

Die prognostische Bedeutung der CD44 - Isoformen beim invasiven
Mammakarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Luig, Henrike
aus Dortmund

Gießen 2004

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof.Dr.A.Schulz
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz
Gutachter: PD Dr. K. Münstedt

Tag der Disputation: 22.03.05

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klinik des Mammakarzinoms	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Stadien	2
1.1.4 Prognose und klinisch relevante prognostische Faktoren	3
1.2 Pathologie des Mammakarzinoms	4
1.2.1 Klassifikation, Grading und pTNM	4
1.2.2 Histomorphologie	6
1.2.3 Immunhistologie	7
1.2.4 Pathologisch relevante prognostische Faktoren	8
1.3 Zelladhäsion in der Tumorpathologie	9
1.3.1 Adhäsionsmoleküle	9
1.3.2 Metastasierung und Zelladhäsion	11
1.3.3 CD44 - molekulare Grundlagen	12
1.3.4 CD44 - topographische Verteilung und Embryologie	16
1.3.5 CD44 - physiologische Funktion	18
1.3.6 CD44 - Bedeutung in der Tumorbiologie	18
1.3.7 CD44 - Bedeutung beim Mammakarzinom	19
2. Problemstellung	20
2.1 Proliferationsmarker MIB1, Östrogen- und Progesteronrezeptor beim Mammakarzinom	20
2.2 CD 44-Isoformen beim Mammakarzinom	20
2.3 CD 44, Antikörper und Paraffinmaterial	21
2.4 CD 44, prognostische Faktoren und klinischer Verlauf	21

3. Material und Methode	22
3.1 Patientenauswahl	22
3.2 Tumormaterial	22
3.3 Präparate	22
3.4 HE-, PAS-, Alcian- Färbung	22
3.5 Klassifikation und Grading der Tumoren	23
3.6 Immunhistochemische Färbungen	24
3.6.1 Vorbehandlung der Präparate	24
3.6.2 Methoden	25
3.6.2.1 Antikörper	25
3.6.2.2 APAAP- Methode	26
3.6.2.3 DAB – Methode	27
3.6.3 Gegenfärbung und Eindecken	27
3.7 Datenevaluation	28
3.7.1 Ermittlung des immunreaktiven Scores (IRS) von Östrogen- und Progesteronrezeptoren	28
3.7.2 Beurteilung von MIB1	28
3.7.3 Beurteilung der CD44 - Reaktion	28
3.7.4 Statistische Analyse	29
4. Ergebnisse	30
4.1 Deskription des Mammakarzinomkollektivs	30
4.1.1 Allgemeine Klassifikation, Grading und pTNM	30
4.1.2 Spezielle Histomorphologie	32
4.1.3 Korrelationen mit prognostischen Faktoren	34
4.1.4 Korrelationen mit Überlebensfunktionen	34
4.2 Proliferationsmarker MIB1, Östrogen - und Progesteronrezeptor	35
4.2.1 MIB1	35
4.2.2 Östrogen - und Progesteronrezeptor	36
4.3 CD44 - Isoformen	36

4.3.1 Standardform CD44s	39
4.3.2 Variante Formen CD44- v	39
4.3.2.1 CD44v3	39
4.3.2.2 CD44v5	40
4.3.2.3 CD44v6	41
4.3.2.4 CD44v9	41
4.4 Multifaktorielle Analysen	43
4.4.1 Korrelation von CD44 - Isoformen im inva- siven Primärtumor zu prognostischen Faktoren	44
4.4.2 Korrelation von CD44 in LK – Metastasen zu prognostischen Faktoren	45
5. Diskussion	48
6. Zusammenfassung	53
7. Abstract	55
8. Literaturverzeichnis	57
9. Anhang	75
9.1 Reagenzien	75
9.2 Puffer	76

1. Einleitung

1.1 Klinik des Mammakarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist in den letzten Jahren zum häufigsten Organkarzinom der Frau nicht nur in der Bundesrepublik,¹³⁶ sondern auch in der gesamten westlichen Hemisphäre geworden, wobei unser Kulturkreis im Vergleich zu nicht Erst-Welt-Ländern einer seit ca. 20 Jahren steigenden Inzidenz unterliegt.^{34,88} In Deutschland erkranken jährlich ca. 46.000 Frauen neu an Brustkrebs.

Also muss zur Zeit etwa jede 12. Frau in der Bundesrepublik im Laufe ihres Lebens damit rechnen, an Brustkrebs zu erkranken und damit durchschnittlich 6 Jahre ihrer ausstehenden Lebenserwartung zu verlieren. Diese Erkrankung verursacht durch krankheitsbedingten Arbeitsausfall und Kosten der Diagnostik und Therapie eine nicht zu unterschätzende ökonomische Belastung.

Abgesehen von den finanziellen Auswirkungen auf die Gesellschaft besteht eine psychische Belastung der Betroffenen, da die Diagnose „Krebs“ eine Lebenskrise, die mit starken Ängsten und für manche Patientinnen mit einer Todesbedrohung verbunden ist, hervorruft.¹⁵⁷

Hieraus erklärt sich die Dringlichkeit, mit der nach verbesserten diagnostischen und therapeutischen Werkzeugen gesucht wird.

1.1.2 Ätiologie

Während die genauen Ursachen für die Entstehung des Mammakarzinoms noch unbekannt sind, sind einige prädisponierende Faktoren inzwischen genauer untersucht. Zu diesen Faktoren gehört unter anderem die genetische Disposition. Haben Verwandte ersten Grades bereits ein Karzinom entwickelt, so liegt das Risiko der nachfolgenden Generation, an Brustkrebs zu erkranken, zwei bis neun mal höher.⁶⁵ Auch wenn männliche Verwandte ersten Grades an Brustkrebs erkrankt sind, ist das Risiko am Mammakarzinom zu erkranken gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht.¹²² Dies mag daran liegen, dass innerhalb der so belasteten Familien häufig Veränderungen des Chromosoms 17 vorliegen und vererbt werden.⁶² Harada et al. konnten eine Beziehung zwischen Mutationen der Genloci 17q21 bzw. 17p13 und niedriger Tumordifferenzierung nachweisen.^{63,89,117} Aber auch Veränderungen der Chromosome 1 und 6 wurden, wenn auch in einer geringeren Häufung, als ursächlich für die Entstehung des Brustkrebs erkannt.¹⁰⁵

Weiterhin wurden ionisierende Strahlung und die Ansammlung kanzerogener Stoffe im mam-mären Fettgewebe als disponierende Faktoren beschrieben.^{73,97}

Das Erkrankungsrisiko ist jedoch auch bei vermehrter Östrogenpräsenz erhöht, gleichgültig, ob die Östrogene endogen entstehen oder durch Kontrazeptiva künstlich zugeführt werden. Also steigt das Erkrankungsrisiko bei früher Menarche (unter 12. Lebensjahr) und spät beginnender Menopause.^{5,52,66}

Dagegen scheint frühes Gebären ein protektiver Faktor zu sein, da Nullipara und Spätgebären-de (nach dem 30. Lebensjahr) häufiger von diesem Karzinom heimgesucht werden.⁸⁹ Ange-nommen wird eine über Induktion wachstumsregulatorischer Gene verstärkte Zellproliferation, die dann außer Kontrolle gerät. Damit beginnt Brustkrebs östrogenabhängig und endet in ei-nem östrogenunabhängigen Status.³⁸ Hyperkalorische Ernährung, insbesondere hoher Fettkon-sum, ist ein weiterer disponierende Faktor.⁷³

1.1.3 Stadien

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach UICC (Unio internationale contra cancerum)¹⁶⁸ und baut auf der TNM - Klassifikation auf. Diese gibt Auskunft über Tumorgro-ße, assoziierte Lymphknoten und etwaige Fernmetastasen.

Tab.1 Stadieneinteilung nach UICC (5. Auflage,1997)

Stadium 0	Carcinoma in situ
Stadium I	T1a, N0 oder N1a; T1b, N0 oder N1aM0
Stadium II	T0, N1b; T1b, N1b; T2a, N0 oder N1a; T2a, N1b; T2b, N1b
Stadium III	jeder T3 mit N; jeder T4 mit NM0; jeder T mit N2 oder N3
Stadium IV	jedes TN mit M1

T steht für Tumorgöße, wobei

T1 einer Tumorgöße von höchstens zwei cm,

T2 von mindestens zwei cm und

T3 von mindestens fünf cm entspricht.

T4 wird in vier weitere Gruppen unterteilt mit

- a: Fixation an der Brustwand,
- b: Ödem, Ulzeration, Infiltration der Haut oder Satellitenknoten der gleichen Brust,
- c: sowohl a als auch b treffen zu und
- d: inflammatorisches Karzinom.

