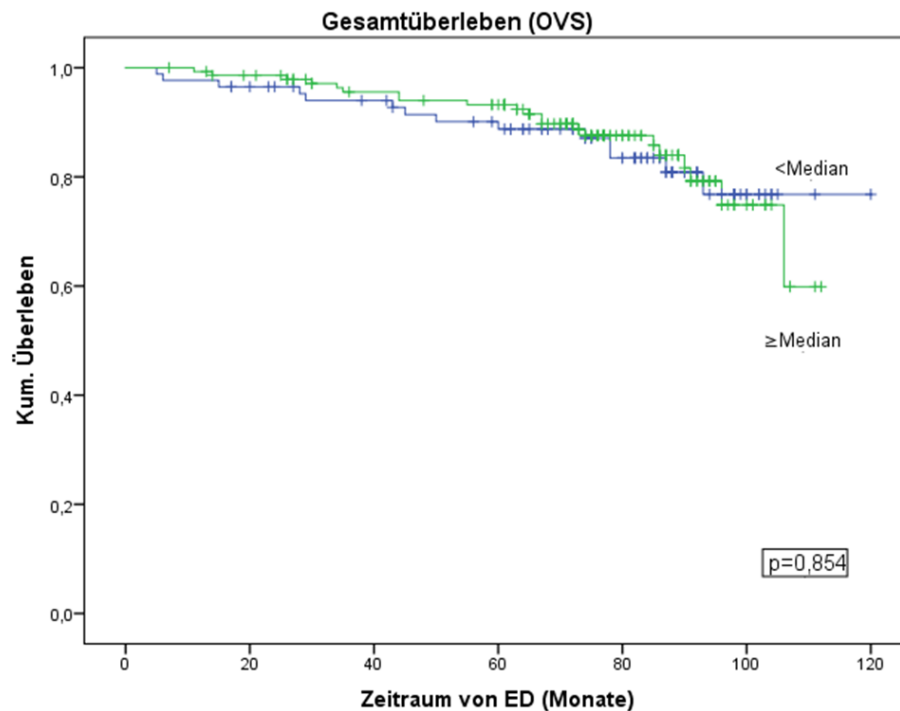


Abbildung 27 Überlebenszeitkurven der MUC1-Gesamtexpression in Bezug zum Gesamtüberleben. Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. Die Unterteilung erfolgte in Mediangruppen (\geq Median und $<$ Median). In keine der beiden Gruppen zeigte sich ein Überlebensvorteil.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich bezogen auf das Gesamtüberleben kein signifikanter Einfluss für die MUC1-Gesamtexpression. Als signifikante Prognosefaktoren erwiesen sich das Alter, T-Stadium, N-Status, DCIS/LIN, HER2-Expression, Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und Krankheitsereignis. Ein Erkrankungsalter über dem 55. Lebensjahr war mit einem 5,5-fach erhöhtem Sterberisiko assoziiert. Auch das Vorliegen von Risikoläsionen wie DCIS oder LIN zeigten ein 5,1-fach erhöhtes Risiko. Eine positive Progesteronrezeptor-Expression erhöhte das Risiko zu versterben um das 3,6-fache (Tabelle 14). In der Analyse von Herrn Fries konnte für die TA-MUC1-Expression ebenfalls kein signifikanter prognostischer Einfluss auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (1).

Ergebnisse

Tabelle 14 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das OVS beim Mammakarzinom

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
Alter (≤ 55 vs. >55 Jahre)	,001	5,533	1,954	15,665
DCIS/LIN (nein vs. ja)	,003	5,153	1,739	15,266
T (T1 vs. T2/3)	,026	2,966	1,139	7,726
N (N0 vs. N1-3)	,032	2,419	1,079	5,422
ER (neg. vs. pos)	,003	,138	,037	,515
PR (neg. vs. pos)	,038	3,638	1,074	12,323
HER2 (neg. vs. pos.)	,025	,091	,011	,744
Disease Event (nein vs. ja)	,000	7,787	3,533	17,165
MUC1 (<Median vs. \geq Median)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			

(OVS = Overall survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

4.5.2 Subzelluläre Expression von MUC1 in Bezug auf das Gesamtüberleben

Zur Betrachtung des Einflusses der subzellulären MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben wurden die Überlebenszeitkurven der verschiedenen subzellulären Lokalisationen von MUC1 mit den jeweiligen Vergleichsgruppen (cyt. vs. restliche, cm vs. restliche, mc vs. restliche, doppelt negative vs. restliche) gegenübergestellt.

In der Gruppe mit cyt.-MUC1-Expression (n=90) traten zehn Todesfälle ein. Die 5-JÜR lag bei 94,44 %, die 10-JÜR betrug 88,89 %. Die Vergleichsgruppe bestand aus 139 Patientinnen. Hier traten 25 Todesfälle ein. Die 5-JÜR betrug 90,6 % (Tabelle 15). In den Überlebenszeitanalysen zeigte die Gruppe mit cytoplasmatischer-MUC1 Expression eine gleichmäßige Überlegenheit im Beobachtungszeitraum gegenüber der Vergleichsgruppe. Der Unterschied erwies sich als statistisch nicht signifikant (Log-Rank, $p = 0,085$) (Abb. 28, A).

In der Gruppe mit cytoplasmatisch-membranöser MUC1-Expression (n=128) traten 24 Ereignisse (18,8 %) ein. Die 5-JÜR lag bei 90,63 %. In der Vergleichsgruppe (n=101) traten elf Ereignisse (10 %) ein (Tabelle 15). Während des Beobachtungszeitraumes zeigte die

Ergebnisse

Gruppe mit cytoplasmatisch-membranöser MUC1-Expression ein gleichmäßig schlechteres Gesamtüberleben als die Vergleichsgruppe (Log-Rank $p = 0,058$) (Abb. 28, B).

Bei Patientinnen mit negativer-MUC1-Expression ($n=7$) trat im Verlauf ein Ereignis (14,3 %) ein. Die 5-JÜR betrug 85,71 %. In der Vergleichsgruppe ($n=222$) traten 34 Ereignisse (15,3 %) ein. (Tabelle 15) Es zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil für eine der beiden Gruppen (Log-Rank, $p = 0,989$) (Abb. 28, C).

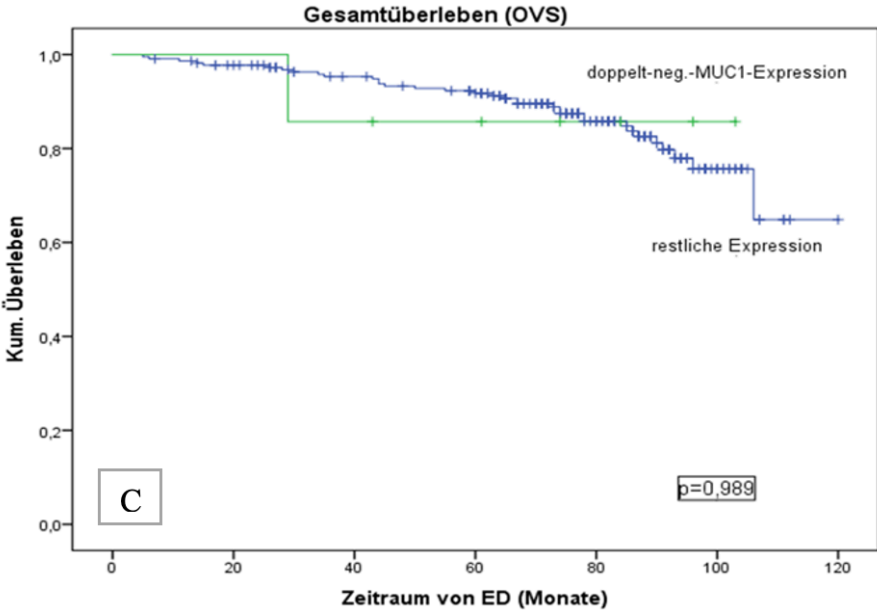
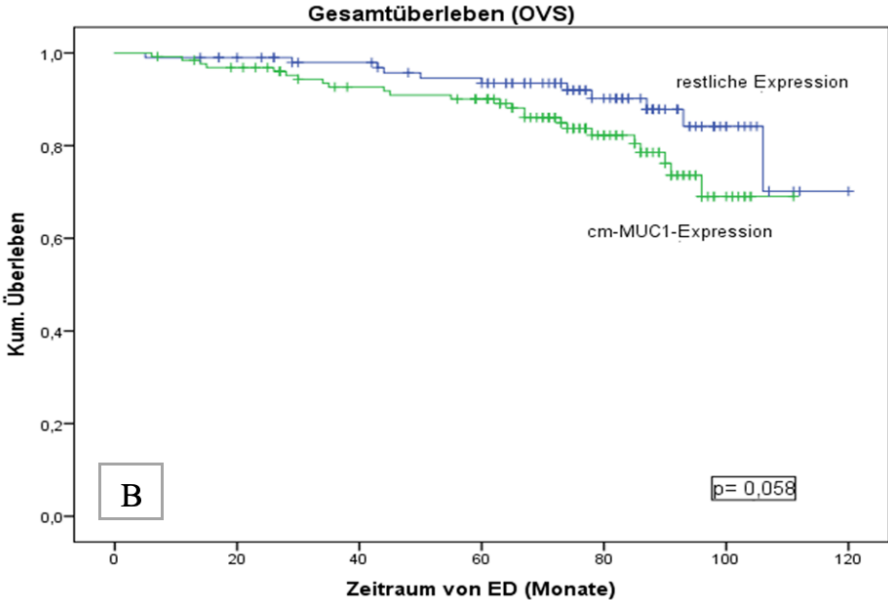
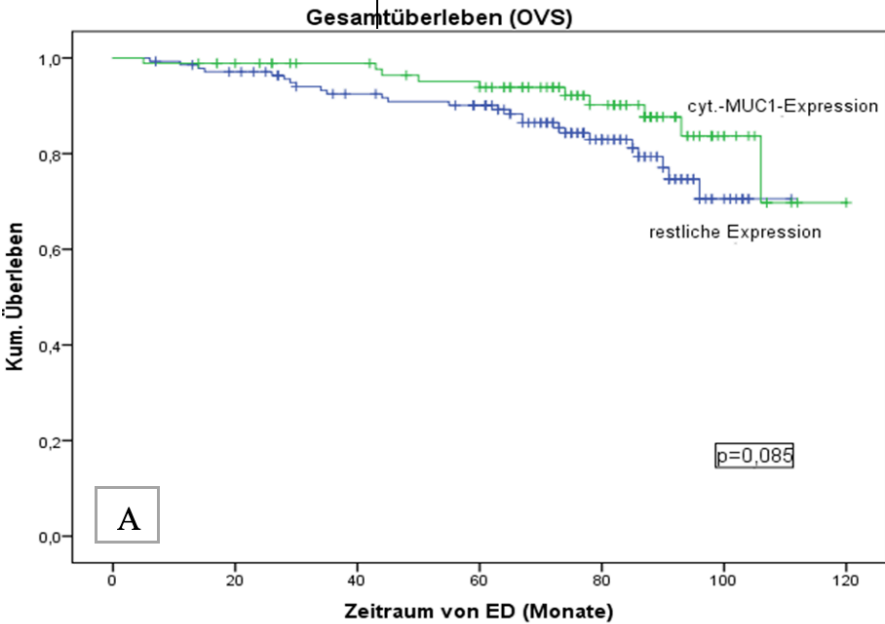
Die Gruppe von Patientinnen mit einer membranös-cytoplasmatischen MUC1-Expression ($n=4$) wies während des Beobachtungszeitraums kein Ereignis auf. Die 5-JÜR lag bei 100 %. In der Vergleichsgruppe ($n=225$) traten 35 Ereignisse (15 %) ein. Die 5-JÜR lag bei 92 %. (Tabelle 15) Patientinnen mit einer membranös-cytoplasmatischen MUC1-Expression zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum ein gleichmäßig besseres Gesamtüberleben als die Vergleichsgruppe. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Log-Rank, $p = 0,449$) (Abb.28, D). Im Vergleich zeigte sich für die subzelluläre TA-MUC1-Expression ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben (1).

Tabelle 15 Vergleich der Überlebensraten für das OVS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Expression

	Fälle/ Todesfälle	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
cyt.-MUC1-Expression	90/ 10	94,44 %	88,89 %	n.s.
mc-MUC1-Expression	4/ 0	100 %		
cm-MUC1-Expression	128/24	90,63 %		
doppelt-neg.-MUC1-Expression	7/1	85,71 %		

(cyt. = cytoplasmatisch, mc = membranös-cytoplasmatisch, cm = cytoplasmatisch-membranös, ÜL = Überlebensrate, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse



Ergebnisse

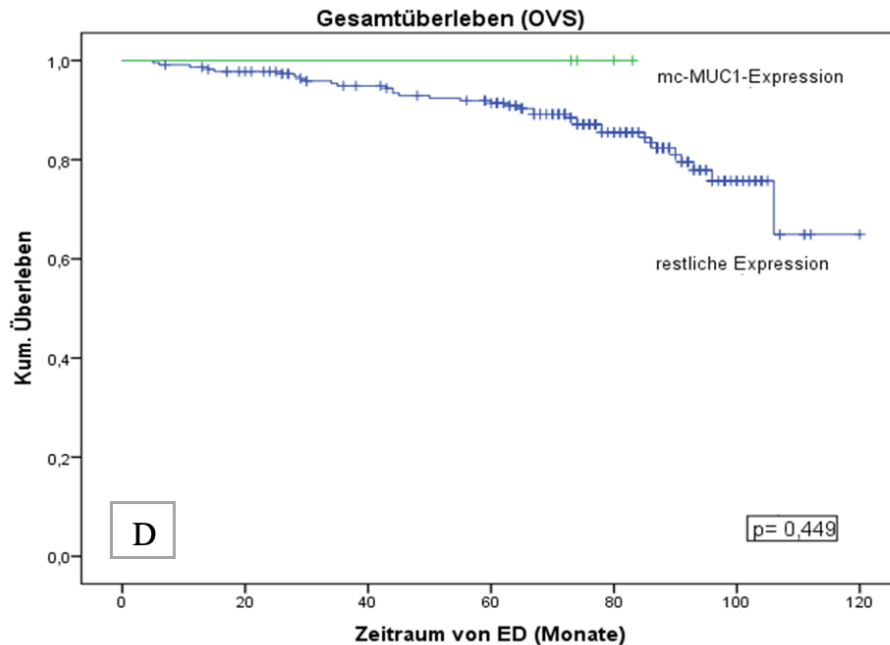


Abbildung 28 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das Gesamtüberleben
Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. A: Patientinnen mit cyt.-MUC1-Expression zeigten ein gleichmäßig besseres OVS als die Vergleichsgruppe. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant, B: Patientinnen mit cm-MUC1-Expression zeigten ein gleichmäßig schlechteres OVS als die Vergleichsgruppe. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant, C: negative-MUC1-Expression vs. restliche Expression ohne signifikanten Unterschied im OVS, D: Patientinnen mit mc-MUC1-Expression zeigten ein gleichmäßig besseres OVS als die Vergleichsgruppe. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant. (cyt.-MUC1-Expression = cytoplasmatische MUC1-Expression, cm-MUC1-Expression = cytoplasmatisch-membranöse-MUC1-Expression, mc-MUC1-Expression = membranös-cytoplasmatische MUC1-Expression, ED = Erstdiagnose)

Anschließend erfolgte eine Betrachtung des Einflusses der Gesamtexpression innerhalb des jeweiligen subzellulären Expressionsmusters. In der Gruppe von Patientinnen mit cytoplasmatischer-Expression wurde MUC1 in 34 Fällen unterhalb und in 56 Fällen oberhalb des Medians exprimiert. In der Gruppe < Median traten vier Ereignisse ein (11,76 %). Die 5-JÜR lag bei 94,12 %, die 10-JÜR bei 88,24 %. In der Gruppe ≥ Median traten sechs Ereignisse auf (10,71 %). Die 5-JÜR lag hier bei 94,64 % (Tabelle 16). Während des gesamten Beobachtungszeitraums zeigte keine der beiden Gruppen einen Vorteil bezogen auf das Gesamtüberleben (Log-Rank $p = 0,778$) (Abb. 29, A).

In der Gruppe von Patientinnen mit gemischter cytoplasmatisch-membranöser MUC1-Expression wiesen 59 Fälle eine Expression < Median auf. Es traten 14 Ereignisse (23,7 %) ein. Die 5-JÜR lag bei 83 %. In der Gruppe ≥ Median ($n=69$) kam es zu zehn Todesfällen (14,49 %). Die 5-JÜR lag bei 97,1 % (Tabelle 16). Die Gruppe mit der Expression ≥ Median zeigte über weite Teile des Beobachtungszeitraums eine gleichmäßige Überlegenheit. Für

Ergebnisse

keine der beiden Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Log-Rank, $p = 0,211$) (Abb. 29, B).

In der Gruppe von Patientinnen mit membranös-cytoplasmatischem MUC1-Expressionsmuster trat in der Gruppe \geq Median und $<$ Median über den gesamten Beobachtungszeitraum kein Ereignis ein (Tabelle 16).

Im Vergleich zeigte sich für die subzelluläre TA-MUC1-Expression ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil in der Gruppe der membranös-cytoplasmatischen TA-MUC1-Expression. Eine Expression oberhalb des Medians war hier mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben assoziiert als eine Expression unterhalb des Medians (1).

Tabelle 16 Vergleich der Überlebensraten für das OVS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation unterteilt nach Median

		Fälle/ Todesfälle	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
cyt.-MUC1	$<$ Median	34/ 4	94,12 %	88,24 %	n.s.
	\geq Median	56/ 6	94,64 %		
cm-MUC1	$<$ Median	59/14	83,00 %		n.s.
	\geq Median	69/10	97,10 %		
mc-MUC1	$<$ Median	2/ 0	100 %		
	\geq Median	2/ 0	100 %		

(cyt. = cytoplasmatisch, mc = membranös-cytoplasmatisch, cm = cytoplasmatisch-membranös, ÜL = Überlebensrate, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse

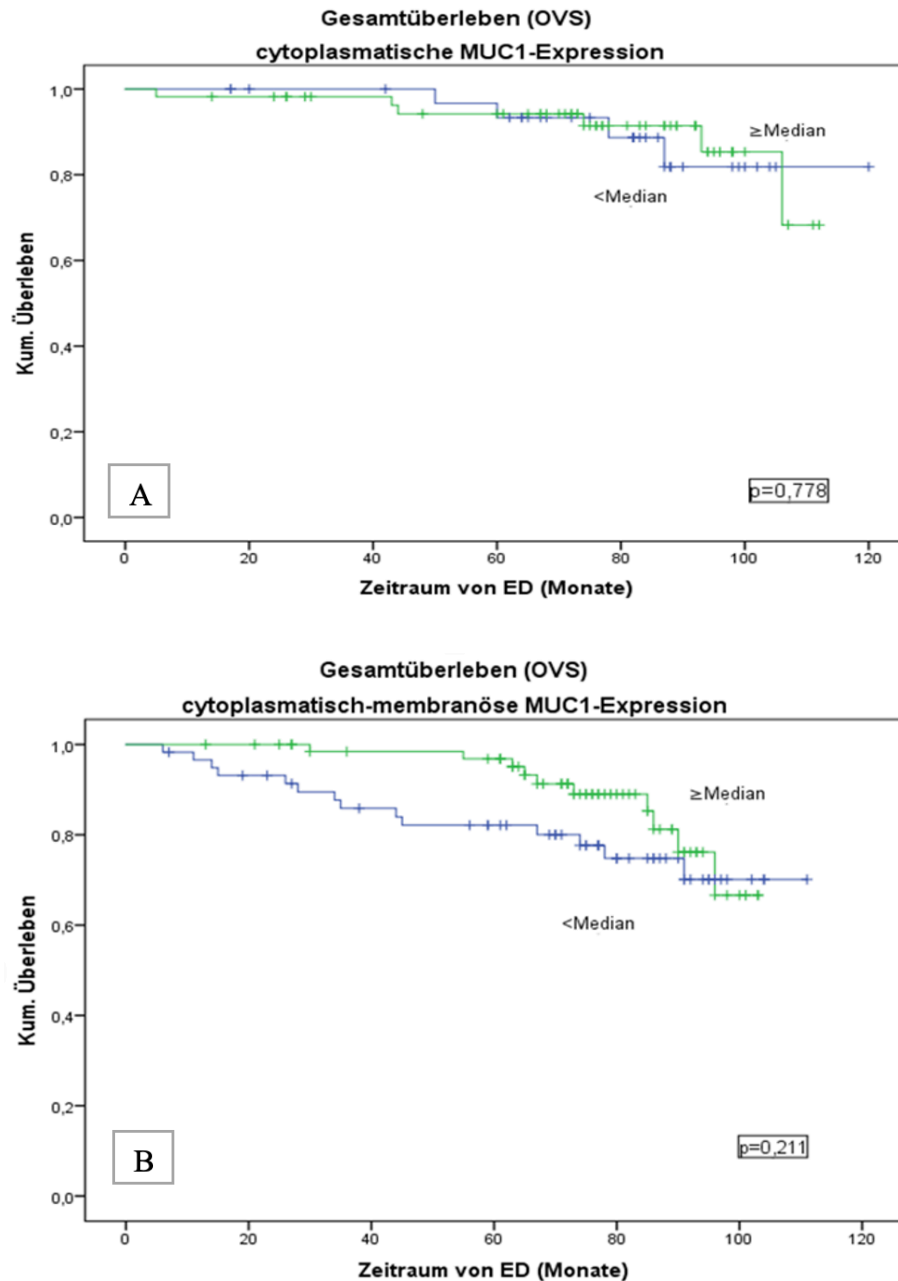


Abbildung 29 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression unterteilt nach Median auf das Gesamtüberleben. Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. A: cyt-MUC1-Expression nach Mediangruppen unterteilt ohne signifikanten Unterschied im OVS, B: Patientinnen mit einer cm-MUC1-Expression oberhalb des Medians zeigten ein überwiegend besseres OVS als unterhalb des Medians. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant. (OVS: Overall survival, ED: Erstdiagnose)

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich bezogen auf das Gesamtüberleben keine der subzellulären Expressionsmuster von MUC1 als eigenständiger prognostischer Marker. Eine Tendenz konnte in der Gruppe cytoplasmatisch-membranöser MUC1-Expression beobachtet werden, die im Vergleich zur restlichen subzellulären Lokalisation ein zweifach erhöhtes Sterberisiko aufwies ($p = 0,097$) (Tabelle 19). Die Parameter Alter,

Ergebnisse

Risikoläsion, Tumorstadium, Nodalstatus, Hormonrezeptorstatus, HER2-Status, sowie Disease-Event waren als prognostischer Marker für das Gesamtüberleben signifikant (Tabelle 17-20).