N gibt Auskunft über Zahl und Lokalisation der axillären Lymphknotenmetastasen:

N₁ entspricht hierbei höchstens vier, N₂ mehr als vier homolateralen Lymphknotenmetastasen und N₃ nicht axillären Lymphknoten oder Lymphödem des Armes.

Existenz von mindestens einer Fernmetastase wird mit M₁ ausgedrückt, das Fehlen von Fernmetastasen durch M₀.

1.1.4 Prognose und klinisch relevante prognostische Faktoren

Die Stadieneinteilung gibt auch erste Informationen über den zu erwartenden Krankheitsverlauf des diagnostizierten Brustkrebses.

Ein kleiner Tumor hat erfahrungsgemäß eine bessere Prognose als große Tumoren. Hat das Karzinom bereits Lymphknoten befallen sowie Metastasen gebildet, verschlechtern sich außerdem die Aussichten der Patientinnen.^{89,108,115}

Je später der Tumor diagnostiziert wird, desto wahrscheinlicher ist es, dass sich bereits maligne Zellen aus dem primären Tumorverband gelöst haben und z.B. im Kreislauf zirkulieren. Trotz vollständiger Entfernung des Tumors ist dann die Gefahr der nachträglichen Absiedlung von Metastasen sehr groß.^{37,180}

Zusätzlich wird der Verlauf und auch die Therapie dieser Systemerkrankung durch das Vorhandensein bzw. Fehlen von Hormonrezeptoren – indirekter Indikator der Tumordifferenzierung - beeinflusst. Liegen Hormonrezeptoren im Tumorgewebe vor, kann ein Therapieversuch mit Antihormonen, wie z.B. Tamoxifen®, vorgenommen werden, der sich auf den Verlauf der Krankheit günstig auswirkt.^{2,107}

Im Gegensatz zu der positiven Rolle der Rezeptoren steht die negative Wirkung der Gegenwart von Entzündungszellen, die überzufällig häufig mit einer infausten Prognose korreliert.^{1,11} Multilokales Vorkommen in einer Brust ist häufig und hat keinen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientin. Dagegen ist bilaterales Auftreten der Erkrankung seltener und geht mit hohem Risiko für frühen Tod und Tumorrezidiv einher.⁵⁹ Zusätzlich zu den biolo-

gischen Parametern beeinflusst auch die Behandlungsart des primären Tumors die Überlebensdauer, Länge des rezidivfreien Intervalls und Lebensqualität. Am günstigsten für den Verlauf der Krankheit, wenn auch nicht für die Psyche der Patientin, scheint immer noch die radikale Mastektomie zu sein.^{145,170} Vorsichtige Versuche mit Teilresektionen führen auch heute noch bei einigen Tumoren zu frühen Rezidiven, obwohl auf dem Gebiet der adjuvanten Therapien große Fortschritte gemacht wurden. Neben der klassischen Behandlung mit Antihormonen (s.o.) , Bestrahlung und Chemotherapie lassen derzeit Therapieversuche mit monoklonalen Antikörpern, die im Tierversuch Metastasierung verhindern,¹³² sowie der Versuch, therapeutisch wirksame Substanzen an tumorspezifische Antikörper zu binden, um am Tumor und seinen Metastasen besonders hohe Konzentrationen zu erreichen, hoffnungsvoll in die Zukunft blicken.^{23,33,178}

Der wichtigste prognostische Parameter für die Selektion von Patientinnen, die einer adjuvanten systemischen Behandlung bedürfen, ist der Lymphknotenstatus, obwohl dieses Werkzeug nicht immer seinem Anspruch gerecht wird, da ein Teil der Lymphknoten - negativen Patientinnen trotz geringer Tumorgöße wider Erwarten frühzeitig Rezidive aufweisen.^{144,152} Ein genauerer prognostischer Indikator wäre also wünschenswert.

1.2 Pathologie des Mammakarzinoms

1.2.1 Klassifikation, Grading und pTNM

Klassifikation

Unter dem Begriff Mammakarzinom summieren sich viele histologisch voneinander abgrenzbare Neoplasien, die sich in ihrem Erscheinungsbild und bezüglich ihrer malignen Potenz z.T. erheblich unterscheiden, wenn auch die Herkunft aus dem Drüsenkörper allen gleich ist. Eine erste Übersicht verschafft die Einteilung der WHO in nicht - invasive Karzinome, invasive Karzinome und Morbus Paget der Mamille. Die nicht-invasiven, noch prä-malignen epithelialen Tumoren teilen sich in zwei Untergruppen, die intraduktalen Carcinoma in situ (CIS), die den Milchgängen entstammen, und die lobulären CIS, die als Entartung die Drüsenläppchen bevölkern. Ebenso spalten sich die invasiven Karzinome in überwiegend duktal geprägte Karzinome, die etwa 70% dieser Gruppe ausmachen, lobulär differenzierte Karzinome, die in ca. 20% der Fälle diagnostiziert werden, sowie die selteneren Karzinome mit ungewöhnlicher Differenzie-

rung, zu denen u.a. medulläre, papilläre, adenoid-zystische, tubuläre und metaplastische Karzinome gehören.

Die Aufteilung in die oben beschriebenen zwei Hauptgruppen und diverse Sonderformen folgt der Tradition und morphologischen Gesichtspunkten, lässt sich jedoch histogenetisch eher nicht begründen.¹⁷⁷

Tumor - Grading

Weiterhin werden die Karzinome durch das Grading ihrer Differenzierungs- und Malignitätseinschätzung nach in drei Gruppen eingeteilt. Das Prozedere, welches die Zuweisung zu diesen Gruppen vereinheitlicht, erfolgt nach einem vom Bloom und Richardson 1957 eingeführten Schema,¹⁸ das in modifizierter Form bis heute benutzt wird.⁹⁸ Ohne Berücksichtigung des Tumortyps werden hier verschiedene histologische und zytologische Merkmale erfasst.

Das Schema beruht auf der Beurteilung erstens der Differenzierung der Tubuli und Acini, zweitens der Pleomorphie der Kerne und drittens der Häufigkeit der Mitosen. Jedes Kriterium hat drei verschiedene Ausprägungsgrade, die mit Punktwerten beschrieben werden. Addition dieser Punkte führt zu folgenden Ergebnissen (Tab.2):

Tab.2 Tumor – Grading modifiziert nach Bloom/ Richardson

Grading	Punktwert	Differenzierung
G1	3- 5	hoch
G2	6 - 7	mittel
G3	8 - 9	niedrig

Der prognostische Wert ist hierbei höher als bei anderen Schemata,³⁹ da bereits frühzeitig durch verschiedene Untersucher signifikante Beziehungen zwischen diesem Grading und der Überlebenszeit nachgewiesen werden konnten.^{24,174}

pTNM

Weitere Informationen über das Tumorleiden werden in der pTNM - Klassifikation codiert, die Grundlage der unter 1.1.3 dargestellten Stadieneinteilung ist und dort bereits erläutert wurde.

1.2.2 Histomorphologie

Die Morphologie des invasiven *duktalen* Karzinoms ist in hohem Maße uneinheitlich, was schon dadurch deutlich wird, dass die histologische Diagnose „duktales Karzinom“ eine Ausschlussdiagnose ist. Dies schlägt sich auch in seiner englischen Bezeichnung NOS - not otherwise specified- nieder.⁴³ Hier wird eine Vielfalt von Formen zusammengefasst, die keine Regelmäßigkeiten aufweisen. Die Zellkerne der Tumorzellen können sowohl relativ gleichmäßig sein als auch pleomorph und bizarr. Häufig weisen duktale Karzinome große Mengen Stroma auf, welches von einzelnen Karzinomzellen durchsetzt ist, wobei die infiltrativen Zellen in Feldern locker zusammenliegen. Innerhalb des Tumors kommt es oft zu szirrhösen, papillotubulären, soliden oder sarkomatösen Differenzierungen, die solitär oder auch gemeinsam vorliegen können.¹³⁵

Dagegen ist das *lobuläre* Karzinom besser definiert. Der klassische lobuläre Typ zeigt gänsemarschartig hintereinanderliegende Zellen sowie schießscheibenartig um residuale Milchgangstrukturen formierte Zellgruppen. An vielen Stellen ist der Tumor diffus invasiv, ohne dass hier bestimmte Muster ausgebildet werden. Die Zellen sind klein und gut voneinander abgegrenzt, scheinen sich abzustößen und haben rundliche Nuclei.

Der hier abgrenzbare *pleomorphe* Typ des lobulären Karzinoms enthält eine Mischung von klassisch angeordneten Zellen, soliden und alveolären Wuchsformen. An wenigen Stellen zeigt sich eine Tendenz zu Zellaggregationen. Zwischen den regelrecht geformten Zellen kommen einzelne Zellen mit bizarr geformtem Zytoplasma vor.