Tabelle 17 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (cytoplasmatische vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
Alter (<55 vs. ≥55 Jahre)	,001	5,533	1,954	15,665
DCIS/LIN (nein vs. ja)	,003	5,153	1,739	15,266
T (T1 vs. T2/3)	,026	2,966	1,139	7,726
N (N0 vs. N1-3)	,032	2,419	1,079	5,422
ER (neg. vs. pos)	,003	,138	,037	,515
PR (neg. vs. pos)	,038	3,638	1,074	12,323
HER2 (neg. vs. pos)	,025	,091	,011	,744
Disease Event (nein vs. ja)	,000	7,787	3,533	17,165
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. cytoplasmatisch)	n.s.			

(OVS = Overall survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

Tabelle 18 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (mc vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
Alter (<55 vs. ≥55 Jahre)	,001	5,903	2,075	16,792
DCIS/LIN (nein vs. ja)	,002	5,573	1,880	16,517
T (T1 vs. T2/3)	,017	3,228	1,234	8,442
N (N0 vs. N1-3)	n.s.	2,171	,968	4,871

Ergebnisse

ER (neg. vs. pos)	,002	,133	,036	,486
PR (neg. vs. pos)	,023	4,112	1,218	13,879
HER2 (neg. vs. pos)	,030	,099	,012	,795
Disease Event (nein vs. ja)	,000	9,272	4,122	20,856
MUC1 (restliche vs. mc)	n.s.	,000	,000	.
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			

(OVS = Overall survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, mc = membranös- cytoplasmatisch, n.s. = nicht signifikant)

Tabelle 19 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (cm vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
Alter (<55 vs. ≥55 Jahre)	,001	6,103	2,144	17,369
DCIS/LIN (nein vs. ja)	,002	6,249	2,008	19,442
T (T1 vs. T2/3)	n.s.	2,615	,985	6,945
N (N0 vs. N1-3)	,043	2,300	1,025	5,161
ER (neg. vs. pos)	,009	,171	,045	,644
PR (neg. vs. pos)	n.s.	2,936	,850	10,137
HER2 (neg. vs. pos)	,026	,094	,012	,751
Disease Event (nein vs. ja)	,000	8,439	3,744	19,020
MUC1 (restliche vs. cm)	n.s.	1,994	,883	4,507
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			

(OVS = Overall survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, mc = cytoplasmatisch-membranös, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse

Tabelle 20 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das OVS beim Mammakarzinom (negative vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
Alter (<55 vs. ≥55 Jahre)	,001	5,533	1,954	15,665
DCIS/LIN (nein vs. ja)	,003	5,153	1,739	15,266
T (T1 vs. T2/3)	,026	2,966	1,139	7,726
N (N0 vs. N1-3)	,032	2,419	1,079	5,422
ER (neg. vs. pos)	,003	,138	,037	,515
PR (neg. vs. pos)	,038	3,638	1,074	12,323
HER2 (neg. vs. pos)	,025	,091	,011	,744
Disease Event (nein vs. ja)	,000	7,787	3,533	17,165
Histologie (NST vs. nicht NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. doppelt negative)	n.s.			

(OVS = Overall survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

4.5.3 Gesamtexpression von MUC1 in Bezug auf das metastasenfreie Überleben

In der Patientengruppe mit einer MUC1-Expression unterhalb des Medians (n=86) trat im Beobachtungszeitraum bei zehn Patientinnen (11,6 %) eine Metastasierung auf. Das 5-Jahres-Metastasenfreie-Überleben (MFS) betrug 90,7 %, das 10-Jahres-MFS lag bei 88,4 %. In der Gruppe ≥ Median (n=143) traten 13 Ereignisse ein (9,1 %). Das 5-Jahres-MFS lag bei 93,7 %, das 10-Jahres-MFS konnte nicht bestimmt werden (Tabelle 21). In den Überlebenszeitkurven zeigte sich eine weitgehende Überlegenheit in der Gruppe ≥ Median. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezogen auf das metastasenfreie Überleben nachgewiesen werden (Log-Rank, p = 0,570) (Abb. 30). Für TA-MUC1-Expression ließ sich ebenfalls kein signifikanter Einfluss in Bezug auf das MFS nachweisen (1).

Ergebnisse

Tabelle 21 Vergleich der Überlebensraten für das MFS in Abhängigkeit der MUC1-Gesamtexpression

Variable	Fälle/ Todesfälle	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
<Median	86/ 10	90,70 %	88,37 %	n.s.
≥Median	143/ 13	93,70 %		

(ÜL = Überleben, n.s. = nicht signifikant)

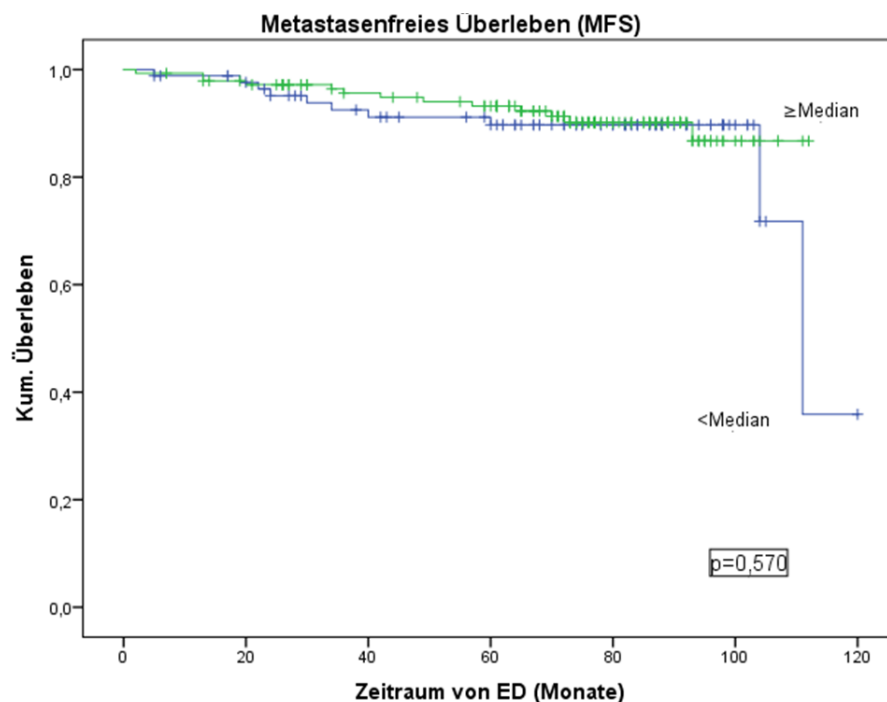


Abbildung 30 Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das metastasenfreie Überleben

Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. Die Unterteilung erfolgte in Mediengruppen (\geq Median und $<$ Median). In keine der beiden Gruppen zeigte sich ein Überlebensvorteil im MFS.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich für die MUC1-Gesamtexpression im Tumor kein signifikanter Einfluss auf das metastasenfreie Überleben. Ein positiver Lymphknotenbefall bei Erstdiagnose war mit einem 4-fach erhöhtem Metastasierungsrisiko behaftet. Ein höheres Tumorstadium ging ebenfalls mit einem um das 3-fach erhöhte Risiko einer Metastasierung einher (Tabelle 22). Auch für die TA-MUC1-Expression ließ sich keine Bedeutung als prognostischer Marker in Bezug auf das MFS nachweisen (1).

Ergebnisse

Tabelle 22 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das MFS beim Mammakarzinom

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
T (T1 vs. T2/T3)	n.s.	2,665	,853	8,328
N (N0 vs. N1- N3)	,004	4,278	1,609	11,376
Alter (≤ 55 vs. >55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. Vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. Vs. pos.)	n.s.			
HER2 (neg. Vs. pos.)	n.s.			
MUC1 (<Median vs. \geq Median)	n.s.			

(MFS = Metastasis free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

4.5.4 Subzelluläre Expression von MUC1 in Bezug auf das metastasenfreie Überleben

In der Patientengruppe mit cytoplasmatischer-MUC1-Expression (n=90) trat in neun Fällen (10 %) innerhalb des Beobachtungszeitraumes eine Metastasierung auf. Das 5-Jahres MFS lag bei 93,33 %, das 10-Jahres MFS bei 90 %. Die Vergleichsgruppe mit den restlichen Expressionsmustern (n=139) verzeichnete insgesamt 14 Ereignisse (10 %). Das 5-Jahres MFS lag bei 92,1 %, das 10-Jahres-MFS konnte nicht bestimmt werden (Tabelle 23). Während zu Beginn die Gruppe mit cytoplasmatischer-MUC1-Expression eine geringe Überlegenheit in Bezug auf das MFS aufwies, zeigte sich zum Ende des Beobachtungszeitraums eine deutliche Verschlechterung des MFS gegenüber der Vergleichsgruppe. Es konnte kein signifikanter Überlebensvorteil für das MFS nachgewiesen werden (Log-Rank, $p = 0,716$) (Abb. 31, A).

In der Gruppe mit membranös-cytoplasmatischer MUC1-Expression trat im Beobachtungszeitraum ein Ereignis (25 %) auf. Das 5-Jahres MFS lag bei 100 %. In der Vergleichsgruppe (n=225) kam es zu 22 Ereignissen (9,8 %). Das 5-Jahres MFS lag bei 92,4 %, das 10-Jahres MFS lag bei 90,2 % (Tabelle 23). Während in den ersten 5 Jahren die Gruppe mit membranös-cytoplasmatischer MUC1-Expression ein deutlich besseres metastasenfreies Überleben aufwies, zeichnete sich nach 5 Jahren ein schlechteres MFS im Vergleich zu anderen

Ergebnisse

MUC1-Expressionen ab. Für keine der beiden Gruppen konnte ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil gezeigt werden (Log-Rank, $p = 0,365$) (Abb. 31, B).

Die Gruppe der cytoplasmatisch-membranösen MUC1-Expression ($n=128$) wies in 13 Fällen (10,2 %) eine Metastasierung auf. Das 5-Jahres MFS lag bei 91,4 %. In der Vergleichsgruppe ($n=101$) kam es zu 10 Ereignissen (10 %). Das 5-Jahres MFS lag bei 94,1 % die 10-Jahres MFS lag bei 90,1 % (Tabelle 23). Die Gruppe der cytoplasmatisch-membranösen MUC1-Expression zeigte überwiegend ein schlechteres Überleben. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes wies die Gruppe der cytoplasmatisch-membranösen MUC1-Expression ein besseres MFS auf. Beide Gruppen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf das gesamte MFS (Log-Rank, $p = 0,697$) (Abb. 31, C).

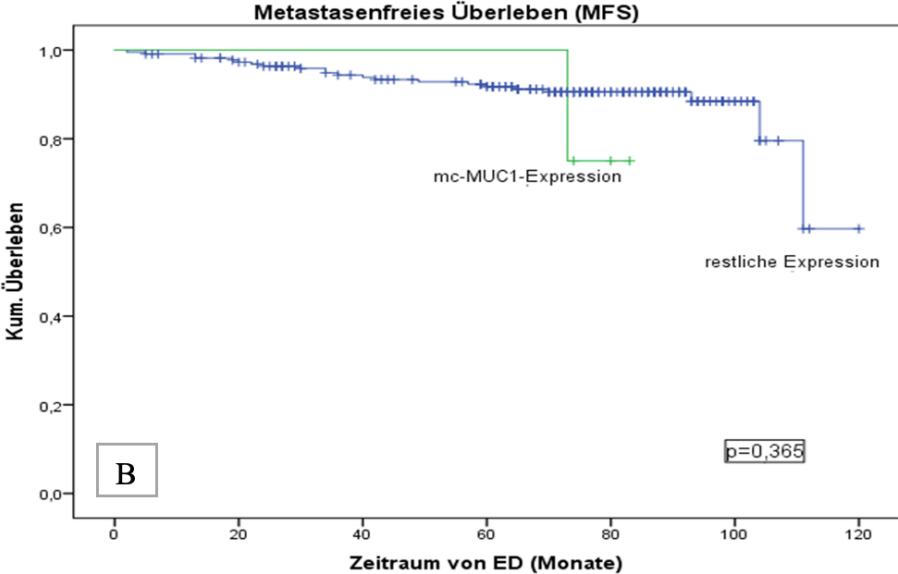
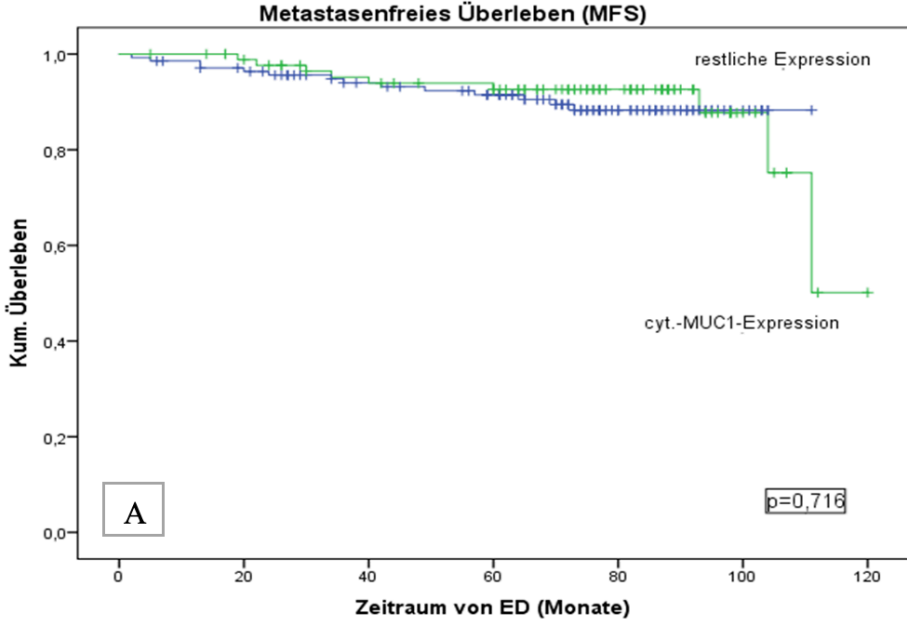
In der Gruppe doppelt-negativer MUC1-Expression ($n=7$) kam es während des Beobachtungszeitraums zu keiner Metastasierung. Die Vergleichsgruppe ($n=222$) mit 24 Ereignissen (10,8 %) hatte ein 5-Jahres MFS von 92,3 % und ein 10-Jahres MFS von 89,6 % (Tabelle 23). Die Vergleichsgruppe zeigte während des gesamten Verlaufs ein schlechteres MFS, das jedoch nicht statistisch signifikant war (Log-Rank, $p = 0,411$) (Abb. 31, D). Auch für die TA-MUC1-Expression konnte kein signifikanter Zusammenhang in der Unterteilung nach subzellulärer Lokalisation bezogen auf das MFS nachgewiesen werden.

Tabelle 23 Vergleich der Überlebensraten für das MFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation

	Fälle/ Metastasen	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
cyt.-MUC1-Expression	90/ 9	93,33 %	90,0 %	n.s.
mc-MUC1-Expression	4/ 1	100 %		n.s.
cm-MUC1-Expression	128/13	91,4 %		n.s.
doppelt-neg.-MUC1-Expression	7/0	100 %		n.s.

(cyt. = cytoplasmatisch, mc = membranös-cytoplasmatisch, cm = cytoplasmatisch-membranös, ÜL = Überlebensrate, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse



Ergebnisse

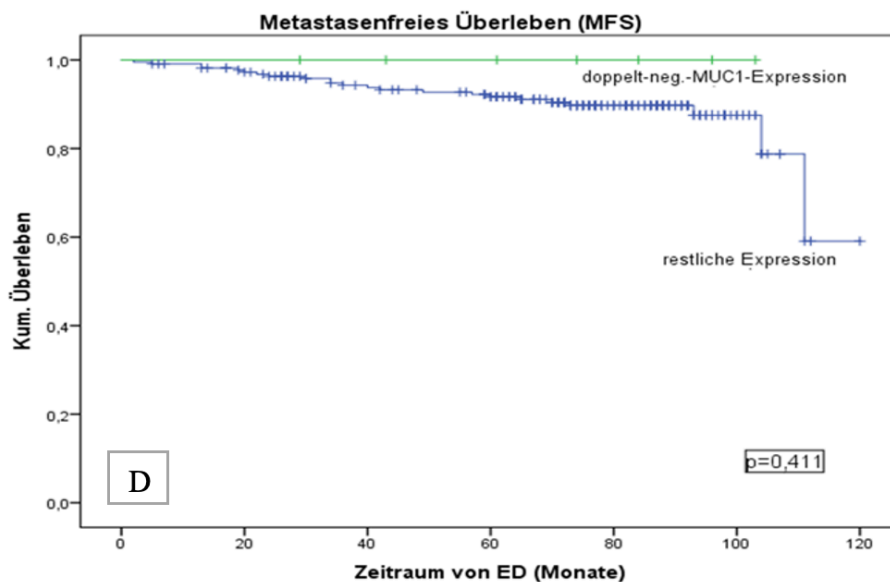
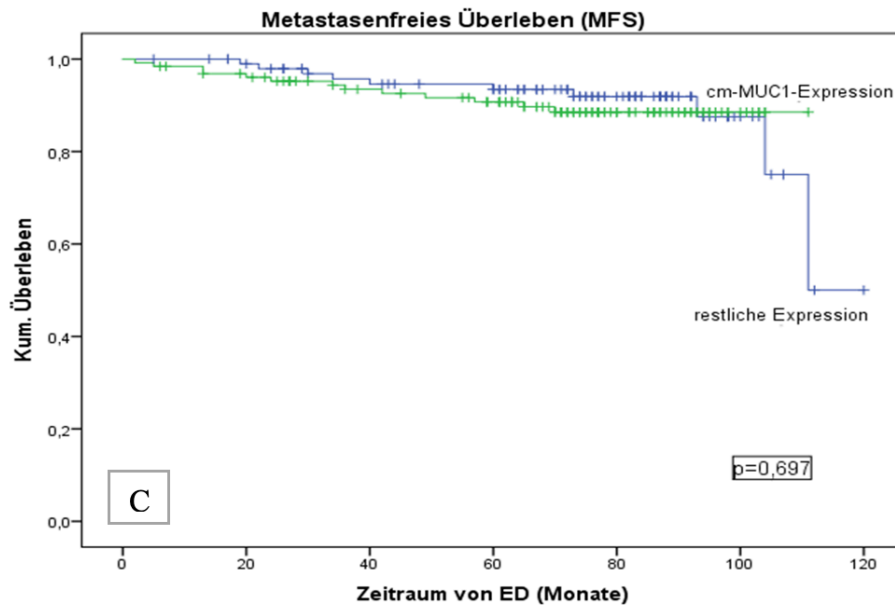


Abbildung 31 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das metastasenfreie Überleben
Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. A: cyt.-MUC1-Expression vs. restliche Expression ohne signifikanten Unterschied im MFS, B: mc-MUC1-Expression vs. restliche Expression ohne signifikanten Unterschied im MFS, C: cm-MUC1-Expression vs. restliche Expression ohne signifikanten Unterschied im MFS, D: Patientinnen mit doppelt negativer MUC1-Expression zeigten ein gleichmäßig besseres MFS als die Vergleichsgruppe. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

In den anschließenden Überlebenszeitanalysen wurde der Einfluss der MUC1-Expression unterteilt nach Median. In der Patientengruppe mit cytoplasmatischer-MUC1-Expression wiesen 34 Patientinnen eine Expression unterhalb und 56 Patientinnen oberhalb des Medians auf. In der Gruppe < Median traten drei Ereignisse ein (8,82 %). Das 5-Jahres MFS lag bei

Ergebnisse

94,12 %, das 10-Jahres MFS lag bei 91,18 %. In der Gruppe \geq Median traten sechs Ereignisse auf (10,71 %). Das 5-Jahres MFS lag bei 92,86 %, das 10-Jahres MFS konnte nicht bestimmt werden (Tabelle 24). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven in Bezug zur MUC1-Expression $<$ oder \geq des Medians (Log-Rank, $p = 0,804$) (Abb. 32, A).

In der Patientengruppe mit membranös-cytoplasmatischer-MUC1-Expression zeigten zwei Patientinnen eine Expression \geq des Medians und zwei $<$ des Medians. In der Gruppe \geq Median trat eine Metastasierung auf. Für beide Gruppen betrug das 5-Jahres MFS 100 % (Tabelle 24). Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes zeigte sich die Gruppe mit einer MUC1-Expression $<$ Median gegenüber der Gruppe \geq Median MUC1-Expression überlegen. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Log-Rank, $p = 0,317$) (Abb. 32, B).

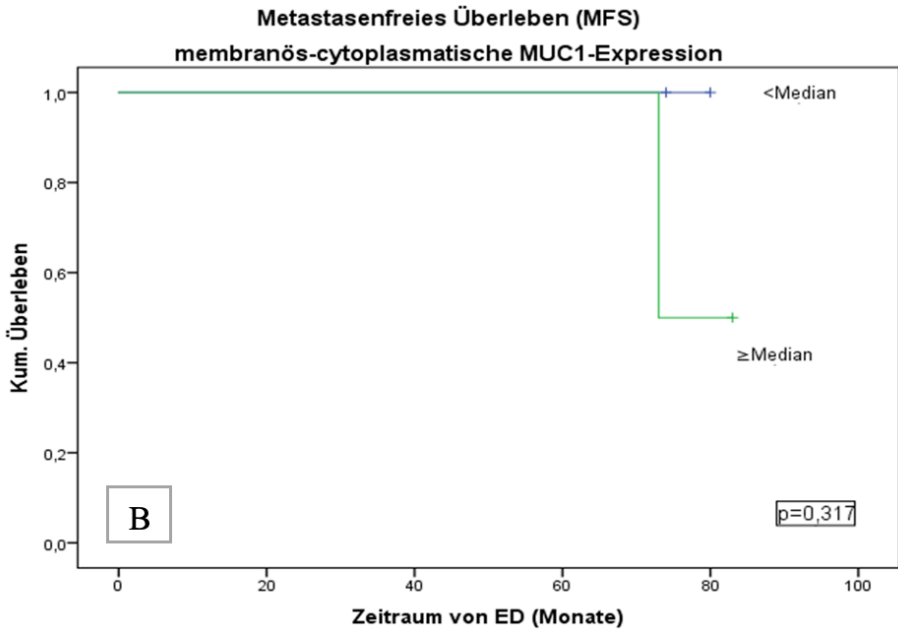
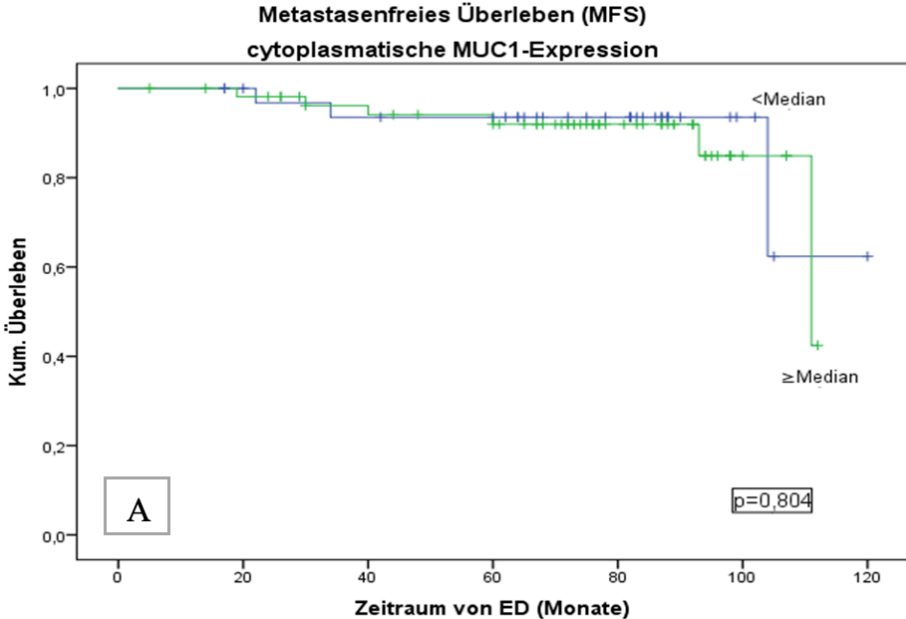
In der Gruppe mit gemischt cytoplasmatisch-membranöser-MUC1-Expression waren 59 Patientinnen mit einer Expression unterhalb des Medians und 69 Patientinnen \geq des Medians. In der Gruppe $<$ Median traten sechs Metastasierungen (10,16 %) auf. Das 5-Jahres MFS betrug 89,83 %. Die Gruppe \geq des Medians wies sieben Metastasierungen (10,14 %) im Beobachtungszeitraum auf. Das 5-Jahres MFS lag hier bei 92,75 % (Tabelle 24). Die Gruppe mit einer Expression \geq des Medians zeigte in den ersten 5 Jahren des Beobachtungszeitraumes einen Überlebensvorteil, zum Ende des Beobachtungszeitraum zeigte sich kein Unterschied im Verlauf der Überlebenszeitkurven. Für keine der beiden Expressionsmuster konnte ein signifikanter Unterschied im MFS nachgewiesen werden (Log-Rank $p = 0,868$) (Abb. 32, C).

Tabelle 24 Vergleich der Überlebensraten für das MFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation unterteilt nach Median

		Fälle/ Metastasen	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
cyt.-MUC1	$<$ Median	34/3	94,12 %	91,18 %	n.s.
	\geq Median	56/6	92,86 %		
mc-MUC1	$<$ Median	2/0	100 %		n.s.
	\geq Median	2/1	100 %		
cm-MUC1	$<$ Median	59/6	89,83 %		n.s.
	\geq Median	69/7	92,75 %		

(cyt. = cytoplasmatisch, mc = membranös-cytoplasmatisch, cm = cytoplasmatisch-membranös, ÜL = Überlebensrate, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse



Ergebnisse

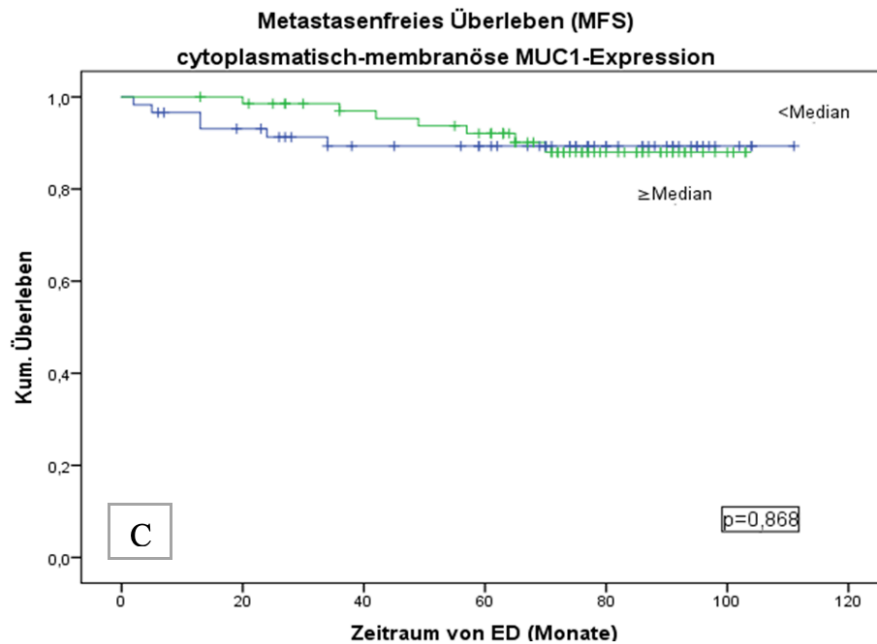


Abbildung 32 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression unterteilt nach Median auf das metastasenfrees Überleben

Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. A: cyt.-MUC1-Expression (\geq Median und $<$ Median) ohne Überlebensvorteil im MFS, B: mc-MUC1-Expression (\geq Median und $<$ Median) ohne Überlebensvorteil im MFS, C: cm-MUC1-Expression (\geq Median und $<$ Median) ohne Überlebensvorteil im MFS.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse erwies sich das subzelluläre MUC1-Expressionsmuster nicht als ein eigenständiger prognostischer Einfluss auf das metastasenfrees Überleben. Hingegen war ein Lymphknotenbefall bei Erstdiagnose mit einem 4-fach erhöhten Risiko behaftet im Verlauf eine Metastasierung zu entwickeln ($p = 0,004$) (Tabellen 25-28). Während für die MUC1-Expression im Tumor kein Einfluss auf das MFS gezeigt werden konnte, wurde in der Arbeit von Herrn Fries ein signifikanter Einfluss für die subzelluläre TA-MUC1-Expression nachgewiesen. Eine cytoplasmatische TA-MUC1-Expression war mit einem signifikant höheren Risiko für eine Metastasenentwicklung behaftet (1).

Ergebnisse

Tabelle 25 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (cytoplasmatische vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
T (T1 vs. T2/T3)	n.s.	2,665	,853	8,328
N (N0 vs. N1- N3)	,004	4,278	1,609	11,376
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. cytoplasmatisch)	n.s.			

(MFS= Metastasis free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

Tabelle 26 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (mc vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
T (T1 vs. T2/T3)	n.s.	2,665	,853	8,328
N (N0 vs. N1- N3)	,004	4,278	1,609	11,376
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. mc)	n.s.			

(MFS= Metastasis free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, mc = membranös-cytoplasmatisch, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse

Tabelle 27 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (cm vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
T (T1 vs. T2-/T3)	n.s.	2,665	,853	8,328
N (N0 vs. N1- N3)	,004	4,278	1,609	11,376
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. cm)	n.s.			

(MFS= Metastasis free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, cm = cytoplasmatisch-membranös, n.s. = nicht signifikant)

Tabelle 28 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das MFS beim Mammakarzinom (negative vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
T (T1 vs. T2/T3)	n.s.	2,665	,853	8,328
N (N0 vs. N1-N3)	,004	4,278	1,609	11,376
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos)	n.s.			
PR (neg. vs. pos)	n.s.			
HER2 (neg. vs. pos)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. doppelt negative)	n.s.			

(MFS= Metastasis free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

4.5.5 Gesamtexpression von MUC1 in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben

Im Kollektiv wiesen 86 Patientinnen eine MUC1-Expression unterhalb des Medians und 143 Patientinnen oberhalb des Medians auf. In Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (DFS) wurde ein Ereignis definiert als das Auftreten eines Lokalrezidivs und/oder einer Fernmetastasierung. In der Gruppe $<$ Median ($n=86$) zeigte sich in zwölf Fällen (14,0 %) ein Ereignis. Das 5- und 10-Jahres DFS lag bei 86,0 %. In der Gruppe \geq Median ($n=143$) traten 19 Ereignisse (13,3 %) ein. Das 5-Jahres-Überleben lag bei 90,1 % (Tabelle 29). Während des überwiegenden Beobachtungszeitraumes wiesen Patientinnen mit einer höheren MUC1-Expression ein besseres DFS auf. Im Gesamten zeigte sich für keine der beiden Gruppen eine statistisch signifikante Überlegenheit bezogen auf das krankheitsfreie Überleben (Log-Rank, $p = 0,801$) (Abb. 33). In der Vergleichsarbeit zeigte sich für die TA-MUC1-Expression in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben ebenfalls kein signifikanter Unterschied (1).

Tabelle 29 Vergleich der Überlebensraten für das DFS in Abhängigkeit der MUC1-Gesamtexpression

Variable	Fälle/ Todesfälle	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
$<$ Median	86/ 12	86,04 %	86,04 %	n.s.
\geq Median	143/ 19	90,09 %		

(ÜL = Überleben, n.s. = nicht signifikant)

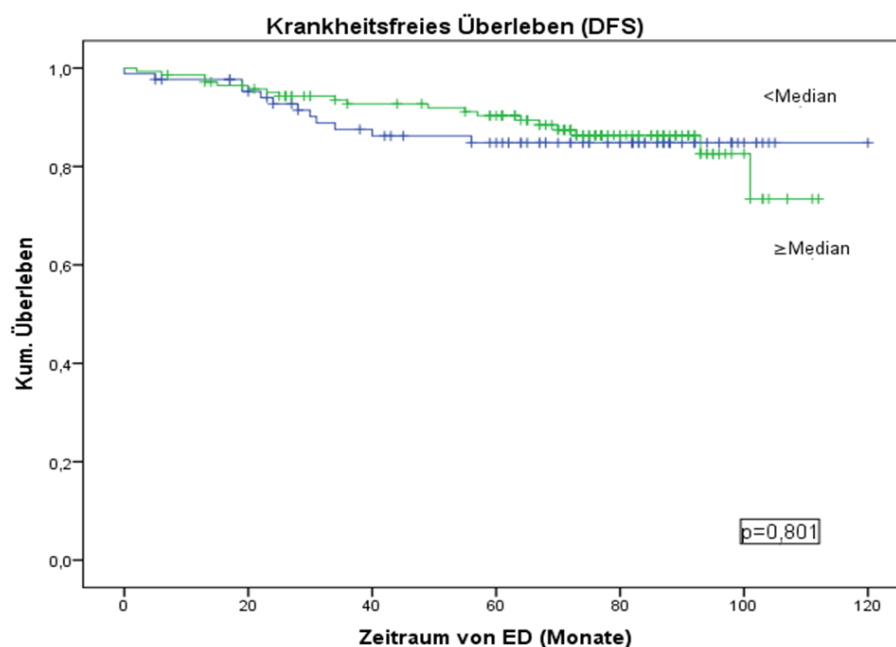


Abbildung 33 Einfluss der MUC1-Gesamtexpression auf das krankheitsfreie Überleben

Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. Die Unterteilung erfolgte in Mediangruppen (\geq Median und $<$ Median). In keine der beiden Gruppen zeigte sich ein Überlebensvorteil im DFS.

Ergebnisse

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse bewies sich die Gesamtexpression von MUC1 als nicht signifikanter prognostischer Marker in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben. Als signifikanter Prognosefaktor für das DFS zeigte sich allein der Nodalstatus. Ein positiver Lymphknotenbefall ging mit einem 2,7-fach erhöhten Risiko eines Rezidivs oder einer Metastase einher (Tabelle 30).

Im Vergleich zeigte die TA-MUC1-Expression einen signifikanten prognostischen Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben. In der Patientengruppe mit einer TA-MUC1-Expression < Median lag ein signifikant erhöhtes Risiko für das Auftreten einer erneuten Erkrankung im Sinne eines Rezidivs und/oder Fernmetastasierung vor (1).

Tabelle 30 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der MUC1-Gesamtexpression bezogen auf das DFS beim Mammakarzinom

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
N (N0 vs. N1- N3)	,008	2,734	1,295	5,769
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.	2,200	,931	5,201
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
T (T1 vs. T2/T3)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
MUC1 (<Median vs. \geq Median)	n.s.			

(DFS= Disease free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

4.5.6 Subzelluläre MUC1-Expression in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben

In der Gruppe mit cyt.-MUC1-Expression (n=90) trat in elf Fällen (12 %) während des Beobachtungszeitraums ein Rezidiv oder eine Metastasierung auf. Das 5-Jahres DFS lag bei 88,88 % und das 10-Jahres DFS bei 87,77 %. In der Vergleichsgruppe (n=139) traten 20 Ereignisse (14 %) ein. Das 5-Jahres DFS lag hier bei 85,61 %, das 10-Jahres-DFS konnte

Ergebnisse

nicht bestimmt werden (Tabelle 31). Für keine der beiden Gruppen konnte ein Überlebensvorteil bezüglich des DFS festgestellt werden (Log-Rank, $p = 0,639$) (Abb. 34, A).

Im Kollektiv mit einer mc-MUC1-Expression ($n=4$) kam es zu zwei Ereignissen (50 %). Das 5-Jahres DFS lag bei 75 %, das 10-Jahres-DFS konnte nicht bestimmt werden. In der Gruppe der restlichen Expressionen ($n=225$) kam es zu 29 Ereignissen (12,9 %) (Tabelle 31). Das 5-Jahres DFS lag bei 89,33 %, das 10-Jahres DFS bei 87,11 %. Für Patientinnen mit einer mc-MUC1 Expression zeigte sich ein signifikant schlechteres krankheitsfreies Überleben als in der Vergleichsgruppe (Log-Rank, $p = 0,040$) (Abb. 34, B).

In der Gruppe cm-MUC1-Expression ($n=128$) trat in 17 Fällen (13 %) ein Ereignis auf. Das 5-Jahres DFS lag bei 89,84 %. In der Vergleichsgruppe ($n=101$) kam es zu 14 Ereignissen (13,8 %) (Tabelle 31). Das 5-Jahres DFS lag bei 88,11 %, das 10-Jahres DFS bei 86,14 %. Es zeigte sich keine signifikante Überlegenheit in einer der beiden Gruppen bezüglich des DFS (Log-Rank, $p = 0,943$) (Abb. 34, C).