Von den selteneren Formen ist das *tubuläre Karzinom* durch noch gut erkennbare und zumeist hohe Differenzierung der Tumordrüse gekennzeichnet.

Weiterhin lässt sich ein *tubulo - lobuläres* Karzinom abgrenzen, welches die typische Differenzierung des klassischen lobulären Karzinoms neben tubulären Strukturen mit gut geformten zentralen Lumina aufweist. Auch diese Form ist diffus infiltrierend, zeigt aber in der Nähe der invasiven Zonen oft eine Schießscheibenformation. Die Nuclei sind gering pleomorph.¹²³

Bei den *muzinösen* Karzinomen scheint der gesamte Tumor in PAS und Alcian positiven Schleimseen zu schwimmen, seine Zellen bilden Inseln und ahmen ein kribriiformes oder papil-

läres Muster nach. Diese Tumoren haben gegenüber dem umgebenden Gewebe eine glatte, gepresste Grenze, jedoch keine Kapsel. Innerhalb des Tumors findet sich nur wenig Stroma, keine lymphoiden oder histiozytären Infiltrate und auch keine Nekrosen. Selten ist mit dem infiltrierenden Tumor ein CIS assoziiert.

Papilläre Tumoren sind gut umschrieben und enthalten sklerosierende Foci. Die papillären Strukturen werden kaum von Stroma unterbrochen, mit Ausnahme von fibrovaskulären Gruppierungen. Wenn die Tumoren schleimreich sind, kann die Abgrenzung vom muzinösen Karzinom schwierig sein. Sowohl Zytoplasma als auch Nuclei sind vielgestaltig. Enthält der Tumor ein Carcinoma in situ, so ist es vom papillären oder kribriformen Typ.

Das scharf abgegrenzte, einheitlich wirkende *medulläre* Karzinom besteht aus unregelmäßig geformten, untereinander verbundenen Tumorinseln, die das umgebende Gewebe zusammendrücken, ohne dass sich eine echte Kapsel bildet. Der Tumor ist stromaarm, enthält aber ein ausgeprägtes lymphoplasmazelluläres Begleitinfiltrat. Seine Tumorzellen haben reichlich Zytoplasma und enthalten große, bizarr geformte Nuclei. Oft ist es schwierig, die Tumorzellen voneinander abzugrenzen.¹¹

Eine weitere Entität bildet das *kribriforme* Karzinom, welches netzartig untereinander verbundene Nester infiltrativer Tumorzellen in szirrhösem Bindegewebe, das stellenweise eingezogen ist, zeigt.^{171,172}

Diese Typisierung der Tumoren folgt WHO Kriterien, die seit 1981 Gültigkeit besitzen.

1.2.3 Immunhistologie

Zu der Beurteilung der Tumoren gehört heute auch die Untersuchung auf verschiedene Moleküle, die von Tumorzellen exprimiert und durch Antikörper nachgewiesen werden können. Besondere Stellung beim Mammakarzinom haben der Nachweis des Ki-67 Antigens durch den MIB1 Antikörper sowie der Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren durch entsprechende Antikörper.

MIB1

Das nukleäre Ki-67 Antigen wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert und ist damit der Zellproliferation assoziiert.^{27,55} Durch Färbung der Kerne mit dem für dieses Antigen spezifischen monoklonalen Antikörper kann daher genauer als durch das Zählen von nativ sichtbaren Mitosen bestimmt werden, welche Zellen sich in der Reproduktionsphase (G1, S-,

G2-, M- Phase) befinden.⁵⁴ Die Zellteilungsrate stellt die Wachstumsfraktion eines Tumors dar und ist ein Indiz für die Malignität einer Neoplasie.^{94,130}

Steroidhormonrezeptoren

Östrogen- und Progesteronrezeptoren sind Transmembranproteine, die mit Steroidhormonen eine Verbindung eingehen, sich nukleär verlagern und dabei so verändern, dass innerhalb der Zelle eine Änderung der Proteinbiosynthese eintritt.⁸ Die Expression dieser Rezeptoren in gesunden Brustzellen wurde nachgewiesen^{83,167} und ihr Erhalt bei maligne entarteten Zellen als Zeichen einer noch guten Differenzierung identifiziert.^{2,15,40} Ihr Vorhandensein bedeutet häufig eine günstige Prognose für die Patientin und ermöglicht die Therapie mit Antihormonen.^{13,131} Auch Rezeptoren für andere Steroidhormone wie Androgene und Glucokortikoide wurden nachgewiesen, sie sind jedoch von geringer prognostischer und klinischer Relevanz.^{112,164} Neuere Arbeiten konnten jedoch die Wirkung von Glucocorticoiden auf die Apoptose und die Bedeutung für das Überleben der Karzinompatienten nachweisen.^{113,116} Heute werden Östrogen- und Progesteronrezeptoren routinemäßig immunhistochemisch an paraffinasservierten Gewebepreparaten durch monoklonale Antikörper nachgewiesen.^{12,80,94,142,165}

1.2.4 Pathologisch relevante prognostische Faktoren

In den vorangegangenen Kapiteln wurden bereits wichtige prognostische Faktoren wie Tumorgöße und Lymphknotenbefall genannt. Die Differenziertheit eines Tumors, ausgedrückt durch histologischen Typ sowie Erhalt bestimmter Fähigkeiten, wie z.B. der Schleimbildung und Produktion von Oberflächenmolekülen, gibt ebenso Hinweise über die Prognose wie die Beurteilung des Gradings der Tumoren. Weitere klassische Prognosefaktoren sind der Befall von Lymphspalten und Blutgefäßen – Lymphangiosis bzw. Hämangiosis carcinomatosa. Die bisher entdeckten Faktoren konnten jedoch immer nur für einen Teil der Patientinnen eine Vorhersage ermöglichen, so dass die Suche nach absoluten prognostischen Markern weitergeht. Als weiterer Faktor wird heute die Angiogenese diskutiert. Verschiedene Autoren^{44,75} beschrieben ausgeprägte Angiogenese als unabhängigen Faktor zur Auslese der Patientinnen, die wegen der infausten Prognose zusätzlicher Therapie bedürfen.^{120,121,176} Die Verhinderung der Angiogenese wurde auch als möglicher Therapieansatz beschrieben.^{128,166}

Onkogene, wie z.B. c-erbB, waren in den letzten Jahren Mittelpunkt intensiver Forschung und haben einigen Voraussagewert bewiesen. c-erbB-2, auch unter den Namen neu-Onkogen, HER-2 und MAC117 bekannt, ist ein 185 kDa Transmembranprotein mit Tyrosinkinaseaktivität der intrazellulären Domäne, wird auf Chromosom 17q21 kodiert¹⁶¹ und ist Rezeptor für den epidermal growth factor (EGF).¹⁰ Auch die Aussagekraft dieses Onkogens wird in der Literatur unterschiedlich bewertet: Einige Arbeitsgruppen sehen in ihm einen unabhängigen prognostischen Indikator für das Mammakarzinom,¹⁵³ andere sehen zwar Korrelationen mit dem Nodalstatus, höherem Grading und Östrogennegativität, jedoch keinen unabhängigen Prädiktor.^{68,72} Pathologische Werte von c-erbB korrelieren also mit bereits erfolgter Tumorprogression und sind damit auch für die Therapiewahl entscheidend. Auch bei kleinen Tumoren sollte dann eine adjuvante Chemotherapie (z.B. mit Trastuzumab®) durchgeführt, bei größeren Tumoren auf eine brusterhaltende Operation verzichtet werden.^{81,99,119,143} Seit einiger Zeit werden auch Adhäsionsmoleküle bezüglich ihrer Bedeutung für Karzinome untersucht.

1.3 Zelladhäsion in der Tumorpathologie

1.3.1 Adhäsionsmoleküle

Auf der Zelloberfläche liegen sog. Adhäsionsmoleküle, die typischerweise aus transmembranen oder mit Glycophosphatidylinositol verbundenen Proteinen bestehen. An sie können Makromoleküle der extrazellulären Matrix (ECM), benachbarte Zellen sowie Botenstoffe spezifisch binden. Auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran interagieren die zytoplasmatischen Domänen der Adhäsionsrezeptoren mit Proteinen, die eine Verbindung zum Zytoskelett herstellen. Damit integrieren Adhäsionsmoleküle die Zelle in Gewebe, unterstützen Zellmotilität sowie spezialisierte Aktivitäten und leiten extrazelluläre Signale ins Innere der Zelle. Fehlen bestimmte Adhäsionsmoleküle, wird die Kommunikation von Zellen untereinander und mit der ECM verhindert und dadurch kann auch die Kontaktinhibition, die normalerweise einer unregelmäßigen Lagerung von Zellen vorbeugt, aufgehoben werden.³ Zudem führt der Verlust der adäquaten Adhäsion an die ECM in der gesunden Zelle zum programmierten Zelltod. Dieser durch „Heimatlosigkeit“ hervorgerufene Prozess wird Anoikis genannt und dient der Erhaltung einer korrekten Zellzahl in Epithelien.⁵¹ In aktuellen Veröffentlichungen wurde nachgewiesen, dass der Zusammenbruch der Anoikis zur Malignität von Brusttumoren beiträgt.¹⁵⁸ Folgende Adhäsionsmoleküle wurden bereits identifiziert und ihre Struktur und Bedeutung näher untersucht.

Integrine

Die größte Familie der Adhäsionsmoleküle bilden die Integrine. Sie werden durch Transmembranglycoproteine gebildet, die sich zu nicht-kovalent gebundenen α - und β - Heterodimeren zusammensetzen, welche entsprechend ihrer Komposition verschiedene Rezeptoren bilden können. Bis heute sind etwa 15 Alpha- und neun Beta- Untereinheiten identifiziert worden. In gesunden Zellen haben sie wichtige Aufgaben bei der Gerinnung ($\alpha_2\beta_3$ -Integrine) und bei der immunologischen Abwehr ($\alpha_4\beta_2$ -Integrine). Als Oberflächenmoleküle, die mit Laminin und Fibronectin Verbindungen eingehen, spielen sie eine Rolle bei der Tumorphyse. Der Lamininrezeptor (α_1) kann zur Ausschüttung von Metalloproteasen führen, die beim Durchbruch durch die Basalmembran von Bedeutung sind. α_1 ist Teil eines Kollagen-/ Laminin-Rezeptors, α_2 entspricht einem Kollagen-Rezeptor-Anteil, α_3 bildet eine Kollagen- / Fibronectin- / Laminin- Rezeptoruntereinheit, α_5 und α_6 gehören zum Fibronectinrezeptor.⁵⁰

Die Expression von $\alpha_4 \beta$ -Integrinen an der Zelloberfläche konnte direkt mit dem metastatischen Potential von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden:

In den Brustkrebszellen und auch im umgebenden residualen Normalgewebe war die Expression von $\alpha_6 \beta_4$ -Integrinen i.V. zu normalem Brustgewebe vermindert, was auf den frühen Verlust dieser Moleküle bei der malignen Transformation hinweist.⁸⁵ Ebenso ist der Verlust von α_2 -, α_3 -, β_1 - und β_2 - Untereinheiten in maligne transformiertem Brustgewebe bekannt.^{86,111,127}

E - Cadherin

Ein weiteres Adhäsionsmolekül, welches bezüglich seines Einflusses auf die Metastasierung untersucht wurde, ist das E - Cadherin. Es vermittelt Kalzium abhängige, gleichartige Zell – Zell - Adhäsionen. Die intrazelluläre Domäne ist mit dem Aktinfilament verbunden. E - Cadherine spielen eine Rolle bei der Embryonalentwicklung sowie bei der Erhaltung einer normalen Gewebearchitektur. Es ließ sich nachweisen, dass Antikörper gegen Cadherine Zusammenhalt und Ausrichtung der Zellen zerstören und für eine vermehrte Migration der Zellen sorgen. In-vitro-Studien zeigten, dass durch künstlichen Verlust von E - Cadherinen in gut differenzierten Tumoren metastatisches Potential entsteht.¹⁷ Beim Mammakarzinom konnte der Verlust von E - Cadherinen beim lobulären Karzinom festgestellt werden, während duktale Karzinome oft erhaltene Cadherinexpression zeigen.¹¹⁴ Ein unabhängiger prognostischer Wert konnte trotz der Verbindung zu einigen histologischen Kriterien nicht nachgewiesen werden.¹⁰³

Laminin-Rezeptor

Weiterhin ist der 67 kDa Laminin-Rezeptor, der nicht zur Gruppe der Integrine gehört, von besonderem Interesse. Seine übermäßige Expression korreliert deutlich mit dem verkürzten Überleben der Patienten und vermehrter Metastasierung.^{26,110}

1.3.2 Metastasierung und Zelladhäsion

Bei der physiologischen Wanderschaft bestimmter Zellen, wie z.B. Lymphozyten oder embryonalen Zellen, dienen einige Adhäsionsmoleküle dem Auffinden von Zielorten. Haben diese Zellen ihren Bestimmungsort erreicht, sorgen andere Rezeptormoleküle für eine Bindung an die ECM und benachbarte Zellen. Im Rahmen der Embryonalentwicklung läuft während der Umwandlung epithelialer in mesenchymale Zellen folgendes ab:

Es werden epitheliale Zellen, die polarisiert sind und über sog. tight junctions, adherend junctions und Desmosomen miteinander in Verbindung stehen, elongiert und mobilisiert. Der Verlust sowohl der Polarität als auch der Zellverbindungen führt zu einer veränderten Zellart mit neuen Eigenschaften und Aufgaben – das Mesoderm entsteht. Insgesamt werden ähnliche Mechanismen bei der malignen Entartung von Zellen in Gang gesetzt. Malignes Potential wird in einer Reihe kleiner Schritte erworben, eine Vielzahl von Molekülen spielen dabei eine Rolle:

Die Zelle wird über Mutation der Onkogene und Tumorsuppressorgene transformiert, so dass sich die Zell - ECM- und Zell - Zell- Verbindungen und damit das Adhäsionsmolekülmuster verändert und die Zelle einen Schutz vor Anoikis (s.o.) erhält.^{3,51} So erhält die Zelle die Fähigkeit, die natürliche Kontaktinhibition außer Kraft zu setzen, um sich ungehemmt vermehren zu können. Die Grundlagen der malignen Transformation und der epithelial – mesenchymalen Umwandlung sind also ähnlich.¹⁶ Die unkontrollierte Proliferation ist eine Voraussetzung für weitere genetische Diversifizierung, über die dann invasives und metastasierendes Wachstum ermöglicht wird. Nicht alle Tumoren sind jedoch auch in der Lage zu metastasieren.

Abhängig von Mutationsart und – ort der genetischen Alterationen sollen nur 1000 von 10^9 Tumorzellen in der Lage sein, den primären Tumorort nach Durchbrechen der Basalmembran zu verlassen.¹⁰⁹ Auf dem Weg der Tumorprogression sind weitere Schritte notwendig, um die Zelle mit metastatischem Potential zu versehen. Die Zelle muss die Basalmembran durchdringen und durch Blut- und Lymphgefäße wandern können. Die Basalmembran wird mit Hilfe proteolytischer Enzyme überwunden, z.B. mit Metalloproteasen, Serin- oder Cystein-

proteasen.^{102,138} Im Gefäß interagieren dann Tumorzellen über Adhäsionsmoleküle untereinander oder mit Blutzellen. Die so gebildeten „Thromben“ sind weitestgehend gegen den Angriff der körpereigenen Abwehr geschützt und können dann ungehindert bis in das kapilläre Netz der Zielregion geschwemmt werden.¹²⁹ Auch hier muss die Zelle die Gefäßwand, das Gewebe und die Basalmembran durchdringen, bevor sie erneut mit Hilfe der Adhäsionsmoleküle eine Verbindung mit der ECM eingehen und unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren proliferieren kann.⁶⁷ Zur erfolgreichen Absiedlung von Metastasen gehört letztlich auch die Ausschüttung Angiogeneose fördernder Faktoren. Auf dem Weg der Metastasierung spielen Adhäsionsmoleküle demnach eine vielfältige Rolle und sind fast an jedem Schritt beteiligt. Ein Adhäsionsmolekül, das Objekt intensiver Forschung bezüglich seiner Rolle innerhalb der metastatischen Kaskade ist, wird mit CD 44 bezeichnet.