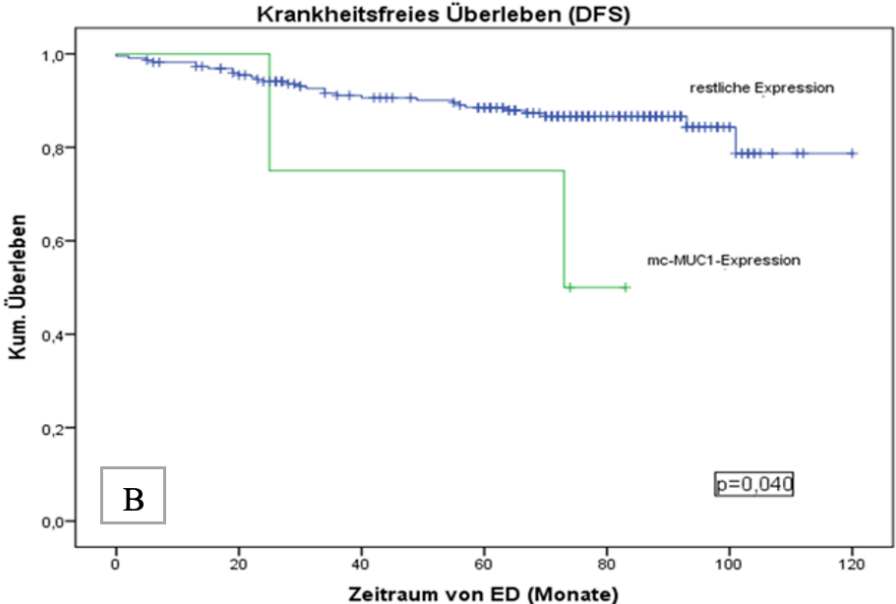
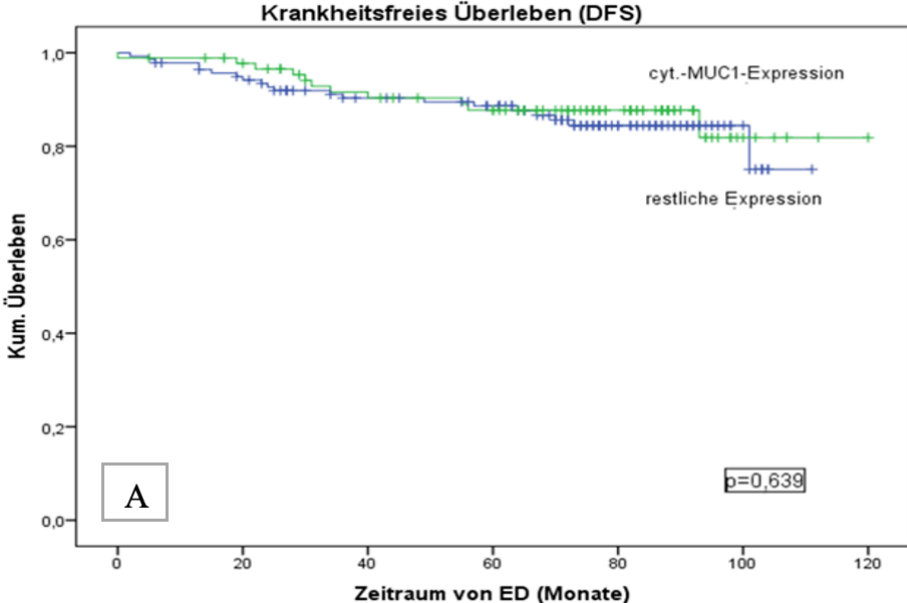
Die Gruppe negativer MUC1-Expression bestand aus sieben Patientinnen, von denen eine ein Ereignis zeigte (14,3 %). Das 5-Jahres DFS lag bei 85,71 %. Die Gruppe der restlichen Expression ($n=222$) hatte 30 Ereignisse (13,5 %) (Tabelle 31). Das 5-Jahres DFS lag bei 89,19 %, das 10-Jahres DFS bei 86,49 %. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im DFS zwischen beiden Gruppen (Log-Rank, $p = 1,0$) (Abb. 34, D). Für TA-MUC1 nach subzellulärer Expression unterteilt zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben (1).

Tabelle 31 Vergleich der Überlebensraten für das DFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation

	Fälle/ Ereignisse	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
cyt.-MUC1-Expression	90/ 11	88,88 %	87,77 %	n.s.
mc-MUC1-Expression	4/ 2	75 %		0,040
cm-MUC1-Expression	128/17	96,88 %		n.s.
doppelt-neg.-MUC1-Expression	7/1	85,71 %		n.s.

(cyt. = cytoplasmatisch, mc = membranös-cytoplasmatisch, cm = cytoplasmatisch-membranös, ÜL = Überlebensrate, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse



Ergebnisse

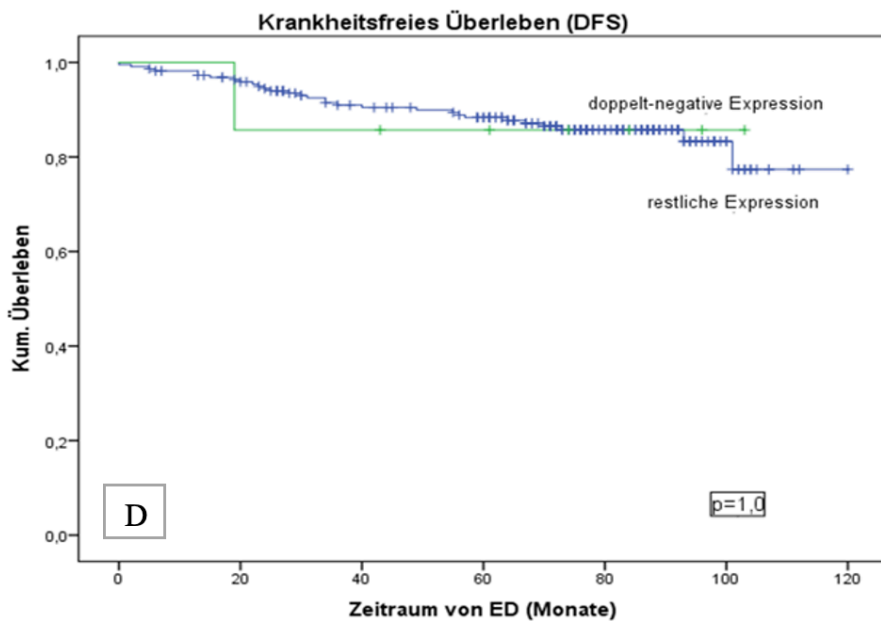
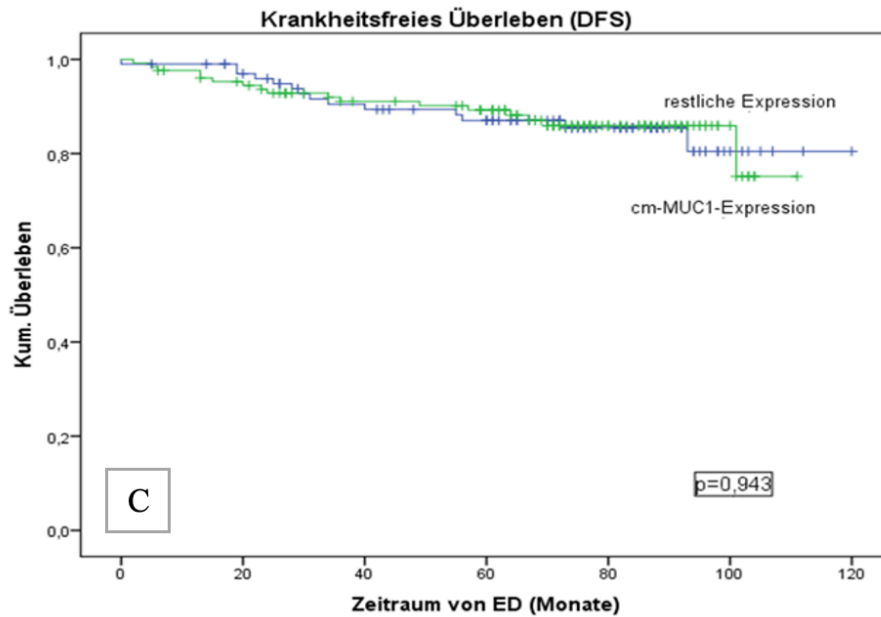


Abbildung 34 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das krankheitsfreie Überleben
Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven. A: cyt.-MUC1-Expression vs. restliche Expression ohne signifikanten Unterschied im DFS, B: mc-MUC1-Expression mit signifikanter Überlegenheit im DFS im Vergleich zur restlichen Expression ($p=0,04$), C: cm-MUC1-Expression vs. restliche Expression ohne signifikanten Unterschied im DFS, D: negative-MUC1-Expression vs. restliche Expression ohne signifikanten Unterschied im DFS.

In den anschließenden Überlebenszeitanalysen wurde der Einfluss der MUC1-Expression in subzellulärer Verteilung hinsichtlich des DFS untersucht. In der Gruppe der cyt.-MUC1-Expression wiesen 34 Patientinnen eine Expression unterhalb und 56 Patientinnen oberhalb

Ergebnisse

des Medians auf (Tabelle 32). In der Gruppe der cyt.-MUC1-Expression < Median traten drei Ereignisse (8,8 %) auf. Das 5- und 10-Jahres DFS lag bei 91,17 %. Die Gruppe \geq Median hatte acht Ereignisse (14,3 %). Das 5-Jahres DFS lag bei 87,5 %. Es zeigte sich für keine der beiden Gruppen eine signifikante Überlegenheit bezogen auf das DFS (Abb. 35, A).

In der Gruppe der mc-MUC1-Expression wiesen jeweils 2 Patientinnen unterhalb und oberhalb des Medians eine Expression auf. In der Gruppe < Median und \geq Median trat jeweils ein Ereignis auf (50 %) (Tabelle 32). Das 5-Jahres DFS der Gruppe < Median lag bei 50 %. Das 5-Jahres DFS \geq Median lag bei 100 %. Es konnte keine statistisch signifikante Überlegenheit im Überleben zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Log-Rank, $p = 0,81$) (Abb. 35, B).

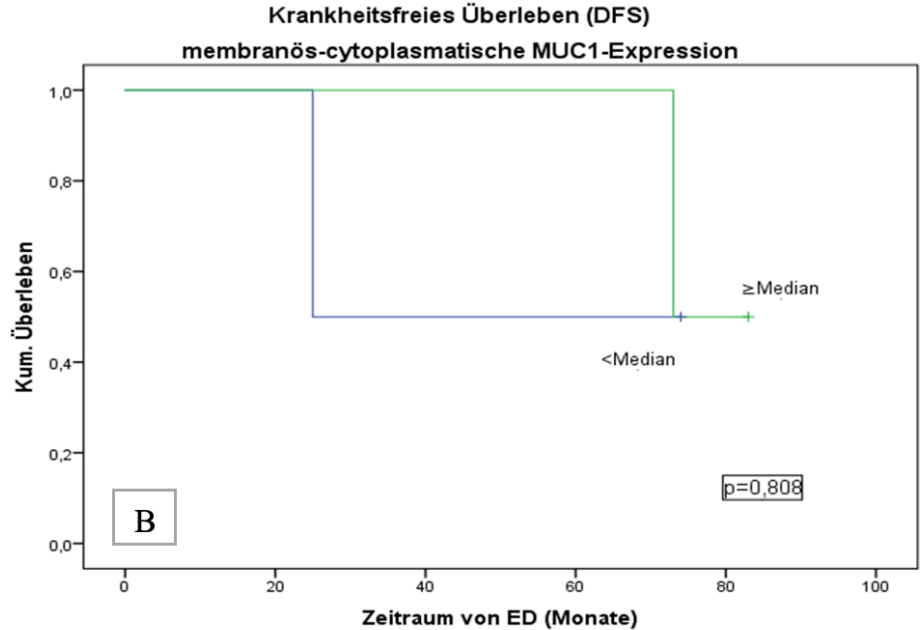
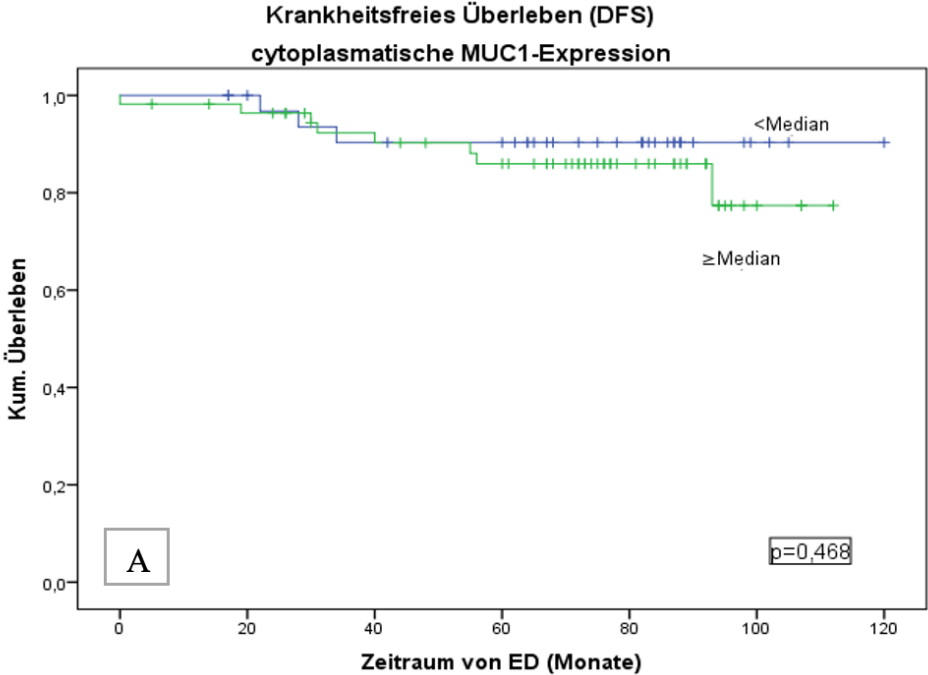
In der Patientengruppe der cm-MUC1-Expression wiesen 59 Patientinnen eine Expression unterhalb und 69 Patientinnen oberhalb des Medians auf. In der Gruppe < Median traten acht Ereignisse (13,6 %) ein (Tabelle 32). Das 5-Jahres DFS lag bei 86,44 %. In der Gruppe \geq Median traten neun Krankheitsfälle (13 %) auf. Das 5-Jahres DFS lag bei 92,75 %. Zu Beginn war die Gruppe der geringeren cm-MUC1-Expression mit einem schlechteren krankheitsfreien Überleben assoziiert. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes glichen sich beide Gruppen einander an und es zeigte sich keine Überlegenheit für eine der beiden Gruppen (Log-Rank, $p = 0,794$) (Abb. 35, C).

Tabelle 32 Vergleich der Überlebensraten für das DFS in Abhängigkeit der subzellulären MUC1-Lokalisation unterteilt nach Median

		Fälle/ Rezidiv	5-Jahres-ÜL	10-Jahres-ÜL	Log-Rank
cyt.-MUC1	<Median	34/3	91,17 %	91,17 %	n.s.
	\geq Median	56/8	87,5 %		
mc-MUC1	<Median	2/1	50 %		n.s.
	\geq Median	2/1	100 %		
cm-MUC1	<Median	59/8	86,44 %		n.s.
	\geq Median	69/9	92,75 %		

(cyt. = cytoplasmatisch, mc = membranös-cytoplasmatisch, cm = cytoplasmatisch-membranös, ÜL = Überlebensrate, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse



Ergebnisse

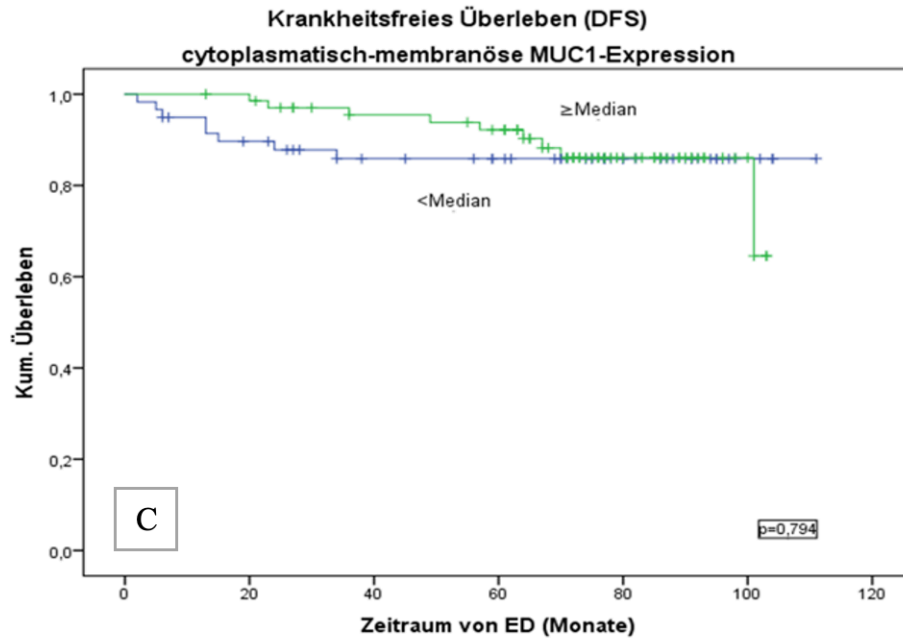


Abbildung 35 Einfluss der subzellulären MUC1-Expression unterteilt nach Median auf das krankheitsfreie Überleben

Dargestellt sind Ereignisanalysen in Form von Kaplan-Meier-Kurven A: cyt.-MUC1-Expression (\geq Median und $<$ Median) ohne Überlebensvorteil im DFS, B: mc-MUC1-Expression (\geq Median und $<$ Median) ohne Überlebensvorteil im DFS, C: cm-MUC1-Expression (\geq Median und $<$ Median) ohne Überlebensvorteil im DFS.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse zeigte sich die subzelluläre Expression von MUC1 im Tumorgewebe als unabhängiger prognostischer Einfluss in Bezug auf das DFS. Das mc-MUC1-Expressionsmuster in malignen Brustkrebstumoren erwies sich als statistisch signifikanter Einflussfaktor für das Auftreten von erneuten Krankheitsereignissen wie Rezidiven oder Metastasen ($p = 0,046$). Patientinnen mit einer mc-MUC1-Expression hatten ein 4,5-fach höheres Risiko für das Auftreten eines Krankheitsereignisses als die Vergleichsgruppe. Als ebenfalls signifikanter Einflussfaktor für das krankheitsfreie Überleben erwies sich der Nodalstatus. Das Risiko für ein erneutes Krankheitsereignis stieg um das 2,7-fache bei positivem Lymphknotenbefall (Tabelle 34). Die restlichen subzellulären MUC1-Expressionen zeigten sich nicht signifikant in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (Tabelle 33, 35, 36). Die subzelluläre TA-MUC1-Expression zeigte keinen signifikanten Einfluss in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (1).

Ergebnisse

Tabelle 33 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (cytoplasmatisch vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
N (N0 vs. N1-3)	,008	2,734	1,295	5,769
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.	2,200	,931	5,201
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
T (T1 vs. T2- T4)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. cytoplasmatisch)	n.s.			

(DFS= Disease free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

Tabelle 34 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (mc vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
N (N0 vs. N1-3)	,027	2,363	1,102	5,069
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.	2,032	,937	4,403
MUC1 (restliche vs. mc)	,046	4,564	1,028	20,257
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
T (T1 vs. T2- T4)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.			

(DFS= Disease free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, mc = membranös-cytoplasmatisch, n.s. = nicht signifikant)

Ergebnisse

Tabelle 35 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (cm vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
N (N0 vs. N1-3)	,008	2,734	1,295	5,769
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.	2,200	,931	5,201
Alter (≤ 55 vs. >55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
T (T1 vs. T2- T4)	n.s.			
DCIS/LIN (nein. vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. cm)	n.s.			

(DFS= Disease free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, cm = cytoplasmatisch-membranös, n.s. = nicht signifikant)

Tabelle 36 Multivariate Cox-Regression: Einfluss der subzellulären MUC1-Expression auf das DFS beim Mammakarzinom (negative vs. restliche)

Kovariaten	Signifikanz (p-Wert)	HR (Exp(B))	95 % KI	
			Untere	Obere
N (N0 vs. N1-3)	,008	2,734	1,295	5,769
HER2 (neg. vs. pos.)	n.s.	2,200	,931	5,201
Alter (≤ 55 vs. ≥ 55 Jahre)	n.s.			
Histologie (nicht NST vs. NST)	n.s.			
T (T1 vs. T2- T4)	n.s.			
DCIS/LIN (nein vs. ja)	n.s.			
ER (neg. vs. pos.)	n.s.			
PR (neg. vs. pos.)	n.s.			
Grading (G1/2 vs. G3)	n.s.			
MUC1 (restliche vs. doppelt negative)	n.s.			

(DFS= Disease free survival, HR = Hazard Ratio, KI = Konfidenzintervall, n.s. = nicht signifikant)

5 Diskussion

Mucin1 ist ein lange bekanntes Tumorantigen, das in den letzten Jahren immer wieder in den Fokus der Tumorforschung gerückt ist. Das *National Cancer Institut* listete Mucin1 bereits 2009 auf Platz 2 der favorisierten Krebsantigene (128). Die Bedeutsamkeit von Mucin1 liegt zum großen Teil in seinen einzigartigen Eigenschaften im Tumor begründet. Physiologisch ist Mucin1 ein Vertreter der apikal exprimierten transmembranären Glykoproteine auf Epithelzellen, welche unter anderem die Lumina endokriner Organe wie Pankreas, Lunge und der Brustdrüse auskleiden. Im Vergleich zu der Expression im gesunden Gewebe liegt Mucin1 im Tumor ubiquitär über die Epithelzelle verteilt vor und ist zudem häufig stark überexprimiert. In Brusttumoren konnte eine Überexpression von Mucin1 in über 90 % nachgewiesen werden (98, 129). Ein weiteres Merkmal von Mucin1 ist seine komplexe Glykosylierung, die während der Tumorgenese eine so umfassende Modifizierung erfährt, dass es neben der Expression von tumorassoziierten Antigenen zur Entstehung neuer, ausschließlich im Tumor vorliegender tumorspezifischer Epitope kommt.