1.3.3 CD44 - molekulare Grundlagen

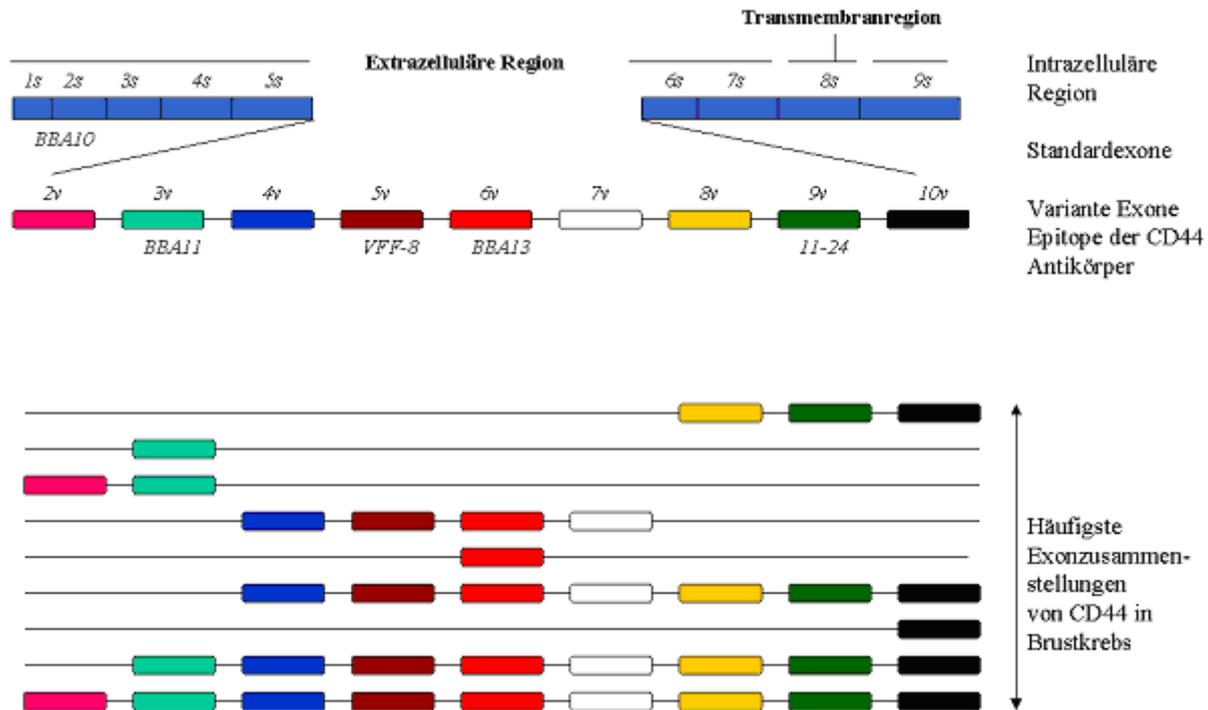
Unter dem „cluster of differentiation“ CD44 werden verschiedene Moleküle, die einem Genort, und zwar dem kurzen Arm des Chromosoms 11p13 entspringen, zusammengefasst.⁵⁸ Das von *Dalchau et al. 1980* erstmals durch den Antikörper F10-44-2 definierte Molekül³² erscheint in der Fachliteratur unter vielen Namen, unter denen getrennte Forschungen betrieben wurden, bevor 1989 die unter Pgp-1 (**p**hagocytic **g**lyco**p**rotein-1)⁷⁷, Hermesantigen⁸² und ECM III (**e**xtracellular **m**atrix **r**eceptor)^{7,25} bekannten Moleküle als identisch mit CD44 erkannt und die Erträge der Forschungen zusammengestellt wurden.⁶⁹

Genetische Grundlagen

Für die Synthese des CD44 - Moleküls stehen 21 Exons zur Verfügung, von denen zehn für das Standardmolekül benutzt werden. Ein Teil codiert für die transmembrane, ein weiterer für die intrazelluläre Region. Dieser Anteil ist für alle CD44 - Moleküle gleich. Ein letzter Anteil dieser Exons ist für die Erstellung der extrazellulären Region des Standardmoleküls verantwortlich.

Die restlichen elf Exons dienen durch alternatives Splicing der mRNA der Herstellung der verschiedenen Varianten (Abb.1).

Abb.1: Neun beim Menschen vorkommende Exons von CD44, Epitope der monoklonalen Antikörper und die häufigsten Kompositionen der varianten Exons



Die Varianten unterscheiden sich vom Standardmolekül dadurch, dass je nach Benutzung der Exons, verschiedene bis zu 420 AS lange Ketten eingeschleust werden. Diese Insertionen werden meist stark glykosyliert.

Das CD44s (standard)-Molekül ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 85900 und 90000 Da.⁹⁰ Es entsteht aus post-translationalen Modifikationen eines 37 kDa Ursprungsmoleküls. Zu den Modifikationen gehören Glykosylierung über N- und O- Verbindungen. Weitere Modifikationen durch Anlagerungen von Chondroitinsulfat in die Isoformen ergeben ein Molekulargewicht von 180 – 200 kDa.³⁶ CD44 ist ein saures Protein mit vielen Phosphoserin- bzw. Threoninresten und Disulfidbrücken. Das Proteinerückgrat besteht aus einer zytoplasmatischen Region mit 72 Aminosäuren (AS), einem in der Membran liegenden Anteil aus 21 AS sowie einem extrazellulären Teil, der etwa 270 AS enthält.

Extrazelluläre Region

Die aminoterminalen 180 Aminosäuren des extrazellulären Teils weisen innerhalb der Familie der Säugetiere eine Homologie von rund 85% auf.

Diese Region enthält sechs Cysteinresiduen, von denen man glaubt, dass sie drei Disulfidbrücken formen, fünf Stellen für N-Glycosylierung (bei AS 25, 57,100,110 und 120) sowie eine Verbindungsregion, die wegen ihrer Ähnlichkeit mit anderen hyaluronsäurebindenden Proteinen CLP - Domäne (**c**artilage **l**ink **p**rotein) genannt wird (35% Homologie).⁹¹ Innerhalb der CLP- Domäne scheinen besonders die AS von Arg 150 bis Arg162 für die Bindung an Hyaluronsäure wichtig zu sein, da Fusionsproteine, denen dieser Teil fehlt, eine deutlich geringere Affinität zu Hyaluronsäure zeigen. Auch Punktmutationen in diesem Bereich gehen mit einer erniedrigten Bindungskapazität einher.²⁰ Eine membrannahe Region der extrazellulären Domäne von etwa 75 AS ist vergleichsweise variabel und enthält sieben mögliche Stellen für Carbohydatisierung. Die Bedeutung dieser Region für die Bindungskapazität von Hyaluronsäure wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Lesley et al. nach Inhibierung der O - Glykolyisierung keine Effekte auf die Bindung an HS fanden, wiesen Dasgupta et al. nach, dass fehlende O - Glykolyisierung die Bindung einiger Kolonkarzinomzelllinien an HS verstärkte.^{33,100}

In der Mitte dieser Region zwischen AS 222 und AS 223 befindet sich die Anlagerungsstelle für weitere AS Sequenzen, die durch alternatives Splicing der elf „variablen“ Exons entstehen.¹⁵⁴

Transmembranregion

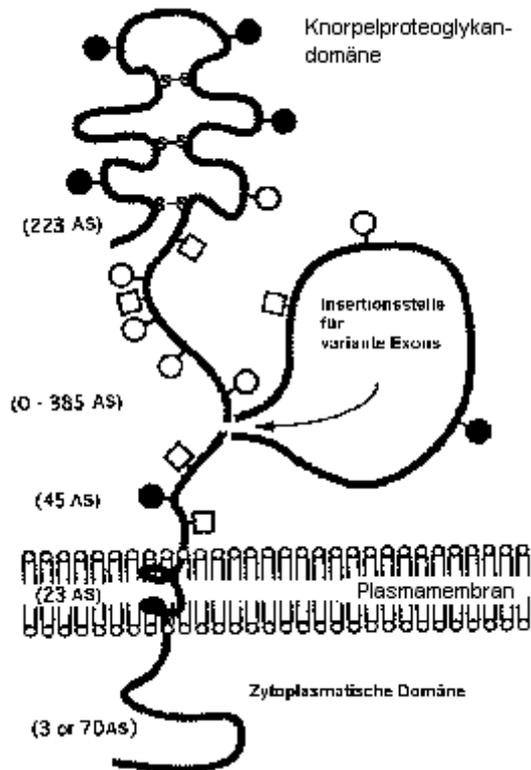
Die Transmembrandomäne stimmt innerhalb der Säuger zu 100% überein. Sie ist nicht an der Bindung von HS beteiligt und selbst Ersatz durch die Transmembranregion von CD 45 schmälert das Bindungsvermögen nicht.¹²⁵

Zytoplasmatische Region

Der zytoplasmatische Anteil des Moleküls besteht aus 72 Aminosäuren, die zu 85% zwischen den Säugern gleich ist. Grundsätzlich obliegen diesem Anteil zwei Arten von Funktionen: Erstens das „inside – out signaling“, bei dem Änderung des intrazellulären Anteils zu einer Änderung der Bindungsfähigkeit an extrazelluläre Liganden führt, und zweitens das „outside – in signaling“, bei dem die Bindung von Liganden zu Änderungen der intrazellulären Domäne führen, die weitere Ereignisse triggern.¹⁵⁰ Durch mutierte Moleküle, denen der intrazelluläre Anteil fehlte und die damit auch eine geringere Bindungsaffinität für Hyaluronsäure hatten, konn-

te nachgewiesen werden, dass der zellinnere Anteil von CD44 an der Regulation der Ligandenbindung beteiligt ist.¹⁰¹ Abbildung 2 zeigt den putativen Aufbau des CD44 Moleküls.