Es existiert eine Vielzahl an Mucin1-Antikörperstudien, in denen die Expression verschiedener Mucin1-Epitope im Tumorgewebe in Korrelationen mit Tumoreigenschaften und der Prognose von Brustkrebspatientinnen untersucht wurde. Einige dieser Mucin1-Antikörper konnten bereits in Phase I und II klinische Anwendung finden (119, 129, 130). Während der Erforschung von Mucin1 als Onkogen zeigte sich, dass nur wenige der bisher beschriebenen Mucin1-Epitope die Kriterien als geeignetes Tumorantigen in der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms erfüllen.

Ein vielversprechendes Mucin-Antigen ist das Glykopeptid-Epitop TA-MUC1, welches durch den synthetischen Glykopeptidantikörper GGSK-1/30 nachgewiesen werden kann. Es konnte bereits im Tierversuch Anwendung in der Diagnostik von Tumoren in Form eines Tracergebundenen Antikörpers finden. Zusätzlich erfolgten bereits erste Versuche mit TA-MUC1 als immunmodulierendes Anti-Tumor-Vakzin am Maus-Modell (131, 132).

Während die detaillierte Analyse des neuen Tumorantigens TA-MUC1 anhand des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30 in einer gesonderten Arbeit durch Herrn Dr. Peter Fries erfolgte (1, 133), ermöglichte diese Arbeit eine direkte Gegenüberstellung von GGSK-1/30 mit dem etablierten Mucin1-Antikörper VU4H5 sowie deren Korrelationen mit Tumoreigenschaften und der Prognose von Brustkrebspatientinnen.

5.1 Vergleich der Expression von MUC1 und TA-MUC1 im Mammakarzinom

Zur Untersuchung, ob Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen den verschiedenen Mucin1-Epitopen MUC1 und der verändert glykosylierten Variante TA-MUC1 in Brusttumoren existieren, erfolgte ein immunhistochemisches Nachweisverfahren innerhalb eines Kollektivs von 234 Brustkrebspatientinnen. Die Besonderheit dieser Arbeit lag in der Auswahl des Kollektivs, die nicht den Fokus auf ein Subkollektiv legte, sondern vielmehr ein Abbild der tatsächlichen Häufigkeitsverteilung verschiedener Tumorentitäten des Mammakarzinoms darstellte.

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von MUC1 und TA-MUC1 im Mammakarzinom nachgewiesen werden ($p < 0,001$). 81,7 % aller Tumorschnitte zeigten eine eindeutig positive MUC1-Expression im Tumorgewebe (IRS > 2), wohingegen TA-MUC1 zu einem noch höheren Anteil von 92,4 % exprimiert wurde. Für beide Mucin1-Epitope zeigte sich insgesamt ein hoher Expressionsgrad, wobei dieser für TA-MUC1 höher ausfiel (Vgl.: TA-MUC1 \bar{x} : IRS 8 vs. MUC1 \bar{x} : IRS 6).

Die Antikörper VU4H5 und GGS K-1/30 sind gegen zwei unterschiedliche Epitope auf Mucin1 gerichtet, die beide innerhalb der extrazellulären N-terminalen Untereinheit des dimeren Peptids liegen. Das Apoprotein Mucin1 besteht aus einer sich wiederholenden Proteinsequenz der VNTR-Region, dessen Serin- und Threoninreste als Bindungsstellen für O-Glykosylierungen dienen. Die initiale Bindung verschiedener Zuckermoleküle am Apoprotein bildet die verschiedenen Kernstrukturen (*Core 1, 2, 3*) und sind Ausgangspunkt für weitere O-Glykosylierungen, wodurch ein Aufbau weit verzweigter Kohlenhydratketten stattfindet. Eine im Tumorgewebe vorliegende Hypoglykosylierung von Mucin1 führt zur partiellen Freilegung des Proteinrückrats. Die immunodominante Tandem-Repeat-Struktur (VNTR) kann dadurch in Form von neu exprimierten Peptid-Epitopen Mucin1-Antikörpern als Zielstruktur dienen. Der verwendete Antikörper VU4H5 bindet an eines dieser Peptidepitope mit der Peptid-Sequenz PDTRPAP (136), hier benannt als MUC1 (Abbildung 36).

Diskussion

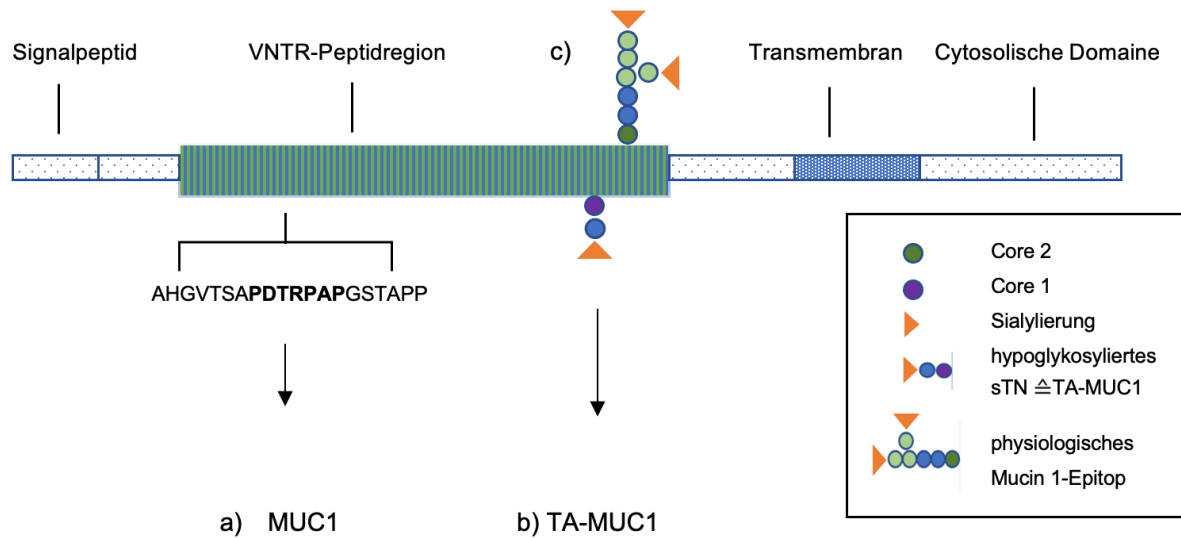


Abbildung 36 Schematische Darstellung des Mucin1-Moleküls mit den Epitopen MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe

Dargestellt ist das Transmembranprotein Mucin1 bestehend aus dem Signalpeptid, der VNTR-Peptidregion mit repetitiver 20n-AS-Sequenz sowie der transmembranen und cytosolischen Domäne.

a) MUC1 als „reines“ Peptidepitop, repräsentiert durch die PDTRPAP-Sequenz.

b) Das Glykopeptidepitop TA-MUC1 repräsentiert durch das hypoglykosylierte sialylierte Thomsen-Friedenreich-Antigen auf der Kernstruktur 1.

c) Physiologisches nicht-verändertes Mucin1-Epitop mit Kernstruktur 2 und ausgeprägter Glykosylierung. Abbildung modifiziert nach Baldus et al. (2004) (94).

Die Entwicklung des Antikörpers VU4H5 erfolgte durch eine Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit dem 60-mer Volllängenprotein Mucin1, ohne jeglichen Glykosylierungsanteil (124, 134), sodass von einer spezifischen und ausschließlichen Peptid-Bindung von VU4H5 ausgegangen werden kann. In nachfolgenden Arbeiten (135, 136) konnte jedoch mittels ELISA-Verfahren nachgewiesen, dass durch VU4H5 neben einer Antikörper-Bindung an vollständig unglykosylierten Mucin1 zudem eine Bindung an Mucin1 mit veränderten Glykosylierungsmustern im Tumor stattfindet. Dabei war die Bindung indirekt abhängig vom Glykosylierungsgrad, da diese eine Freilegung des Peptidepitops und somit eine bessere Peptid-Bindung bedingte (135). Die Tatsache, dass VU4H5 in der Lage ist, sowohl vollständig deglykosyliertes als auch verändert glykosylierte Varianten von Mucin1 im Tumorgewebe nachzuweisen, spricht für eine hohe Affinität des Antikörpers und steht im Einklang mit der in dieser und weiteren Arbeiten (137, 138) nachgewiesenen hohen Sensitivität im Nachweis von MUC1 im Tumorgewebe.

Neben der Hypoglykosylierung des Mucin1-Proteins im Tumorgewebe konnten gegenüber gesundem Brustgewebe zudem veränderte Glykosylierungsmuster von Mucin1 nachgewiesen werden. Eine verminderte Aktivität von Glykosyltransferasen und eine gleichzeitig erhöhte

Aktivität von Sialyltransferasen im Tumorgewebe führen zur Entstehung verkürzter sowie weniger verzweigter Kohlenhydratseitenketten auf Mucin1 (112). Die so entstehenden Kohlenhydratepitope sind häufig Neoantigene und werden tumorspezifisch exprimiert (139, 140). Eines dieser Kohlenhydratepitope stellt das zum Vergleich dienende Antigen TA-MUC1 dar, das durch den Antikörper GGSK-1/30 nachgewiesen werden kann. Das Epitop TA-MUC1 besteht aus einer verkürzten sialylierten Kohlenhydratseitenkette (STn-Core1-Struktur) auf der immunodominanten Region GSTA der VNTR-Sequenz von Mucin1 (Abbildung 36) (132).

Der wesentliche Unterschied der beiden untersuchten Tumorepitope liegt in ihrem strukturellen Aufbau, wobei MUC1 einem Peptidantigen und TA-MUC1 einem Glykopeptid-antigen entspricht. Dabei ist das Peptidepitop MUC1 von Hypoglykosylierungen auf der VNTR-Region und das Glykopeptidepitop TA-MUC1 von einer spezifisch veränderten Glykosylierung einer definierten Peptidregion im Tumorgewebe abhängig.

Veränderungen des Glykosylierungsmusters von Mucin1 können zu Konformationsänderungen des Moleküls führen, wodurch benachbarte Peptidregionen beeinflusst werden. Dies resultiert in einer veränderten Zugänglichkeit der jeweiligen Antikörper auf ihre Zielepitope (140, 141). In einer Arbeit von Karsten et al, in der das Bindungsverhalten mehrerer monoklonaler AK in Abhängigkeit des Glykosylierungsmusters bzw. dem Ausmaß der Hypoglykosylierung in Brusttumoren untersucht wurde, ließ sich für VU4H5 eine Bindungsschwäche an seinem Mucin1-Epitop erkennen, sobald eine Glykosylierung innerhalb der Peptidsequenz PDTR von MUC1 vorlag (135, 142). Dieses Bindungsverhalten bestätigte sich durch eine weitere Vergleichsarbeit, in der ein dem GGSK-1/30 ähnlicher Antikörper, VU2G7, dem Antikörper VU4H5 zum Vergleich gegenübergestellt wurde (138). Bei vollständiger Hypoglykosylierung von Mucin1 zeigte VU2G7 hierbei eine schwächere Bindung für sein Glykopeptidepitop als VU4H5. Bei Vorliegen der für das VU2G7-Glykopeptid spezifischen Glykosylierungsmuster waren hingegen benachbarte Hypoglykosylierungen sowie weitere Glykosylierungsmuster kaum einflussgebend auf das Bindungsverhalten von VU2G7. Der Peptidantikörper VU4H5 ist folglich lediglich in der Lage sein Peptidepitop bei vollständiger Hypoglykosylierung zu binden und ist hierbei beeinflussbar durch benachbarte Veränderungen im Glykosylierungsmuster. Das Bindungsverhalten von Glykopeptidantikörpern, wie VU2G7 und GGSK-1/30, erscheinen bei Vorliegen ihrer spezifischen Glykopeptid-Epitope hingegen unabhängig von weiteren Veränderungen. Es ist denkbar, dass die in dieser Arbeit dargestellten Unterschiede im Anteil positiver Tumorpräparate durch VU4H5 und GGSK-1/30 (Vgl. MUC1: 81,7 % vs. TA-MUC1 92,4 %) ebenfalls auf ein

unterschiedliches Bindungsverhalten der beiden Antikörper im Tumorgewebe zurückzuführen ist.

Neben den Unterschieden im Glykosylierungsmuster, sind zudem Unterschiede in der Länge des Peptidepitops der beiden Antikörper nachweisbar, die Einfluss auf das jeweilige Bindungsverhalten von VU4H5 und GGSK-1/30 haben könnten. VU4H5 wurde gegen das 60mer Peptid synthetisiert, wohingegen GGSK-1/30 gegen das 22mer Peptid gerichtet ist (132). Für VU4H5 konnte bereits im Vergleich mit anderen Mucin1-Antikörpern eine Abhängigkeit zwischen der Bindungsaffinität und der Gesamtlänge der VNTR-Region nachgewiesen werden. Für VU4H5 war mit zunehmender Länge des Mucin1-Peptids eine sukzessive Zunahme der Antikörper-Affinität zu beobachten, wohingegen sich bei verkürzter AS-Sequenz (<60mer) eine schlechtere Bindung zeigte (135, 136). Eine veränderte Länge der Tandem-Repeat-Sequenz beeinflusst maßgeblich die Tertiärstruktur von Mucin1, was zu einer veränderten Affinität von Mucin1-Antikörpern führen kann, bis hin zu einer vollständig aufgehobenen Bindung, selbst bei Vorliegen des jeweiligen Zielepitops (143). Denkbar wäre, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen Expressionsunterschiede von MUC1 und TA-MUC1 in der in Brusttumoren verändert vorliegenden Peptidlänge von Mucin1 mitbegründet sind.

Stergiou et. al konnten innerhalb eines kleineren Tumorkollektivs von TNBC-Tumoren anhand von GGSK-1/30 ebenso wie in der Arbeit von Herrn Dr. Fries eine herausragende Tumorsensitivität und -spezifität für das untersuchte Glykopeptid-Epitop TA-MUC1 nachweisen (1, 131). In einer ähnlichen Vergleichsarbeit untersuchten Heublein et al. die Mucin1-Expression im Tumor mittels eines weiteren Glykopeptidantikörpers PankoMab, der ähnlich wie GGSK-1/30 spezifisch gegen eine im Tumor verändert glykosylierte Variante von Mucin1 gerichtet ist (144). Im Vergleich zu den Ergebnissen für VU4H5 in dieser Arbeit zeigte sich für PankoMab eine deutlich geringere Gesamtexpression des Glykopeptid-Epitops im Tumorgewebe (Vgl.: VU4H5: 81,7 % vs. PankoMab: 75 %). Da im Tumorgewebe nicht nur ein einzelnes, verändertes Glykosylierungsmuster vorliegt, sondern zeitgleich eine Vielzahl von veränderten Glykosylierungsvarianten, ist mit der Auswahl eines Glykopeptidepitops nur ein Anteil vom Gesamt-Mucin1 im Tumor abgebildet, wodurch sich die geringere Sensitivität von PankoMab erklären lässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Glykopeptid-Antikörper im Vergleich mit reinen Peptid-Antikörpern weniger abhängig von Konformationsänderungen durch benachbarte Glykosylierungen sind. Die dargestellten stark voneinander abweichenden Sensitivitätsunterschiede verschiedener glykopeptidgerichteter Antikörper im Brustkrebsgewebe lassen jedoch auf die Bedeutsamkeit in der Auswahl des jeweiligen Mucin1-Glykopeptidepitops im

Tumor schließen. Auf Grund der Ergebnisse dieser Vergleichsarbeit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass TA-MUC1, nachgewiesen durch GGSK-1/30 eines der dominierenden aberranten Glykosylierungsmuster in Brusttumoren darstellt. Die hier erfolgten Analysen zur Expression von MUC1 und TA-MUC1 im Brustkrebsgewebe konnten eine Überlegenheit für GGSK-1/30 in Bezug auf den Nachweis seines Glykopeptidepitops TA-MUC1 gegenüber dem Peptidepitop MUC1 zeigen.

5.2 MUC1 und TA-MUC1 als tumorspezifische Marker des Mammakarzinoms

Die hohe Sensitivität der Antikörper VU4H5 und GGSK-1/30 im Nachweis von MUC1 und TA-MUC1 ist bereits zuvor erörtert worden. Für die Eignung als Tumor-Marker des Mammakarzinoms, vor allem im klinischen Einsatz, ist neben der Sensitivität zudem die Frage nach der Tumorspezifität von essenzieller Bedeutung. Hierfür wurde in dieser Arbeit die Expression der beiden Mucin1-Epitope im gesunden Brustdrüsengewebe untersucht. Im Nachweis durch VU4H5 ließ sich hierbei eine MUC1-Expression im gesunden Brustdrüsengewebe darstellen. Dabei zeigte sich sowohl eine zellspezifische apikale als auch eine cytoplasmatische Färbung des Brustdrüsengewebes, wobei umliegende Strukturen keine Antikörperfärbung aufwiesen. Im Vergleich dazu wies eine Antikörperfärbung mittels GGSK-1/30 keinerlei Expression des Glykopeptid-Epitops TA-MUC1 in den gleichen gesunden Brustgewebeschnitten auf (1).

Im physiologischen Zustand wird Mucin1 an der apikalen Zellmembran sekretorischer Epithelien exprimiert. Darüber hinaus ist eine Mucin1-Expression im Gesunden auch im Cytoplasma zu beobachten, was aus Rezyklierungsprozessen resultiert in denen Mucin1 von der Zellmembran nach intrazellulär transportiert und durch eine schrittweise Glykosylierung und Sialylierung im Golgi-Apparat synthetisiert wird (145).

Neben der in dieser Arbeit nachgewiesenen Expression von MUC1 durch VU4H5 im gesunden Brustgewebe, erfolgte durch den Antikörperhersteller *Cell Signaling Technology* zudem ein Expressionsnachweis in gesundem Kolon- und Pankreasgewebe. Andere immunhistochemische Vergleichsarbeiten konnten ebenso eine MUC1-Expression anhand des Antikörpers VU4H5 im gesunden Brustdrüsengewebe nachweisen (135, 137, 139). Es zeigte sich für das Peptidepitop MUC1 somit einerseits keine Organspezifität und andererseits vor allem keine Tumorspezifität.

In den überwiegenden Studiendesigns immunhistochemischer Vergleichsarbeiten anderer Mucin-1-Antikörper wurden keine Kontrollfärbungen an gesundem Brustgewebe durchgeführt,

sodass kein allgemeiner Literaturvergleich zur Expression im gesunden Brustdrüsengewebe möglich war. Anstelle dessen untersuchte der ISOBM TD4 Workshop im ELISA Verfahren 56 Mucin1-Antikörper unter anderem auf ihre Tumorspezifität. Mit eingeschlossen waren Peptidepitope wie das hier untersuchte MUC1-Epitop von VU4H5, als auch Glykoepitope. Dabei zeigte sich lediglich für sieben der untersuchten Antikörper eine Tumorspezifität. In allen anderen Fällen, hierunter auch für VU4H5, zeigte sich eine Expression von Mucin1 in gelöster Form im Gesunden (134).

Für das Tumorepitop TA-MUC1 ließ sich durch GSK-1/30 in allen bisherigen Studien keine Expression im gesunden Brustdrüsengewebe nachweisen (131, 132, 146). Dies verdeutlicht die ausgezeichnete Tumorspezifität von TA-MUC1, die sich wie folgt erklären lässt: TA-MUC1 liegt auf der verkürzt glykosylierten und sialylierten Seitenkette der Core 1-Kernstruktur, auch bekannt als sialyliertes Thomsen-Friedenreich-Antigen (TFn) an einer spezifischen Aminosäuresequenz des Proteinrückrats gebunden. In Brusttumoren konnte eine Verlagerung der im gesunden Brustgewebe vorherrschenden Core 2-Kernstruktur hinzu Core 1-Kernstruktur, die folglich ausschließlich im Brusttumorgewebe exprimiert wird, nachgewiesen werden (112). Zusätzlich ist das Epitop von TA-MUC1 bestehend aus zwei Sequenzen, dem Peptid- und einem zusätzlichen Kohlenhydrat-Anteil, im Gegensatz zu reinen Kohlenhydratepitopen spezifischer für das Mucin1 im Tumorgewebe. Das MUC1-Epitop von VU4H5 hingegen entsteht durch unspezifische Hypoglykosylierungsprozesse, die zu einer Freilegung des immunodominanten Proteinrückrats führen und ist unabhängig von der Entstehung von Core1-Strukturen.

Der hier erfolgte Nachweis von MUC1 durch VU4H5 im gesunden Gewebe deutet darauf hin, dass neben der malignen Transformation auch Prozesse im gesunden Brustgewebe zu einer Hypoglykosylierung und demzufolge zu einer Freilegung des MUC1-Epitops führen können, die somit eine fehlende Tumorspezifität erklären. Des Weiteren kann bei MUC1 in cytoplasmatischer Lokalisation davon ausgegangen werden, dass es sich um geringer glykosylierte Mucin1-Moleküle handelt, die erst schrittweise durch die repetitiven Rezyklierungsprozesse an Glykosylierung zunehmen und demzufolge partiell freie Peptidepitope beinhalten können.

Zusammenfassend konnte für die beiden Epitope MUC1 und TA-MUC1 zu einem hohen Anteil eine Expression in den Tumorproben nachgewiesen werden. Der Antikörper VU4H5 erwies sich durch den Nachweis in gesunden Brustgewebeproben nicht als spezifisch genug, um zwischen physiologischen und tumorassoziiertem Mucin1 zu unterscheiden. Zur Eignung als Tumormarker in der Diagnostik und Therapie ist das Glykopeptidepitop TA-MUC1 durch seine

hohe Sensitivität und gleichzeitige Tumorspezifität gegenüber dem Peptidepitop MUC1 daher überlegen.

5.3 Betrachtung der subzellulären Lokalisation von MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe

Neben einer Betrachtung der Gesamtexpression war eine der zentralen Fragestellung dieser Arbeit die subzelluläre Verteilung der Epitope MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe. Im Vergleich zeigten sich signifikante Unterschiede in der subzellulären Verteilung von MUC1 und TA-MUC1 ($p < 0,001$). Für MUC1 fand sich eine besonders häufig rein cytoplasmatische Lokalisation. Am häufigsten lag jedoch eine Kombination aus cytoplasmatisch und membranständiger Expression vor. Auffallend war das Fehlen rein membranständiger Expressionen sowie das seltene Vorkommen einer membranös-cytoplasmatischen Lokalisation. TA-MUC1 wies ebenfalls am häufigsten eine gemischte cytoplasmatisch-membranöse Expression auf. Deutlich häufiger als MUC1 wurde TA-MUC1 überwiegend membranständig exprimiert (Vgl. TA-MUC1 mc: 13,5 % vs. MUC1 mc: 1,7 %). Rein cytoplasmatische Expressionen zeigten sich für TA-MUC1 dafür wesentlich seltener (Vgl. TA-MUC1 cyt.: 11,8 % vs. MUC1 cyt.: 39 %). Eine rein membranöse Expression lag für keine der beiden Antigene vor.

In einer Vergleichsarbeit von Heublein et al., zeigte sich durch PankoMab-GEX, der ähnlich wie GGSK-1/30 ein tumorspezifisches Glykopeptid (TA-MUC1) bindet, ein wiederum anderes Verteilungsmuster im Brustkrebsgewebe. Geprägt war dieses durch eine rein membranständige Expression (40 %), gefolgt von einer gemischt cytoplasmatisch-membranösen (29 %). Weitaus geringer zu den hier erhobenen Ergebnissen, war eine cytoplasmatische Lokalisation (5,7 %), in 25 % der Tumorproben zeigte sich keinerlei Mucin1 Expression (144). In der Durchsicht weiterer Arbeiten lässt sich im Nachweis von Mucin1 nach Aufteilung in subzelluläre Lokalisation ein sehr heterogenes Bild an Expressionsmustern erkennen. Dies liegt nicht zuletzt an einer subjektiven Gruppierung der einzelnen Kompartimente, die auch andere Expressionsmuster, wie apikale, luminale oder nukleäre Expressionen miteinschließen. In den meisten Vergleichsstudien war im Unterschied zu den Epitopen MUC1 und TA-MUC1 ein im Durchschnitt deutlich höherer membranständiger und gleichzeitig geringerer rein cytoplasmatischer Anteil im Nachweis anderer Mucin1-Epitope im Tumor vorzufinden.

In physiologischer Form liegt Mucin1 als transmembranäres Glykoprotein an der apikalen Zellmembran exprimiert vor. Im Tumorgewebe verliert sich die strenge apikale Ausrichtung durch Aufhebung der Zellpolarität und es kommt zu einer Umverteilung von Mucin1 über die gesamte Zellmembran, wobei Mucin1 hierbei auch vermehrt intrazellulär exprimiert wird. Durch endozytotische Rezyklierungsprozesse wird Mucin1 in das Cytoplasma transportiert und erfährt dort eine stetige Modifizierung bzw. Erweiterung der Zuckerseitenketten. Im Tumorgewebe konnte ein Anstieg der Endozytoserate und somit vermehrte Expression von hypoglykosylierten Mucin1 im Cytoplasma nachgewiesen werden (145).

Der in dieser Arbeit nachgewiesene hohe Anteil von MUC1 durch VU4H5 in ausschließlich cytoplasmatischer Lokalisation könnte sich aus der besseren Zugänglichkeit des Antikörpers gegenüber hypoglykosylierteren Formen von Mucin1 und seinem Zielepitop MUC1 im Zytoplasma erklären. Der verhältnismäßig geringere Nachweis von MUC1 auf der Zellmembran lässt vermuten, dass nach einer intrazellulären Prozessierung unreifer Mucin1-Moleküle vermehrt verändert glykosylierte Mucin1-Moleküle an der Membran exprimiert vorliegen und folglich in einer verminderten Zugänglichkeit des Antikörpers VU4H5 zum Proteinrückrat resultieren. Im Gegensatz dazu erscheint das Epitop TA-MUC1 mit einem deutlich höheren Anteil membrangebundener Expressionsmuster (cytoplasmatisch-membranöser und membranös-cytoplasmatischer Expression) eine bessere Zugänglichkeit für den Antikörper GGSK-1/30 in membranständiger Lokalisation aufzuweisen.

Zusammenfassend konnte trotz einer identischen Einteilung der Expressionsmuster deutliche Unterschiede in der subzellulären Verteilung von MUC1 und TA-MUC1 im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Der Vergleich untereinander, aber auch mit anderen Vergleichsarbeiten zeigt, dass die jeweiligen Mucin1-Antikörper im Nachweis ihrer Mucin1-Epitope unterschiedliche Präferenzen zur Lokalisation im Tumor aufweisen und mit einer besseren oder schlechteren Zugänglichkeit einhergehen (108, 129, 144, 147). Welche Funktion im Tumorprozess durch die jeweiligen Glykosylierungsmuster bzw. Expressionen der Mucin1-Epitope in den einzelnen subzellulären Kompartimenten übernommen wird, ist noch nicht abschließend erforscht. Erst die nachfolgenden Korrelationen mit weiteren Tumormerkmalen lassen bestimmte Funktionen vermuten.

5.4 Korrelation von MUC1 und biologischen Markern des Mammakarzinoms

Vergleich der Korrelation von MUC1 und TA-MUC1 mit Hormon- und HER2-Rezeptoren im Tumor

In den in dieser Arbeit erhobenen Korrelationsanalysen konnte ein signifikanter Zusammenhang sowohl zwischen der MUC1-Gesamtexpression als auch der subzellulären MUC1-Expression und dem Hormonrezeptor sowie HER2-Status im Tumorgewebe nachgewiesen werden. In Tumoren mit gleichzeitig vorliegender Hormon- und HER2-Rezeptorpositivität zeigte sich eine signifikant erhöhte MUC1 Gesamtexpression ($p = 0,031$). Tumoren mit überwiegend membrangebundener MUC1-Expression (mc) waren signifikant häufiger HER2-Rezeptor positiv ($p = 0,012$; Phi 0,163). Im Vergleich war in Tumoren mit einer TA-MUC1 in membranös-cytoplasmatischer-Lokalisation (mc) signifikant häufiger eine positive HER2- und Hormonrezeptorexpression vorzufinden ($p = 0,012$) (1).

In einer Vergleichsstudie von Dian et al. wurden drei verschiedene Mucin1-Antikörper, die beiden Peptidantikörper VU4H5 und DF3 sowie der Glykopeptidantikörper PankoMab, miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer Korrelationen zwischen der Gesamtexpression von Mucin1 und weiteren Tumoreigenschaften des Mammakarzinoms untersucht. Hierbei konnte lediglich für PankoMab ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Mucin1-Expression und dem Hormonrezeptorstatus nachgewiesen werden. Hormonrezeptor-negative Tumoren wiesen hierbei eine verminderte Mucin1-Expression auf (137). Es konnten in dieser und weiteren Immunhistochemischen Vergleichsstudien keine signifikanten Korrelationen zwischen der HER2-Rezeptor- und der Mucin1-Expression im Mammakarzinom nachgewiesen werden.

Ein Zusammenhang zwischen Mucin1 und der Hormonrezeptor-Expression im Mammakarzinom wurde bereits durch Kufe et al. beschrieben (2). Von zwei vorherrschenden Subtypen des Östrogenrezeptors findet sich in Brusttumoren am Östrogenrezeptor alpha eine Bindungsstelle für Mucin1. Die Molekülbindung führt zu einer Stabilisierung des Hormonrezeptors. Zudem zeigte sich eine so ausgelöste Stimulation von Transkriptionsprozessen (148). Östrogenrezeptoren sind in der Lage, das Zellwachstum und die Metastasierung von Tumoren zu begünstigen, was für die Prognosebestimmung von entscheidender Bedeutung ist (149, 150). Merikhian et al. konnten bereits nachweisen, dass eine Co-Expression von Mucin1 in hormonrezeptorpositiven Brusttumoren zu einer vermehrten Chemoresistenz gegenüber der antihormonellen Therapie mit Tamoxifen führt (151).

Etwa 20 -30 % aller Mammatumoren weisen einen positiven HER2-Rezeptorstatus auf. Eine Überexpression ist hierbei mit einer erhöhten Tumorinvasivität sowie einem verringerten krankheitsfreien Überleben assoziiert (83, 152). Im Mammakarzinom führt der im Rahmen der Tumorprogression stattfindende Polaritätsverlust zu einer Umverteilung bzw. ubiquitären Verteilung von Mucin1 über die Zelle. Dies ermöglicht potenzielle neue Interaktionen zwischen den basolateral gelegenen Membranproteinen, wie bspw. HER2 und Mucin1 (98, 153). Pang et al. konnten im Tiermodell signifikante Wechselwirkungen zwischen HER2 und Mucin1 im Tumor nachweisen (154). Klinische Studien weisen zudem darauf hin, dass HER2-positive Tumoren bei einer gleichzeitigen Überexpression von Mucin1 ein schlechteres Therapieansprechen gegenüber einer Antikörpertherapie mit Trastuzumab zeigen (155).

In Übereinstimmung mit der Literatur können die in dieser Arbeit nachgewiesenen signifikanten Zusammenhänge die Hypothese einer gegenseitigen Interaktion und Stabilisierung von membranständigen MUC1 und dem Hormon- und HER2-Rezeptor im Tumor unterstützen. Da sowohl der Hormon- als auch der HER2-Rezeptorstatus im Tumorgewebe hinsichtlich der Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms eine zentrale Rolle spielen und wesentlich prognosebestimmend sind, lässt sich auf Grundlage dieser Korrelationen auch für MUC1 und TA-MUC1 ein prognostischer Einfluss vermuten.

5.5 Korrelation der MUC1-Expression mit klinisch histopathologischen Daten

Vergleich der Korrelationen von MUC1 und TA-MUC1 - Eine cytoplasmatische Expression von MUC1 im Tumorgewebe korreliert mit weniger aggressiven Tumoreigenschaften

In den Korrelationsanalysen konnten für die subzelluläre Verteilung von MUC1 signifikante Zusammenhänge zu histopathologischen Tumoreigenschaften des Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Tumoren mit einer ausschließlich cytoplasmatischen MUC1-Expression wiesen weniger häufig einen positiven Lymphknotenbefall auf ($p = 0,037$) und waren seltener gering differenzierten G3-Tumoren zuzuordnen ($p = 0,018$). Ebenso war eine cytoplasmatische MUC1-Lokalisation signifikant häufiger mit einem kleinen Tumorstadium assoziiert ($p = 0,008$). Demgegenüber konnte in gut differenzierten Tumoren (G1) keine Expression von MUC1 in membranös-cytoplasmatischer Lokalisation (mc) nachgewiesen werden. Tumoren mit muzinöser Tumorhistologie, die grundsätzlich mit einer langsameren Wachstumsrate und besseren Prognose assoziiert sind (22, 156, 157), wiesen signifikant seltener eine gemischte cytoplasmatisch-membranöse MUC1-Lokalisation (cm) auf ($p = 0,039$) und zeigten am häufigsten eine rein cytoplasmatische MUC1-Lokalisation.

Für das Tumorepitop TA-MUC1 zeigten Tumoren mit cytoplasmatischer Expression ebenfalls signifikant seltener einen positiven Lymphknotenbefall. Wie für MUC1 wiesen muzinöse Tumoren zudem seltener eine cytoplasmatisch-membranöse-TA-MUC1-Lokalisation auf und wurden am häufigsten rein cytoplasmatisch exprimiert (1).

Die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen fielen bezüglich der Korrelationsanalysen zwischen histopathologischen Tumoreigenschaften und der Mucin1-Expression im Mammakarzinom sehr heterogen aus. Heublein et al. konnten anhand des Glykopeptidantikörpers PankoMab, anders als in dieser Arbeit, eine signifikant vermehrte membranöse TA-MUC1-Expression in kleinen Tumorstadien sowie in Tumoren ohne Lymphknotenbefall nachweisen. Das Fehlen einer TA-MUC1-Expression hingegen korrelierte mit aggressiveren Tumoreigenschaften, wie einem positiven LK-Befall und einer größeren Tumorausdehnung (144). Auch Van der Vegt et al. konnten für Mucin1, nachgewiesen durch den Peptidantikörper 214D4, in invasiv duktalem Tumoren einen Zusammenhang zwischen einer apikalen Mucin1-Expression mit einer kleineren Tumorgröße und einem besseren Differenzierungsgrad nachweisen (107). Andere Vergleichsarbeiten konnten keinen Zusammenhang zwischen subzellulärer Lokalisation und Tumoreigenschaften des Mammakarzinoms herstellen (106, 158).

Neben den immunhistochemischen Vergleichsarbeiten konnte am Tiermodell durch Hemmung der Mucin1-Expression anhand von Mucin1-Knock-out-Mäusen eine verzögerte Tumorentwicklung nachgewiesen werden (159, 160). Ebenso konnte anhand der *in vitro*-Studie von Yuan et al. durch vollständige Suppression von Mucin1 eine verringerte Migrationsrate von Tumorzellen beobachtet werden (161).

Der sich hieraus ableitenden Beteiligung von Mucin1 am Tumorprogress und Metastasierung liegen unter anderem Interaktionen zwischen Mucin1 und Strukturproteinen sowie Transkriptionsfaktoren auf zellulärer Ebene zugrunde. Diese Interaktionen führen zu einer Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden. Vor allem die Mucin1-C Untereinheit weist mehrere Bindungsstellen auf (98, 104) und führt zu einer gestörten Initiation des β -Catenin/E-Cadherin-Komplexes, was eine verminderte Ausbildung von *Adherens junctions* und die Auflösung von Zellverbänden mit einer daraus resultierenden gestörten Zellfunktion zur Folge hat (99, 106, 161, 162). Ebenso ist Mucin1 in der Lage den Wachstumsfaktor HER2 zu aktivieren (154) und kann darüber hinaus eine Aggregation von PAR6 und PAR3, die für die Ausbildung von sog. *Tight Junctions* verantwortlich sind, verhindern (102, 163). Ein Verlust von *Tight Junctions* führt wiederum zu einer Umverteilung von Rezeptoren und einem gleichzeitigen Verlust der Zellpolarität, was in weiterer Konsequenz die vereinfachte Loslösung von Tumorzellen aus der Verankerung der Basalmembran bedingt und damit

Metastasierungsprozesse fördert. Neben diesen antiadhäsiven Eigenschaften weist das verändert glykosylierte Mucin1 auf seiner extrazellulären Domäne eine Bindungsstelle für das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 auf, durch dessen Interaktion eine Adhäsion und Migration zirkulierender Tumorzellen am Endothel von Lymph- und Blutstrombahn in das Gewebe ermöglicht wird (164). Es zeigt sich, dass Mucin1 sowohl an der Abkopplung und der Loslösung aus dem Zellverbund als auch der Adhäsion in tumorfernen Geweben beteiligt ist.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Korrelation einer überwiegend cytoplasmatischen Expression von MUC1 und TA-MUC1 in lymphknotennegativen Tumoren spricht für eine fehlende Interaktion der an Metastasierungsprozessen beteiligten Strukturproteinen, wie β -Catenin. Dies könnte in einer mangelnden Funktionsfähigkeit des hier nachgewiesenen cytoplasmatisch exprimierten Mucin1 begründet sein. Vor dem Hintergrund, dass der hier erfolgte Nachweis nur das auf der MUC1-N Untereinheit gelegene Epitop MUC1 identifiziert, können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob Mucin1 im Cytoplasma als dimeres funktionsfähiges Glykoprotein vorliegt oder lediglich als monomeres Glykopeptid in Form von Mucin1-N. Des Weiteren scheint eine fehlende Interaktion zwischen cytoplasmatisch exprimiertem MUC1 und dem Oberflächenmolekül I-CAM-1 aufgrund der räumlichen Distanz eine nachvollziehbare Erklärung für die beobachteten Effekte zu sein.

Mit dem Grading werden morphologische Abweichungen zum Ursprungsgewebe beschrieben. Im Zuge der Tumorprogression gehen typische Zelleigenschaften verloren. Die Teilungsrate nimmt zu und Oberflächenstrukturen können verloren gehen. In Bezug zu Mucin1 und dem Gradingstadium zeigten die zum Vergleich dienenden Studien ebenso wie die vorliegende Arbeit eine hohe Gesamtexpression in gut differenzierten Tumoren und eine Abnahme in entdifferenzierten Tumoren (147, 165-167). Darüber hinaus wiesen einzelne Autoren die subzelluläre Expression von Mucin1 in apikal bzw. membrangebundener Expression mit einem besseren Differenzierungsstadium nach (147, 167). Dies steht im Kontrast zu der mit VU4H5 nachgewiesenen cytoplasmatischen MUC1-Expression in besser differenzierten Tumoren. Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass es mit zunehmender Entdifferenzierung des Gewebes nicht zu einem gänzlichen Verlust des Oberflächenproteins Mucin1, jedoch zu einer Umstrukturierung einzelner Epitope von Mucin1 kommt. Dies führt zu veränderten Expressionsprofilen und somit Sublokalisationen von Mucin1 im Tumorgewebe.

Zusammenfassend kann Mucin1 als multifunktionales Glykoprotein eine zentrale Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung zugesprochen werden. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen für die Mucin1-Tumorepitope MUC1 und TA-MUC1 im Brustkrebsgewebe wider. Wie bereits dargestellt unterscheiden sich diese jedoch von den Korrelationen zwischen

Mucin-1 und der Histopathologie in der Literatur, was sich auf das unterschiedliche Verhalten verschiedener Mucin1-Epitope im Mammakarzinom zurückführen lässt. Für MUC1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine rein cytoplasmatische MUC1-Expression mit einer insgesamt weniger aggressiveren Tumorbilologie einhergeht, was sich durch die zuvor beschriebenen biochemischen Eigenschaften sowie die fehlende Interaktion von cytoplasmatischem MUC1 im Tumorgewebe erklären lässt.

5.6 Einfluss von MUC1 und TA-MUC1 auf die Prognose von Brustkrebspatientinnen

Nachdem zuvor bereits ein Bezug zwischen selektiven Tumoreigenschaften des Mammakarzinoms und den Epitopen MUC1 und TA-MUC1 hergestellt wurde, ließ sich zudem ein signifikanter prognostischer Einfluss der beiden Mucin-1-Epitope auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen nachweisen. Erneut wurde hierbei sowohl in Gesamtexpression als auch in subzellulärer Expression der Epitope im Tumorgewebe unterschieden.