Abb.2: Schematische Darstellung des Aufbaus von CD44 (modifiziert nach Screatton¹⁴⁶)



- AS = Aminosäure □ = Stelle für Chondroitinsulfatanlagerung
 S = Schwefelrest ● = Stelle für N-Glycosylierung
 ○ = Stelle für O-Glycosylierung

Die intrazelluläre Domäne steht über Proteine der ERM Gruppe (**E**zrin, **R**adixin, **M**oesin) mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts in Verbindung.¹³⁹ Weiterhin besteht eine Assoziation der intrazellulären Domäne mit Ankyrin, deren Vorhandensein ebenfalls Voraussetzung für die Bindung von Hyaluron zu sein scheint.¹⁰⁴ In verschiedenen Zellen entwickelt CD44 eine bestimmte Verteilung an der Zelloberfläche. So liegt der Hauptanteil von CD44 in Leukozyten am Zellkörper, nicht aber in den Mikrovilli.¹⁷³ In Epithelzellkulturen, die sich zu einem Gewebe zusammenlegen, konzentrieren sich die CD44 - Rezeptoren an den lateralen Zellmembranen,

wo die Zellen untereinander Kontakte ausbilden, wenden sich jedoch von der apikalen Seite ab.¹¹⁸

1.3.4 CD44 - topographische Verteilung und Embryologie

CD44 kommt auf vielen Zellen des menschlichen Körpers, aber auch bei verschiedenen Tieren vor. So lassen sich nur geringfügig andersartige CD44-Moleküle auch bei Ratten und anderen Nagern finden (s. 1.3.3). Die topographische Verteilung beim Menschen ist für die einzelnen Isoformen unterschiedlich. Die varianten Formen von CD44 sind bestimmten Gruppen von Zellen vorbehalten, wobei sich die Ergebnisse verschiedener Forscher widersprechen.

4v

Während einige Forscher⁴⁶ starke Reaktionen ihrer Antikörper gegen 4v in Schilddrüsen-, Prostata-, Brust- und respiratorischem Gewebe fanden, berichten andere¹⁶³, 4v ausschließlich in der Epidermis und im Ösophagusepithel gefunden zu haben und selbst dort nur auf die basale Zellschicht beschränkt. Ähnliche Differenzen finden sich in der Literatur auch bezüglich der anderen Varianten.

6v

Eine Expression von 6v findet sich nur auf squamösen Epithelien der Epidermis, Schweißdrüsen, Gängen der Speicheldrüsen, Lunge und des Ösophagus.

Im Vergleich dazu beschreiben Fox et al. starke Expression von 6v zusätzlich auf Zellen der Prostata und der Schilddrüse.⁴⁶

9v

Weiter verbreitet ist 9v, welches nur im Gehirn, Nebenniere sowie Pankreasazini, Hepatozyten und Ovar nicht gefunden wird.^{156,163}

Zusätzlich zeigen sich die Varianten v6 und v9 auch auf Leukozyten nach antigener und mitogener Stimulation.¹⁵⁵

standard

Das CD44 - Standardmolekül kommt dagegen in fast allen Organen vor, auch in nicht – epithelialen Zellformen. Dabei gleicht seine Verteilung der seines Hauptbindungsmoleküls, dem

Hyaluron.^{126,169,175} Positive Reaktionen mit Antikörpern gegen CD44s zeigen sich im zentralen Nervensystem z.B. in Astrozyten, Mikroglia und Stratum granulosum. Auch lymphatische Zellen, Blutzellen, Fibroblasten und Endothel sind CD44s positiv. Während frühere Forschungen negative Ergebnisse bei der Reaktion von Antikörpern gegen CD44s mit Gallengängen, bronchialen Epithelien, Endothel und dem gesamten Darmtrakt ergeben hatten,^{70,126} zeigen sich auch diese Gewebe positiv bei neueren Forschungen.¹³³ Die Unterschiede können durch verschiedene Bindungsaffinitäten der von den genannten Autoren benutzten unterschiedlichen Antikörper erklärt werden und bedürfen näherer Untersuchung.

Embryonale Expressionsmuster

In embryonalem Gewebe ist die Verbreitung von CD44 geringer, gleicht jedoch den Mustern, die in adultem Gewebe gefunden wurden.

4v lässt sich in fötalem Gewebe nicht finden, 6v wird von fetaler Haut exprimiert, 9v Ausbildung ist besonders in Haut, Lunge, Mesonephron und Paramesonephron sowie Harnblase deutlich, während der Magen-Darm-Trakt kein 9v aufweist. Eine genauere Unterscheidung, zu welchem Zeitpunkt welches Molekül in der Embryonalentwicklung auf welchen Zellen auftaucht, kann bisher nur an Nagern getroffen werden. In entscheidenden, frühen Entwicklungsstadien des Mausembryos überwiegt die Expression von CD44s in Herz, Somiten und Extremitätenknospen.¹³⁷ Meist stimmt diese starke Expression von CD44s mit der Ausbildung von Hyaluronsäure, dem Hauptliganden von CD44, überein.

In den Fällen, wo diese Koexistenz nicht der Fall ist, hat in-situ-Hybridisation jedoch die Anwesenheit von CD44v ergeben. Nachweislich können Anstiege des Hyaluronsäuregehalts in Gebieten der Zellproliferation und -migration, wie sie bei der Embryogenese vorkommen, gefunden werden. So wird z.B. Hyaluronsäure am neunten Tag post coitum überall im cranialen Mesenchym, nicht aber in den Somiten oder Extremitätenknospen gefunden.⁴² In späteren Entwicklungsstadien verändert sich dann das Verteilungsmuster. Gemeinsam mit anderen Adhäsionsmolekülen scheint CD44 über Zell-Zell- und Zell-Matrix- Interaktionen einer feinen Regulation zu unterliegen und zu embryonaler Entwicklung beizutragen.¹³⁷

1.3.5 CD44 - physiologische Funktion

CD44 wird auf der Oberfläche vieler Zellen mesodermaler, neuroektodermaler oder hämopoetischer Herkunft gefunden. Zuerst war nur seine Präsenz auf Zellen, die zum lymphatischen

System gehören, bekannt und daher wurde das Molekül unter dem Namen „lymphocyte homing receptor“ geführt. Normalerweise zirkulieren Lymphozyten im Blut und lymphoiden Geweben. CD44 beteiligt sich daran, dass Lymphozyten an bestimmten Stellen an das Endothel der postkapillären Venolen binden und den Kreislauf verlassen können.^{160,179}

Zusätzlich scheint CD44 die Extravasation von aktivierten T-Zellen in entzündliche Regionen zu ermöglichen.³⁵ Wie oben bereits beschrieben, ist CD44 ein Rezeptor für Hyaluronsäure. Durch die Bindungsaffinität ermöglicht CD44 Zellen von ihrer ursprünglichen Stelle zur HS zu migrieren.¹²⁴ Die Verbindung des intrazellulären Teils von CD44 mit dem Zytoskelett lässt außerdem eine Regulation der Hyaluronbindungsfähigkeit zu (s.1.3.3.). Jedoch vermag CD44 HS nicht nur zu binden⁷, sondern sich auch am Abbau dieses Moleküls zu beteiligen.³¹ CD44 kann sich auch an andere Moleküle der extrazellulären Matrix binden, so sind Kollagen, Laminin und Chondroitin - 4 - sulfat als mögliche Liganden für CD44 nachgewiesen worden.^{14,41} Weiterhin besteht auch die Möglichkeit von Bindung der CD44 - Moleküle untereinander. CD44 v10 wird von anderen CD44 - Molekülen erkannt. So können Zell - Zell -Interaktionen entstehen.¹¹⁸

1.3.6 CD44 - Bedeutung in der Tumorbiologie

Die Beteiligung von CD44 an der Fähigkeit der Lymphozyten, den Blutfluss zu verlassen, durch Gefäßwände zu wandern und sich im Lymphknoten festzusetzen und dort zu vermehren, scheint unbestritten gesichert. Eine Bedeutung für CD44 in der Tumorbiologie konnte 1991 von Günthert et al im Rattentumormodell nachgewiesen werden. Dieser Arbeitsgruppe gelang es durch Transfektion einer nicht metastatischen Zelllinie (BSp73AS) eines Pankreasadenokarzinoms mit CD44v-cDNA Metastasierung über das Lymphsystem zu induzieren.⁶¹ Weitere Studien zeigten, dass Antikörper gegen variante Formen von CD44 die Absiedlung von Metastasen und auch die physiologische Aktivierung von Makrophagen verhindern konnte.^{6,147} Die Erkenntnis, dass ein einziges Molekül in der Lage war, metastatisches Potential auf nicht metastasierende Tumorzellen zu übertragen bzw. AK gegen dieses Molekül Metastasierung verhindern konnten, führte zu weiteren Nachforschungen, die die Bedeutung des Moleküls für die menschlichen Tumoren klären sollten. In vielen Karzinomtypen kann CD44 nachgewiesen werden, doch ist die Bedeutung der Ausbildung dieses Moleküls nicht für alle Tumortypen gleich.¹⁶² Tatsächlich zeigte sich, dass in Haut- und Hirntumoren die Bildung von

Metastasen nicht abhängig von CD44v war.^{95,141} In Melanomen jedoch korreliert die Präsenz von CD44v mit der Malignität der Tumoren.^{4,78,92,148}

Besondere Bedeutung zeigte die Variante v6 für das Kolonkarzinom. Hier konnte diese Variante in allen malignen Veränderungen nachgewiesen werden.^{71,151,159}

Auch beim Magenkarzinom ist die Verteilung der Varianten von Bedeutung. Während v5 im Siegelringzellkarzinom exprimiert wird, ist v6 ausschließlich dem Karzinom vom intestinalen Typ vorbehalten.^{76,93,96,140,149}

Die Bedeutung von CD44 ist für den Menschen also nicht so eindeutig festzulegen, wie für das Rattenmodell. CD44 kann auf metastasierenden Zellen vorhanden sein, seine Präsenz jedoch ist keine Grundvoraussetzung für metastatisches Verhalten.

1.3.7 CD44 - Bedeutung beim Mammakarzinom

Ebenso widersprüchlich wie die Aussagen zur Rolle von CD44 für die Metastasierung menschlicher Tumoren im Allgemeinen stellt sich die Bedeutung dieses Moleküls für das Mammakarzinom im Besonderen dar. Manche Forscher konnten eine Beziehung zwischen Entdifferenzierung der Tumoren und der Überexpression von CD44 Varianten herstellen.⁸⁴ Hinweise, dass CD44 ein unabhängiger Prognosefaktor sei, ergaben sich nicht. Andere Autoren beschreiben eine Korrelation von v6 mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und wiesen nach, dass v6 ein unabhängiger Prädiktor für die Prognose sei.⁸⁷ Dem widersprechen die Daten weiterer Forschungsgruppen, die zwar eine Beziehung zwischen CD44s sowie 9v und Tumorgroße und Grading herstellen konnten, jedoch keine CD44 Varianten als unabhängige prognostische Marker entdeckten.^{48,49} Weitere Arbeitsgruppen sehen zwar einen Zusammenhang von CD44 mit metastatischem Verhalten von Mammakarzinomen, treffen aber keine genauen Aussagen über Korrelationen.⁷⁹ Nachgewiesen werden konnte jedoch, dass bereits in frühen Stadien der Tumorprogression eine Änderung des Expressionsmusters bei Brustkrebs eintritt.⁹ Eine weitere Bedeutung für den zukünftigen Einsatz von CD44 Markern wird in der Beurteilung verdächtiger prämaligener Veränderungen gesehen.^{19,29} Weitere Untersuchungen der genauen Vorgänge an CD44 - Rezeptoren bei der Tumorprogression wurden von Bourguignon et al. durchgeführt. Hier gelang der Nachweis, dass bestimmte Kinasen die CD44v - Interaktion mit Ankyrin, die mit der metastatischen Zellmigration zusammenhängt, zu modifizieren vermögen.^{21,22}

2. Problemstellung

Das Ziel dieser Untersuchungen besteht darin, eine Beziehung zwischen bereits prognostisch angewandten Faktoren und dem CD44 Adhäsionsmolekül aufzuzeigen und die Rolle von CD44 bezüglich der Prognose des Mammakarzinoms zu prüfen. Dazu mussten zunächst am vorhandenen Kollektiv die typischen Tumoreigenschaften dargestellt werden.

2.1 Proliferationsmarker MIB1, Östrogen- und Progesteronrezeptor beim Mammakarzinom

MIB1

Wie eingangs erwähnt, ist die unkontrollierte Proliferation maligne entarteter Zellen nicht nur Charakteristikum eines Tumors, sondern auch Voraussetzung für infiltratives Wachstum. Mit dem monoklonalen Proliferationsmarker MIB1 wurden in den Tumoren die Zellen nachgewiesen, die sich in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Mitosezyklusses befinden. Dies wurde dann mit den klinisch ermittelten Daten des Krankheitsverlaufes verglichen.

Hormonrezeptoren

Die klinische und prognostische Bedeutung des Östrogen- und Progesteronrezeptors wurde im Kapitel 1.2.4 bereits ausführlich dargestellt. Die Ergebnisse des immunhistochemisch nach Remmler et al.¹³³ durch die anti -Progesteronrezeptor - Antikörper (mPR1) und anti - Östrogenrezeptor – Antikörper (1D5)-Färbungen ermittelten Hormonrezeptorstatus wurden mit den Tumoreigenschaften und prognostischen Faktoren in Beziehung gesetzt.

2.2 CD 44- Isoformen beim Mammakarzinom

CD44 und seine Varianten wurden als wichtige Adhäsionsmoleküle bei der zielgerichteten Bewegung von Lymphozyten in und aus Geweben und Gefäßen erkannt. Der Nachweis von CD44 auch auf anderen Geweben, insbesondere auf Tumorzelloberflächen, gab Anlass zur Spekulation über die Beteiligung dieses Oberflächenmoleküls an der erfolgreichen Metastasierung von Tumorzellen. Erste Analysen bei Darmtumoren sowie beim Retinoblastom zeigten eine signifikante Verbindung zwischen Metastasierungsverhalten, Prognose und CD44 - Expression. Es folgten Studien an diversen Karzinomen, insbesondere auch am Mammakarzinom. Doch bis heute sind die Ergebnisse der verschiedenen Forschungsgruppen widersprüchlich.

Das mag an der geringen Fallzahl und geringen Nachbeobachtungszeit der meisten dieser Studien liegen. Die vorliegende Arbeit vergleicht jedoch die Expression von CD44 - Standard und seinen Varianten mit den klassischen prognostischen Faktoren und dem klinischen Verlauf an einem Kollektiv von 266 Patientinnen mit einer Nachbeobachtungszeit von mehr als 10 Jahren.

2.3 CD44-Antikörper und Paraffinmaterial

Standardisierte immunhistochemische Färbemethoden und -protokolle lagen bis dato nur für cryopräservierte Gewebeproben vor, obwohl die Paraffingängigkeit der meisten Antikörper gegen das CD44 - Antigen bereits beschrieben wurde. Die Herausforderung bestand also zunächst darin, geeignete Antikörper aus einem großen Pool von Angeboten zu selektieren und ein angemessenes Protokoll sowohl für die Vorbehandlung der Paraffinschnitte als auch den eigentlichen Färbeprozess zu finden.

2.4 CD 44, prognostische Faktoren und klinischer Verlauf

Die so gewonnenen immunhistochemischen Präparate werden dann bezüglich ihrer Färbequantität und -qualität nach einem für dieses Kollektiv entwickelten Auswertungsschema beurteilt. An diese Datenevaluation schließt sich der statistische Vergleich mit den bereits am Patientengut erhobenen klassischen prognostischen Daten und dem klinischen Verlauf an.

3. Material und Methode

3.1 Patientenauswahl

Die in dieser Arbeit analysierten Gewebeproben stammen von Patientinnen, die in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Gießen wegen eines invasiven Mammakarzinoms zwischen 1982 und 1992 behandelt wurden. Insgesamt liegen von 266 Fällen in Kooperation mit der onkologischen Ambulanz (PD Dr. K. Münstedt) komplette klinische Verläufe über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 13 Jahren vor.

3.2 Tumormaterial

Bei dem Tumormaterial handelt es sich um 255 invasive Mammakarzinome und 60 Carcinoma in situ von verschiedenem histologischen Typ. Das asservierte Tumormaterial besteht aus 460 Formalin fixierten und in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebeproben. Einige Tumoren sind in mehreren Paraffinblöcken dokumentiert, in einigen Fällen sind mehrere Blöcke mit LK – Metastasen vorhanden. Von 79 Fällen liegen für diese Arbeit somit sowohl Primärtumor als auch Lymphknotenmetastasen zur Untersuchung vor, in 159 Fällen nur der nodal - negative Primärtumor, 17 mal nur die Lymphknotenmetastasen. Von einem Fall existiert ausschließlich eine Lebermetastase.

3.3 Präparate

Vor der weiteren Behandlung mit verschiedenen Techniken wurden von jedem Paraffinblock auf einem Leica-Mikrotom Schnittpräparate von ca. 2 µm Dicke angefertigt, auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gebracht und 12 h bei 36°C getrocknet.