In Bezug auf die Gesamtexpression von MUC1 zeigte sich in den Überlebenszeitanalysen kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben (OVS), das metastasenfreie (MFS) oder das krankheitsfreie Überleben (DFS). In Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation erwies sich MUC1 als unabhängiger Prognostikator für das DFS. Eine membranständig-betonte (mc) MUC1-Lokalisation war mit einem signifikant erhöhten Fernmetastasen- und Rezidiv-Risiko behaftet (HR: 4,56, 95 %-KI 1,03-20,26, $p = 0,046$). Zudem wiesen Patientinnen mit einer membranös-cytoplasmatischen Lokalisation (mc) einen signifikant schlechteren Verlauf in den Überlebenszeitkurven im DFS auf ($p = 0,040$). In Bezug auf das OVS war eine cytoplasmatische-membranöse Expression im Vergleich zu den übrigen Expressionsmustern mit annähernder Signifikanz mit einem schlechteren Verlauf assoziiert ($p = 0,058$).

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung ließen sich in der Vergleichsarbeit für TA-MUC1 ebenfalls signifikante Einflüsse nachweisen. Beispielsweise war eine hohe membranös-cytoplasmatische TA-MUC1-Expression, gegensätzlich zur MUC1-Expression, mit einem signifikant besserem Gesamtüberleben assoziiert. Tumoren mit cytoplasmatischer TA-MUC1-Expression hingegen zeigten ein signifikant erhöhtes Fernmetastasenrisiko (1).

Bei Betrachtung weiterer Vergleichsarbeiten zeigten sich hinsichtlich der prognostischen Relevanz von Mucin1 im Mammakarzinom sehr unterschiedliche Ergebnisse. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zu TA-MUC1 (1), konnten mehrere Studien einen signifikanten Zusammenhang einer hohen apikalen bzw. membranösen Mucin1-Expression

im Tumorgewebe mit einem besseren OVS und DFS nachweisen (129, 144, 168) und cytoplasmatische Mucin1-Expressionen mit einem schlechteren Gesamtüberleben in Zusammenhang bringen (108, 169).

Ellis et al. konnten in mehreren Arbeiten, mittels des Mucin1-Antikörpers NCRC11, einen signifikanten Einfluss auf die Prognose von Brustkrebspatientinnen nachweisen. Dabei zeigte sich in besser differenzierten Tumoren eine signifikant erhöhte Mucin1-Gesamtexpression. Dies spiegelte sich auch in den Überlebenszeitkurven wider, die bei hoher Gesamtexpression von Mucin1 einen besseres Gesamtüberleben aufwiesen (165). In Einklang dazu konnte in mehreren Studien eine schlechtere Gesamt-Überlebensprognose bei völliger Abwesenheit einer Mucin1-Expression im Tumor nachgewiesen werden (107, 144). Gegensätzlich dazu zeigte sich die Arbeit von McGuckin, in der ebenfalls die Gesamt-Mucin1-Expression im Mammakarzinom in einem großen, heterogenen Tumorkollektiv untersucht wurde. Eine hohe Mucin1-Expression war assoziiert mit einem positiven Lymphknotenbefall sowie einem positivem Hormonrezeptorstatus im Tumorgewebe. Eine hohe Mucin1-Gesamtexpression ging in Übereinstimmung hierzu mit einem schlechteren DFS und OVS einher (108).

Trotz der deutlich werdenden Diskrepanz zu anderen Mucin1-Studien zeigten sich die in dieser Arbeit nachgewiesenen Korrelationsanalysen von MUC1 mit den histopathologischen Tumoreigenschaften kongruent zur prognostischen Bedeutung von MUC1. Tumoren mit membranös-cytoplasmatischer MUC1-Expression und Tumoren mit hoher MUC1-Gesamtexpression wiesen eine positive Korrelation zur HER2-Expression auf, was mit einer aggressiveren Tumorbilogie und höheren Rezidivrate assoziiert ist. Ebenso wiesen Tumoren mit geringerer Zelldifferenzierung vermehrt eine membranständige MUC1-Expression auf. Die nachgewiesene schlechtere Prognose in Bezug auf das Fernmetastasen- und Rezidivrisiko (DFS) von Patientinnen mit überwiegend membranständiger MUC1-Expression (mc) steht hiermit im Einklang.

Für die prognostische Bedeutung der TA-MUC1-Expression zeigten sich im Vergleich zu MUC1 trotz des gleichen Studiendesigns und Tumorkollektivs gegensätzliche Ergebnisse. Die bereits zuvor aufgestellte Hypothese, dass TA-MUC1 im Vergleich zu MUC1 auch bei einem höherem Glykosylierungsgrad von Mucin1 auf der Membran exprimiert vorliegt und damit eher einem physiologischen Zustand der Zelle entspricht, steht im Einklang mit dem nachgewiesenen signifikant besseren krankheitsfreien Überleben für Patientinnen mit einer hohen überwiegend membranständigen TA-MUC1-Expression (1).

Die Bedeutung der verschiedenen subzellulären Expressionsformen von Mucin1 im Tumorgewebe sind noch nicht abschließend untersucht. Doch wird im allgemeinen Konsens

eine membrangebundene Expression im Tumorgewebe der physiologischen apikalen Mucin1-Expression im gesunden Gewebe gleichgesetzt und als eine weitestgehende Aufrechterhaltung der Zellfunktion interpretiert, woraus eine bessere Prognose resultiert. Umgekehrt spiegelt eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation einen Verlust der Zellpolarität wider und geht mit einem schlechteren klinischen Verlauf einher (102, 129, 147). Im Vergleich der beiden Epitope MUC1 und TA-MUC1 ließen sich diese Zusammenhänge lediglich für TA-MUC1 feststellen, was schlussfolgern lässt, dass die beiden Epitope MUC1 und TA-MUC1 hinsichtlich ihrer prognostischen Aussage wesentlich voneinander abweichen und unterschiedlich geeignet sind.

Parham et al. stellte die übergeordnete These auf, dass für die zahlreichen Ergebnisabweichungen verschiedener Arbeiten, das jeweilige Zielantigen von Mucin1 verantwortlich ist. Demnach existieren Epitope, die anfälliger für die unterschiedlichen Bedingungen während der Tumorgenese sind und häufig bereits im frühen Stadium nicht mehr apikal exprimiert vorliegen (167). Folglich können verschiedene Mucin1-Epitope als unterschiedliche prognostische Indikatoren dienen.

Das hier untersuchte MUC1-Epitop, das vorwiegend bei zunehmender Hypoglykosylierung zugänglicher wird, stellt in diesem Zusammenhang einen Indikator für ein fortgeschrittenes Tumorstadium dar, was im Einklang mit den nachgewiesenen Korrelationen zwischen einer apikalen/membranösen Expression und einer schlechteren Prognose steht.

Für TA-MUC1 hingegen, das durch ein spezifisches Glykosylierungsmuster geprägt ist, welches bereits in früheren Tumorstadien exprimiert wird, spricht der hohe Anteil von membrangebundenen TA-MUC1 für einen überwiegenden Erhalt der Zellfunktion und war folglich mit einer besseren Prognose assoziiert (1). Die nachgewiesenen Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung von MUC1 und TA-MUC1 in dieser Vergleichsarbeit stehen demnach nicht im Widerspruch zueinander, sondern spiegeln lediglich die Eigenschaften der einzelnen Epitope von Mucin1 wider.

Einschränkungen

Darüber hinaus sollten jedoch noch weitere Einflussfaktoren, die zu der Heterogenität der Vergleichsarbeiten zur Mucin1-Expression im Brustkrebs geführt haben, in Betracht gezogen werden. Hierbei fallen vor allem Unterschiede in der Auswahl der histologischen Subtypen auf. Während einige Autoren alle Tumorentitäten des Mammakarzinoms untersuchten (108, 129, 165), beschränkten sich andere lediglich auf histologische Subgruppen, wie bspw. das am häufigsten repräsentierte NST (107), oder besonders kleinen Untergruppen, wie das triple-negative Mammakarzinom. Dies kann folglich zu einer Verschiebung von Signifikanzen führen.

Im Gegensatz zu bereits etablierten prognostischen Einflussgrößen des Mammakarzinoms, wie die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus, Grading und HER2-Status, werden aktuell zur Beurteilung der immunhistochemisch nachgewiesenen Mucin1-Expression keine einheitlich standardisierten Scoringsysteme verwendet. Während in dieser und weiteren Arbeiten eine Anlehnung an den Immunreaktivitätsscore (IRS) nach Remmele et al. erfolgte (129, 137, 144), der die Färbeintensität sowie den Anteil positiv gefärbter Tumorzellen auswertete, bezogen andere Arbeiten lediglich den prozentual gefärbten Anteil an Tumorzellen zur Auswertung ein und schlossen hieraus auf eine hohe/niedrige Intensität (108, 165). Eine Besonderheit lag in der Festlegung eines Grenzwertes zur Beurteilung positiv gewerteter Expressionen. In Anlehnung an bereits publizierte Daten zum IRS und Mucin1 (144), erfolgte in dieser Arbeit und der Arbeit von Herrn Dr. Fries (1) für membrangebundene (mc, cm, m) MUC1-Expressionen eine positive Wertung ab einem IRS > 2. Für rein cytoplasmatische MUC1-Expressionen, die im Allgemeinen eine schwächere Färbung aufwiesen, wurde ein IRS > 0 als positiv gewertet. Demgegenüber wurde in weiteren Studienarbeiten (108, 147, 170) jegliche Mucin1-Färbung als positiv gewertet, die folglich zu einer quantitativen Verschiebung der Expressionen im Vergleich führen. Darüber hinaus finden sich in Bezug zur Gruppierung der subzellulären Mucin1-Expression deutliche Kontraste. Eine Einteilung erfolgt auch hier bisher ausschließlich nach individuellen Auswertungskriterien, die eine Vielzahl an Sublokalisationen hervorbrachte und eine Vergleichbarkeit erschwert.

6 Fazit und Ausblick

In der Gegenüberstellung der beiden Mucin1-Epitope MUC1 und TA-MUC1 konnten wesentliche Unterschiede im subzellulären Expressionsmuster und der Gesamtexpression sowie in den jeweiligen Korrelationen mit Tumoreigenschaften und der Prognose im Mammakarzinom dargestellt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass sich neben MUC1 und TA-MUC1 bereits mehrere Mucin1-Epitope als unabhängige Prognostikoren im Mammakarzinom bewiesen haben, diese sich in ihrer prognostischen Bedeutung jedoch unterscheiden, wäre eine parallele Bestimmung verschiedener Mucin1-Epitope gegenüber dem Einzelnachweis in Tumorproben sinnvoll. Denkbar wäre bspw. eine Unterteilung der verschiedenen Mucin1-Epitope in *high-* und *low-risk* Epitope und eine Etablierung dieser Klassifikation zur klinischen Beurteilung bzw. als Prognostikator. Eine Zusammenfassung der aktuellen Ergebnislage immunhistochemischer Vergleichsarbeiten über die Bedeutung von Mucin1 wird unter anderem durch uneinheitliche Beurteilungskriterien hinsichtlich der Mucin1-Expression im Tumorgewebe eingeschränkt. Ein erster Schritt für eine adäquate Vergleichbarkeit, wäre folglich die Etablierung standardisierter Auswertungskriterien unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Gesamtexpression und der subzellulären Expression, wie sie bereits für weitere Tumormarker des Mammakarzinoms im Einsatz sind. Darüber hinaus wäre eine große Vergleichsarbeit mit den verschiedenen Mucin1-Epitopen, einschließlich MUC1 und TA-MUC1, hinsichtlich ihrer Bedeutung im Mammakarzinom von besonderem Interesse.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Tumorspezifität von Mucin1 einzelnen Tumorepitopen vorbehalten ist. So erwies sich lediglich das Glykopeptidepitop TA-MUC1 im Vergleich mit dem Peptidepitop MUC1 als tumorspezifisch. Es stellt sich die Frage, ob diese Tumorspezifität generell auf Glykopeptidepitope übertragbar ist, die wie das TA-MUC1, aus einer Core1-Struktur hervorgehen. Dies könnte richtungsgebend sein für die Auswahl geeigneter Mucin1-Epitope zur Entwicklung weiterer Mucin1-Antikörper. Vor dem Hintergrund, dass die Tumorspezifität der beiden Epitope nicht die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, wären weitere Immunhistochemische-Färbungen mit MUC1 und TA-MUC1 an einem größeren Kollektiv gesunder Brustgewebeproben und unter Einbeziehung weiterer Epithelien anzustreben. Welche zukünftige Rolle einzelne Mucin1-Epitope bei vorhandener Tumorspezifität in der *Target-* und Immuntherapie spielen können, zeigen bereits erste klinische Studien unter Verwendung des tumorspezifischen Antikörpers GGSK-1/30.

Im Rahmen einer zunehmenden Entwicklung von Resistenzen gegenüber medikamentösen Krebstherapien des Mammakarzinoms konnten in ersten Studien ein Zusammenhang

zwischen einer Überexpression von Mucin1 und Chemo-Resistenzen in HER2- und/oder Hormonrezeptor-positiven Mammatumoren nachgewiesen werden. Die selektive Hemmung von Mucin1 im Tumorgewebe führte wiederum zur Wiedererlangung des vollen Wirkspektrums der medikamentösen Standardtherapien und konnte darüber hinaus präexistente medikamentöse Resistenzen aufheben (155, 151). Für beide Mucin1-Epitope, MUC1 und TA-MUC1, konnten in dieser Arbeit signifikante Korrelationen zum HER2- und Hormonrezeptorstatus im Mammakarzinom nachgewiesen werden, sodass eine selektive Ansteuerung/ Hemmung von MUC1 und TA-MUC1 ähnliche Effekte hinsichtlich des therapeutischen Einflusses zeigen könnten. Auf Grund der hier nachgewiesenen ausschließlich für TA-MUC1 vorliegenden Tumorspezifität, und einem damit verbundenen potenziell günstigeren Nebenwirkungsprofil sollte sich TA-MUC1 hierbei gegenüber MUC1 überlegen zeigen.

7 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Tumorerkrankung der Frau dar. Die Identifizierung einzelner Tumorantigene konnte die bisherige multimodale Therapiestrategie im Brustkrebs (Operation, Bestrahlung und Chemotherapie) durch individualisierte *Target*-Therapien erweitern und so die Prognose von Brustkrebspatientinnen deutlich verbessern. Ein vielversprechendes Zielantigen für die gezielte Brustkrebstherapie stellt das Transmembranprotein Mucin1 dar. Es ist geprägt durch eine außerordentlich hohe Expression im Mammakarzinom in bis zu 90% und weist zudem tumorspezifische Veränderungen im Glykosylierungsmuster auf. Interessant ist dabei die Tatsache, dass Mucin1 kein einzelnes Epitop darstellt, sondern eine Vielzahl verschiedener Epitope aufweist.

Anhand eines Brustkrebskollektivs von 234 Patientinnen erfolgte in dieser Arbeit die Gegenüberstellung der Expression der beiden Mucin1-Epitope MUC1 und TA-MUC1. Die Expression wurde durch ein immunhistochemisches Färbeverfahren mittels der beiden Antikörper VU4H5 und GSK-1/30 bestimmt. MUC1 und TA-MUC1 unterscheiden sich in ihrem molekularen Aufbau und ihrer Lokalisation auf dem Mucin1-Molekül. MUC1 ist ein Peptidantigen, das durch eine definierte Peptidsequenz auf der VNTR-Region der Mucin1-N-Untereinheit repräsentiert wird, während TA-MUC1 ein Glykopeptid-Epitop darstellt, welches durch eine spezifische Glykosylierung an einer weiteren Peptidsequenz ebenfalls auf der VNTR-Region gebunden vorliegt.

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob diese Unterschiede der beiden Mucin1-Epitope einen wesentlichen Einfluss auf die Nachweismöglichkeit im Brustkrebsgewebe sowie auf die prognostische Bedeutung und somit auf den potenziellen Nutzen der beiden Antikörper VU4H5 und GSK-1/30 für die Tumorthherapie hat. Dabei wurde neben der Gesamtexpression die subzelluläre Expression von MUC1 untersucht und mit den Ergebnissen zu TA-MUC1 (1) gegenübergestellt.

Für beide Mucin1-Antigene zeigte sich eine hohe Sensitivität hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Nachweismöglichkeit durch ihre jeweiligen Antikörper im Tumorgewebe. Die Expression von TA-MUC1 lag hierbei, mit einem Nachweis in 92% aller untersuchten Tumorproben, nicht nur über der Expression von MUC1, sondern übertraf auch die durchschnittliche Mucin1-Expression anderer Vergleichsarbeiten im Mammakarzinom. Darüber hinaus erwies sich MUC1 in dieser Arbeit als nicht-tumorspezifisch und zeigte eine Expression im gesunden Brustdrüsengewebe. TA-MUC1 hingegen wurde ausschließlich im Brustkrebsgewebe nachgewiesen und bewies sich damit im Gegensatz zu MUC1 als tumorspezifischer Marker des Mammakarzinoms (1).

Im Vergleich der subzellulären Verteilung ließ sich ein unterschiedliches Expressionsmuster der beiden Mucin1-Epitope im Tumorgewebe nachweisen. Dabei konnten sowohl für MUC1 als auch für TA-MUC1 damit einhergehende unabhängige Korrelationen mit Tumoreigenschaften und der Prognose von Brustkrebspatientinnen aufgezeigt werden. MUC1 und TA-MUC1 wurden in Tumoren mit weniger aggressiven Eigenschaften, wie einer kleinen Tumorgroße und einem negativen Lymphknotenstatus, häufiger rein cytoplasmatisch exprimiert. Membrangebunden korrelierte MUC1 mit dem an der Tumorprogression beteiligten HER2-Rezeptor. Darüber hinaus unterschieden sich die Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung von MUC1 und TA-MUC1 wesentlich voneinander. Ein überwiegend membranständiges Expressionsmuster von MUC1 war signifikant mit einem höheren Metastasierungs- und Rezidivrisiko assoziiert, wohingegen TA-MUC1 in überwiegend membranständiger Lokalisation mit einem signifikant besseren Überleben gekennzeichnet war. Umgekehrt zeigte sich für Patientinnen mit einer hohen cytoplasmatischen TA-MUC1-Expression eine signifikant schlechtere Prognose. Bereits vorherige Arbeiten konnten eine Diskrepanz zwischen den jeweiligen Mucin1-Expressionen und ihrer prognostischen Bedeutung mit Mammakarzinom aufzeigen. Das legt die Vermutung nahe, dass für die Betrachtung der subzellulären Lokalisation von Mucin1 das jeweils nachgewiesenen Epitop von Mucin1 im Mammakarzinom eine übergeordnete Rolle spielt.

Anhand des in dieser Arbeit erfolgten Vergleichs der beiden Mucin1-Epitope wurde die Hypothese aufgestellt, dass einzelne Mucin1-Epitope anfälliger für die unterschiedlichen Bedingungen während der Tumorgenese sind und häufig bereits im frühen Stadium nicht mehr apikal exprimiert vorliegen. Das hier untersuchte MUC1-Epitop stellte in diesem Zusammenhang einen Indikator für ein fortgeschrittenes Tumorstadium dar, was im Einklang mit den nachgewiesenen Korrelationen zwischen einer apikalen Expression und einer schlechteren Prognose steht. Demgegenüber konnte TA-MUC1 in überwiegend membrangebundener Form als Marker für ein frühes Tumorstadium assoziiert werden.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse die Relevanz einer differenzierten Betrachtung der einzelnen Epitope des Mucin1-Moleküls sowie die Notwendigkeit einer gemeinsamen Beurteilung der Gesamtexpression und subzellulären Lokalisation im Tumorgewebe. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stehen die individuellen Expressionsmuster verschiedener Mucin1-Epitope in unterschiedlichen Korrelationen zu Tumorcharakteristika und zur Prognose des Mammakarzinoms.

Um das Gesamt-Mucin1 als repräsentativen Marker für Tumoreigenschaften und Prognose des Mammakarzinoms nutzen zu können, erscheint die Auswahl mehrerer Mucin1-Antigene, wie die hier untersuchten Epitope MUC1 und TA-MUC1, als sinnvoll.

8 Literaturverzeichnis

1. Fries P. TA-MUC1 Expression im Tumorgewebe und Korrelation mit dem erhobenen Follow-up. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität; 2023.
2. Agency EM. Annual Report 2022- The European Medicines Agency's contribution to science, medicines and health in 2022 [PDF]. 2023 [Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2022-annual-report-european-medicines-agency_en.pdf].
3. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387-97.
4. Dieterich M, Stubert J, Reimer T, Erickson N, Berling A. Influence of lifestyle factors on breast cancer risk. *Breast Care (Basel)*. 2014;9(6):407-14.
5. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 1993;15(1):36-47.
6. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002;360(9328):187-95.
7. Kumle M, Weiderpass E, Braaten T, Persson I, Adami HO, Lund E. Use of oral contraceptives and breast cancer risk: The Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(11):1375-81.
8. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*. 1993;15(1):17-35.
9. Melchor L, Benitez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet*. 2013;132(8):845-63.
10. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, NY)*. 1994;266(5182):66-71.
11. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003;72(5):1117-30.
12. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1995;56(1):265-71.
13. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*. 2006;25(43):5906-11.
14. Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*. 2003;21(3):292-300.

15. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkas K, Roberts J, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *The New England journal of medicine*. 2014;371(6):497-506.
16. Thill M, Diedrich, K., Kreienberg, R. et al. Das nichtinvasive Karzinom in der Frauenheilkunde. *Gynäkologe* 2012;45(4).
17. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *The New England journal of medicine*. 2004;350(14):1430-41.
18. Vaidya Y, Vaidya P, Vaidya T. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. *Indian J Surg*. 2015;77(2):141-6.
19. Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn HP. [Invasive breast cancer: the current WHO classification]. *Der Pathologe*. 2014;35(1):7-17.
20. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(2):149-54.
21. AWMF AdWMF. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2018 [Langversion:[Available from: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.1/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.1.pdf].
22. Lebeau A, Kriegsmann, M., Burandt, E. et al. Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation. *Der Pathologe*. 2014.
23. Limaiem F, Ahmad F. Mucinous Breast Carcinoma. *StatPearls. Treasure Island (FL)2023*.
24. 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.
25. C. W. TNM Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-VCH, Weinheim 2017;8. Auflage.
26. Leitlinien AdWMFA-SnK. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2019.
27. Leitner SP, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ, Hutter RV. Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer*. 1995;76(11):2266-74.
28. Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie A. Guidelines Breast. 2019;Version 2019.1D.
29. 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.
30. Dubsy PC, Gnant MF, Taucher S, Roka S, Kandioler D, Pichler-Gebhard B, et al. Young age as an independent adverse prognostic factor in

[Hier eingeben]

- premenopausal patients with breast cancer. *Clinical breast cancer*. 2002;3(1):65-72.
31. Xiao T, Zhang S, Lee LE, Chao HH, van Dyck C, Li CR. Exploring Age-Related Changes in Resting State Functional Connectivity of the Amygdala: From Young to Middle Adulthood. *Front Aging Neurosci*. 2018;10:209.
32. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(1):133-40.
33. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer*. 1989;64(9):1914-21.
34. Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 1998;3(1):85-94.
35. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(1):R6.
36. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, NY)*. 1987;235(4785):177-82.
37. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy research and practice*. 2012;2012:743193.
38. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, Donadio M, Airoidi M, Pedani F, et al. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;157(2):363-71.
39. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
40. Fallahpour S, Navaneelan T, De P, Borgo A. Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ Open*. 2017;5(3):E734-E9.
41. Bundesgesundheitsministerium. Krebsfrüherkennungsuntersuchung in der gesetzlichen Krankenversicherung (§ 25 Abs. 2 SGB V) / Mammographie. 2016.
42. Aljarrah A, Miller WR. Trends in the distribution of breast cancer over time in the southeast of Scotland and review of the literature. *Ecancermedicalscience*. 2014;8:427.

43. Kösters JP GP. Regular self-examination or clinical examination for early detection of breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003.
44. Gynäkologie KMdAGkOeVidDGfr, V. uGe, sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. WJ. Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs. 2017.
45. Tabar L, Fagerberg CJ, Gad A, Baldetorp L, Holmberg LH, Grontoft O, et al. Reduction in mortality from breast cancer after mass screening with mammography. Randomised trial from the Breast Cancer Screening Working Group of the Swedish National Board of Health and Welfare. *Lancet*. 1985;1(8433):829-32.
46. Bleyer A, Welch HG. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *The New England journal of medicine*. 2012;367(21):1998-2005.
47. Göttsch PC JK. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013.
48. Phi XA, Tagliafico A, Houssami N, Greuter MJW, de Bock GH. Digital breast tomosynthesis for breast cancer screening and diagnosis in women with dense breasts - a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2018;18(1):380.
49. Kaplan SS. Clinical utility of bilateral whole-breast US in the evaluation of women with dense breast tissue. *Radiology*. 2001;221(3):641-9.
50. Leconte I, Feger C, Galant C, Berliere M, Berg BV, D'Hoore W, et al. Mammography and subsequent whole-breast sonography of nonpalpable breast cancers: the importance of radiologic breast density. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180(6):1675-9.
51. Cools-Lartigue J, Meterissian S. Accuracy of axillary ultrasound in the diagnosis of nodal metastasis in invasive breast cancer: a review. *World J Surg*. 2012;36(1):46-54.
52. Raikhlina A, Curpen B, Warner E, Betel C, Wright B, Jong R. Breast MRI as an adjunct to mammography for breast cancer screening in high-risk patients: retrospective review. *AJR Am J Roentgenol*. 2015;204(4):889-97.
53. Kuhl CK, Schrading S, Leutner CC, Morakkabati-Spitz N, Wardelmann E, Fimmers R, et al. Mammography, breast ultrasound, and magnetic resonance imaging for surveillance of women at high familial risk for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(33):8469-76.
54. Pagni P, Spunticchia F, Barberi S, Caprio G, Paglicci C. Use of Core Needle Biopsy rather than Fine-Needle Aspiration Cytology in the Diagnostic Approach of Breast Cancer. *Case Rep Oncol*. 2014;7(2):452-8.
55. Park HL, Kim LS. The current role of vacuum assisted breast biopsy system in breast disease. *J Breast Cancer*. 2011;14(1):1-7.

[Hier eingeben]

56. Bruening W, Fontanarosa J, Tipton K, Treadwell JR, Lauenders J, Schoelles K. Systematic review: comparative effectiveness of core-needle and open surgical biopsy to diagnose breast lesions. *Ann Intern Med*. 2010;152(4):238-46.
57. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(16):1233-41.
58. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(16):1227-32.
59. Bender HG, Schnurch HG, Beck L. [Breast-preserving therapy of breast carcinoma]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1988;113(41):1601-3.
60. Fajdic J, Djurovic D, Gotovac N, Hrgovic Z. Criteria and procedures for breast conserving surgery. *Acta Inform Med*. 2013;21(1):16-9.
61. Canavese G, Bruzzi P, Catturich A, Tomei D, Carli F, Garrone E, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy Versus Axillary Dissection in Node-Negative Early-Stage Breast Cancer: 15-Year Follow-Up Update of a Randomized Clinical Trial. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(8):2494-500.
62. Rubio IT, Klimberg VS. Techniques of sentinel lymph node biopsy. *Semin Surg Oncol*. 2001;20(3):214-23.
63. Bromham N S-HM, Astin M, Hasler E, Reed MW. Chirurgische Entfernung der Achsellymphknoten bei Brustkrebs [Review]. *Cochrane Database of Systematic*; 2017 [
64. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;349(6):546-53.
65. Giuliano Tosello MT, Bruna S Mota, Teresa Neeman, Rachel Riera. Breast surgery for metastatic breast cancer [Review]. *Cochrane Breast Cancer Group*; 2018 [Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD011276.pub2/full>].
66. Whelan TJ, Pignol JP, Levine MN, Julian JA, MacKenzie R, Parpia S, et al. Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;362(6):513-20.
67. Kindts I, Laenen A, Depuydt T, Weltens C. Tumour bed boost radiotherapy for women after breast-conserving surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;11:CD011987.
68. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, Struikmans H, Van den Bogaert W, Fourquet A, et al. Impact of a higher radiation dose on local control and

[Hier eingeben]

survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(22):3259-65.

69. De Felice F, Piccioli A, Musio D, Tombolini V. The role of radiation therapy in bone metastases management. *Oncotarget*. 2017;8(15):25691-9.

70. Jutzy JMS, Lemons JM, Luke JJ, Chmura SJ. The Evolution of Radiation Therapy in Metastatic Breast Cancer: From Local Therapy to Systemic Agent. *Int J Breast Cancer*. 2018;2018:4786819.

71. Zhang Z, Liu X, Chen D, Yu J. Radiotherapy combined with immunotherapy: the dawn of cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):258.

72. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012;379(9814):432-44.

73. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717.

74. Williams C, Lin CY. Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedicalsecience*. 2013;7:370.

75. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(21):2255-69.

76. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J*. 2009;15(6):593-602.

77. Cuzick J, Sestak I, Baum M, Buzdar A, Howell A, Dowsett M, et al. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(12):1135-41.

78. Untch M, Huober J, Jackisch C, Schneeweiss A, Brucker SY, Dall P, et al. Initial Treatment of Patients with Primary Breast Cancer: Evidence, Controversies, Consensus: Spectrum of Opinion of German Specialists at the 15th International St. Gallen Breast Cancer Conference (Vienna 2017). *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017;77(6):633-44.

79. Breast International Group 1-98 Collaborative G, Thurlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L, et al. A comparison of

letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(26):2747-57.

80. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet*. 2005;365(9453):60-2.

81. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(9):2639-48.

82. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *The New England journal of medicine*. 2007;357(1):39-51.

83. Carlsson J, Nordgren H, Sjostrom J, Wester K, Villman K, Bengtsson NO, et al. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br J Cancer*. 2004;90(12):2344-8.

84. Roche. Herceptin, Trastuzumab: European Medicines Agency; 2010 [updated 27.05.2019. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/herceptin#product-information-section>.

85. Petrelli F, Barni S. Meta-analysis of concomitant compared to sequential adjuvant trastuzumab in breast cancer: the sooner the better. *Med Oncol*. 2012;29(2):503-10.

86. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(16):1673-84.

87. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(2):109-19.

88. Gubin MM, Artyomov MN, Mardis ER, Schreiber RD. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3413-21.

89. Bright RK, Bright JD, Byrne JA. Overexpressed oncogenic tumor-self antigens. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3297-305.

90. Banchereau J, Palucka K. Immunotherapy: Cancer vaccines on the move. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(1):9-10.

91. Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, et al. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol*. 2011;5(2):164-82.

92. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2014-21.
93. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:607-34.
94. 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.
95. Hattstrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:431-57.
96. Levitin F, Stern O, Weiss M, Gil-Henn C, Ziv R, Prokocimer Z, et al. The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(39):33374-86.
97. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in molecular medicine.* 2014;20(6):332-42.
98. Kufe DW. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene.* 2013;32(9):1073-81.
99. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* 2001;6(3):339-53.
100. Hasan D. Diagnostic impact of CEA and CA 15-3 on chemotherapy monitoring of breast cancer patients. *J Circ Biomark.* 2022;11:57-63.
101. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest.* 2018;154(1):169-76.
102. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(12):874-85.
103. Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carothers Carraway CA. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays.* 2003;25(1):66-71.
104. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol.* 2006;16(9):467-76.
105. Gnemmi V, Bouillez A, Gaudelot K, Hemon B, Ringot B, Pottier N, et al. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/beta-catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett.* 2014;346(2):225-36.
106. Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D. Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(19):12492-4.
107. 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.

108. McGuckin MA, Walsh MD, Hohn BG, Ward BG, Wright RG. Prognostic significance of MUC1 epithelial mucin expression in breast cancer. *Human pathology*. 1995;26(4):432-9.
109. Horm TM, Schroeder JA. MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adh Migr*. 2013;7(2):187-98.
110. Pochampalli MR, el Bejjani RM, Schroeder JA. MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene*. 2007;26(12):1693-701.
111. Woo JK, Choi Y, Oh SH, Jeong JH, Choi DH, Seo HS, et al. Mucin 1 enhances the tumor angiogenic response by activation of the AKT signaling pathway. *Oncogene*. 2012;31(17):2187-98.
112. 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.
113. von Mensdorff-Pouilly S, Petrakou E, Kenemans P, van Uffelen K, Verstraeten AA, Snijdwint FG, et al. Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides. *International journal of cancer*. 2000;86(5):702-12.
114. Tarp MA, Sorensen AL, Mandel U, Paulsen H, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, et al. Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology*. 2007;17(2):197-209.
115. Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Boshell M, Gendler S, Duhig T. A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes. *International journal of cancer*. 1989;44(4):691-6.
116. Zhou D, Xu L, Huang W, Tonn T. Epitopes of MUC1 Tandem Repeats in Cancer as Revealed by Antibody Crystallography: Toward Glycopeptide Signature-Guided Therapy. *Molecules*. 2018;23(6).
117. Singh R, Bandyopadhyay D. MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2007;6(4):481-6.
118. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(18):7159-63.
119. Reddish M, MacLean GD, Koganty RR, Kan-Mitchell J, Jones V, Mitchell MS, et al. Anti-MUC1 class I restricted CTLs in metastatic breast cancer patients immunized with a synthetic MUC1 peptide. *International journal of cancer*. 1998;76(6):817-23.
120. Comsa S, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3147-54.

121. ATCC LS-. MCF7 (ATCC® HTB-22™) [Data Sheet]. [updated 30.05.2014. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx?geo_country=de#documentation.
122. Engelmann K, Shen H, Finn OJ. MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer research*. 2008;68(7):2419-26.
123. Markus Hantschke GP. *Immunhistologische Techniken*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015 [Available from: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-662-44367-5_2-1.pdf.
124. Technology CS. MUC1 (VU4H5) Mouse mAb 2015 [Available from: <https://www.cellsignal.de/products/primary-antibodies/muc1-vu4h5-mouse-mab/4538>.
125. A/S DD. Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse 2015 [4. Auflage:[Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/128486001.PDF>.
126. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
127. Darius Dian WJ, Christina Kuhn, Doris Mayr, Uwe Karsten, Ioannis Mylonas, Klaus Friese, Udo Jeschke. 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.pdf. *Karger*. 2009.
128. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5323-37.
129. 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.
130. Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J Surg Res*. 1996;63(1):298-304.
131. 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.
132. Stergiou N. Verwendung von Tumor-assoziiertem Mucin 1 zur Generierung von Anti-Tumor-Vakzinen und monoklonalen Antikörper-Derivaten als Basis für Therapie und Diagnostik von Brustkrebs. 2018;Dissertation.

[Hier eingeben]

133. Wiest I, Alexiou C, Friese K, Betz P, Tubel J, Goletz S, et al. Expression of the Tumor-associated Mucin 1 Epitope Analyzed with the Humanized PankoMab-GEX Antibody in Malignant and Normal Tissues of the Head and Neck. *Anticancer Res.* 2016;36(6):3179-84.
134. 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 biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 1998;19 Suppl 1:1-20.
135. Karsten U, Serttas N, Paulsen H, Danielczyk A, Goletz S. Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumor-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1). *Glycobiology.* 2004;14(8):681-92.
136. Ryuko K, Schol DJ, Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Poort-Keesom RJ, Karuntu-Wanamarta YA, et al. Characterization of a new MUC1 monoclonal antibody (VU-2-G7) directed to the glycosylated PDTR sequence of MUC1. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2000;21(4):197-210.
137. 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.
138. Engelstaedter V, Heublein S, Schumacher AL, Lenhard M, Engelstaedter H, Andergassen U, et al. Mucin-1 and its relation to grade, stage and survival in ovarian carcinoma patients. *BMC Cancer.* 2012;12:600.
139. Ghosh SK, Pantazopoulos P, Medarova Z, Moore A. Expression of underglycosylated MUC1 antigen in cancerous and adjacent normal breast tissues. *Clinical breast cancer.* 2013;13(2):109-18.
140. Hanisch FG, Muller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology.* 2000;10(5):439-49.
141. Movahedin M, Brooks TM, Supekar NT, Gokanapudi N, Boons GJ, Brooks CL. Glycosylation of MUC1 influences the binding of a therapeutic antibody by altering the conformational equilibrium of the antigen. *Glycobiology.* 2017;27(7):677-87.
142. Yoshimura Y, Denda-Nagai K, Takahashi Y, Nagashima I, Shimizu H, Kishimoto T, et al. Products of Chemoenzymatic Synthesis Representing MUC1 Tandem Repeat Unit with T-, ST- or STn-antigen Revealed Distinct Specificities of Anti-MUC1 Antibodies. *Sci Rep.* 2019;9(1):16641.
143. Fontenot JD, Tjandra N, Bu D, Ho C, Montelaro RC, Finn OJ. Biophysical characterization of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core. *Cancer research.* 1993;53(22):5386-94.

144. 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. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR. 2015;34:50.
145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. Wei X, Xu H, Kufe D. MUC1 oncoprotein stabilizes and activates estrogen receptor alpha. *Mol Cell*. 2006;21(2):295-305.
149. Li Y, Wang JP, Santen RJ, Kim TH, Park H, Fan P, et al. Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. *Endocrinology*. 2010;151(11):5146-56.
150. Saha Roy S, Vadlamudi RK. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis. *Int J Breast Cancer*. 2012;2012:654698.
151. Merikhian P, Ghadirian R, Farahmand L, Mansouri S, Majidzadeh AK. MUC1 induces tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2017;17(7):607-13.
152. Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:67-72.
153. Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, et al. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(38):35239-42.
154. Pang Z, Dong X, Deng H, Wang C, Liao X, Liao C, et al. MUC1 triggers lineage plasticity of Her2 positive mammary tumors. *Oncogene*. 2022;41(22):3064-78.
155. Hosseinzadeh A, Merikhian P, Naseri N, Eisavand MR, Farahmand L. MUC1 is a potential target to overcome trastuzumab resistance in breast cancer therapy. *Cancer Cell Int*. 2022;22(1):110.
156. Toikkanen S, Kujari H. Pure and mixed mucinous carcinomas of the breast: a clinicopathologic analysis of 61 cases with long-term follow-up. *Human pathology*. 1989;20(8):758-64.
157. Komenaka IK, El-Tamer MB, Troxel A, Hamele-Bena D, Joseph KA, Horowitz E, et al. Pure mucinous carcinoma of the breast. *Am J Surg*. 2004;187(4):528-32.

[Hier eingeben]

158. 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.
159. Schroeder JA, Adriance MC, Thompson MC, Camenisch TD, Gendler SJ. MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion. *Oncogene*. 2003;22(9):1324-32.
160. Spicer AP, Rowse GJ, Lidner TK, Gendler SJ. Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(50):30093-101.
161. Yuan Z, Wong S, Borrelli A, Chung MA. Down-regulation of MUC1 in cancer cells inhibits cell migration by promoting E-cadherin/catenin complex formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362(3):740-6.
162. Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, Hiwada K. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Cancer research*. 1998;58(9):2014-9.
163. Aranda V, Haire T, Nolan ME, Calarco JP, Rosenberg AZ, Fawcett JP, et al. Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol*. 2006;8(11):1235-45.
164. Hayashi T, Takahashi T, Motoya S, Ishida T, Itoh F, Adachi M, et al. MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion*. 2001;63 Suppl 1:87-92.
165. 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.
166. Lundy J, Thor A, Maenza R, Schlom J, Forouhar F, Testa M, et al. Monoclonal antibody DF3 correlates with tumor differentiation and hormone receptor status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 1985;5(3):269-76.
167. Parham DM, Coghil G, Robertson AJ. Critical evaluation of monoclonal antibody staining in breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 1989;42(8):810-3.
168. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1991;9(7):1113-23.
169. 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. *International journal of cancer*. 1992;51(3):343-54.

170. 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. *International journal of cancer*. 1984;33(3):299-304.

[Hier eingeben]

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter [REDACTED] und meiner Betreuerin [REDACTED]. Vielen Dank für die Möglichkeit, an einem so interessanten Thema arbeiten zu dürfen. Ich habe eure Unterstützung, konstruktive Kritik und das entgegengebrachte Vertrauen sehr geschätzt. Ebenso danke ich [REDACTED] [REDACTED] für die geduldige und herzliche Einarbeitung in das Laborleben.

Bedanken möchte ich mich auch bei [REDACTED] für die fachliche Unterstützung zur Auswertung der Immunhistochemie sowie bei [REDACTED] für die Betreuung in statistischen Fragen.

Außerdem möchte ich [REDACTED] danken, für das kritische Korrekturlesen meiner Dissertation.

Abschließend möchte ich meinem Ehemann und besten Laborpartner [REDACTED] danken. Danke, dass du durchgängig an meiner Seite warst und mir die nötige Motivation und den Freiraum gegeben hast, den es brauchte. Deine bedingungslose Unterstützung trug wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit bei.

[Hier eingeben]