3.4 HE -, PAS -, Alcian - Färbung

Zur Vorbereitung für diese drei Färbungen wurden die Präparate für 10 min in reinem Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe je zweimal mit 100%igem, 95%igem und 70%igem Alkohol sowie Aqua dest. rehydriert.

Die HE-Färbung erfolgte 7 min in Hämalaun und nach 10 minütigem Spülen mit Leitungswasser in Eosin - Lösung (4 min).

Für die Alcian-Färbung wurden die Objektträger zunächst mit 1%iger Essigsäure behandelt, danach 10 min in Alcian-Blau und nach Spülen in Aqua dest. 5 min mit Kernechtrot gefärbt.

Bevor die Präparate für die PAS-Färbung 13 min in Schiffssches Reagenz und zur Gegenfärbung 5 min in Hämalun eingebracht werden konnten, wurden sie mit 1%iger Perjodsäure behandelt. Nach Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (verwendete Konzentrationen s.o.) und Eintauchen der Objektträger in Xylol wurden die Präparate mit Diatex ® und Deckgläschen fixiert.

3.5 Klassifikation und Grading der Tumoren

Die solchermaßen gefärbten Präparate dienen der Klassifikation sowie dem Grading der Tumoren. Dabei wurde folgendes Klassifikationsschema verwendet. Zunächst erfolgte eine Zuteilung zu einer der Gruppen

1. duktales Karzinom,
2. lobuläres Karzinom,
3. Sonderformen.

In einem weiteren Schritt wurden die Tumoren einer genaueren Klassifizierung innerhalb dieser Gruppen unterworfen, um auch typische Wachstumsmuster und Zellanordnungen berücksichtigen zu können. Die duktales Karzinome wurden nun nach szirrhösen, papillotubulären, solid-tubulären, solid-medullären und sarkomatösen Formen unterschieden. Das lobuläre Karzinom teilte sich in den klassischen, pleomorphen und tubulolobulären Typ. Als Sonderformen wurden tubuläre, kribriiforme, mucinöse und papilläre Karzinomformen zusammengefasst.

Das Grading der Tumoren folgt dem Schema nach Scarff-Bloom-Richardson, das drei verschiedene Grade der Malignität festlegt. Grad 1 weist hierbei nur eine geringe Zahl von Mitosen, eine geringe Kernpolymorphie sowie einen vergleichsweise hohen Grad der tubulären Drüsendifferenzierung auf. Grad 3 dagegen zeichnet sich durch eine hohe Mitoserate, eine ausgeprägte Kernpolymorphie sowie eine niedrige Differenzierung aus. Ein Grading von 2 nimmt eine Mittelstellung zwischen den beiden genannten Extremen ein (s. Absatz 1.2.1).

3.6 Immunhistochemische Färbungen

Diese Färbemethoden dienen der Darstellung von Oberflächenantigenen durch Antigen-Antikörper- Bindungsreaktionen.

3.6.1 Vorbehandlung der Präparate

Um immunhistochemische Färbungen zu ermöglichen, bedürfen die Präparate einer Vorbereitung:

Die Paraffinschnitte wurden zunächst jeweils 10 min in Xylol, Aceton und ein Aceton/ Trispufergemisch (1:2) getaucht, um sie zu entwachsen. Die Epitope an der Zelloberfläche der geschnittenen Präparate sind trotz dieser Entparaffinierung in Xylol nicht frei für die Reaktion mit Antikörpern, da sich bei der Formalinfixierung Methylbrücken zwischen den verschiedenen Oberflächenantigenen ausbilden.²⁸ Den geschnittenen und entparaffinierten Präparaten muss, um diese vorhandenen Bindungen zu lösen, Wärmeenergie zugeführt werden.

Während der üblichen Behandlung in Wasserbad oder Mikrowelle lösten sich die Tumorschnitte, insbesondere solche, die Verkalkungen enthielten, zu einem Großteil von den noch verwendeten normalen Standardobjektträgern ab und gingen so für die weitere Untersuchung verloren. Zunächst musste ein Protokoll gefunden werden, welches ein zuverlässiges Ergebnis mit geringer Verlustrate ermöglichte. Tabelle 3 zeigt die verwandten Methoden und ihre Ergebnisse.

Tab.3 Vorbehandlungsmethoden und ihre Ergebnisse

Methode	Dauer	Färbeergebnis	Verluste
Mikrowelle	3 min	schwach	keine
	6 min	mittel	9 von 10
	9 min	stark	9 von 10
	12 min	-	alle
	3*2 min	stark	1 von 10
	6*2 min	stark	3 von 10
	Wasserbad	10min	schwach
	15 min	schwach	4 von 10
	20 min	stark	7 von 10
	25 min	stark	7 von 10
	30 min	stark	9 von 10
Autoklav		-	alle

Die Testung verschiedener Erwärmungszeiten und Intervalle ergab die niedrigste Ablösungsrate bei gleichzeitig gut erhaltener Färbequalität in der Mikrowelle. Die in Zitronensäure äquilibrierten Präparate wurden dreimalig bei 600 Watt für drei Minuten erhitzt; zwischen den Erwärmungsintervallen wurde zum Schutz vor Verlusten die kochende Zitronensäure gegen kühle ausgetauscht. Die Versuche wurden mit einer entsprechenden Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt.

3.6.2 Methoden

Nach der unter 3.6.1 beschriebenen Vorbehandlung standen die Präparate für die immunhistochemischen Färbungen nach der APAAP bzw. DAB Methode bereit. Die Darstellung von Antigenen in Geweben und Zellen durch Immunfärbung ist ein dreistufiger Prozess, bei dem zunächst ein Antikörper an das nachzuweisende Antigen gebunden wird. Nach Reaktion des Antigen – Antikörperkomplexes mit einem sekundären Reagenz (Link-Antikörper), das als Brückenantikörper zu einem Enzymchromogenkomplex dient, werden die Bindungen mit einer Farbstoffreaktion sichtbar gemacht.

3.6.2.1 Antikörper

Die Antikörper wurden unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt.

Während die Antikörper gegen das Ki67-Ag (= MIB1) sowie die Antikörper gegen den Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor der genaueren Beschreibung des zu untersuchenden Tumormaterials dienen und bereits in der Routineuntersuchung der Mammakarzinome Verwendung finden, entsprachen die monoklonalen CD44-Antikörper der Untersuchungseinheit und sollten bezüglich ihrer Aussagen über das Mammakarzinom überprüft werden.

Bei einer eingehenden Untersuchung der Paraffingängigkeit verschiedener CD44v- und CD44s-Produkte mussten einige als ungeeignet verworfen werden, da sie trotz hoher verwandter Konzentrationen, langen Inkubationszeiten und entsprechender Mikrowellenvorbehandlung des Tumormaterials keine spezifischen Reaktionen im untersuchten Gewebe zeigten. Diese Gruppe der Antikörper ist in Tabelle 4 wiedergegeben:

Tab.4 Nicht-paraffingängige Antikörper

Antikörper	Clone	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
CD44	10-44	Standard	U.Günthert	1:10
CD44	25-32	Standard	U.Günthert	1:3
CD44V	11-10	Isoform v 4	U.Günthert	1:5
CD44V	11-31	Isoform v 6	U.Günthert	1:2
CD44V	11-09	Isoform v 6	U.Günthert	1:2
CD44V	VFF-7	Isoform v 6	Bender	1:10
CD44V	VFF-9	Isoform v 7	Bender	1:10
CD49	EA1	Integrin alpha 6	Dianova	1:10

Die in Tabelle 5 aufgelisteten Antikörper erwiesen sich als paraffingängig und von zufriedenstellender Qualität.

Tab.5 Paraffingängige Antikörper

Antikörper	Clone	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
BBA10	2C5	Standard	Biermann GmbH	1:100
BBA11	3G5	Isoform v 3	Biermann GmbH	1:300
BBA13	2F10	Isoform v 6	Biermann GmbH	1:250
CD44V	11-24	Isoform v 9	U.Günthert	1:5
CD44V	VFF-8	Isoform v 5	Bender	1:500
MIB1	Mib1	Ki-67	Dianova	1:10
Progesteron	10A9	C-terminale Sequenz	Dianova	1:50
Östrogen	1D5	N-terminale Domäne	Dako	1:100

3.6.2.2 APAAP- Methode

In weiteren Versuchen erwies sich die DAB- Methode für den MIB1- und die verschiedenen CD44 - Antikörper als unterlegen. Die APAAP - Methode³⁰ wurde dann bei diesen Antikörpern angewendet, wie es sich bereits bei cryopräservierten Proben empfohlen hatte. APAAP ist ein Akronym für *alkalisch Phosphatase anti - alkalische Phosphatase*. Die Präparate wurden nacheinander sowohl mit dem - entsprechend der unten aufgeführten Rezeptur für RPMI (Anhang 8.1) - verdünnten Primärantikörper als auch mit verdünntem Link - Antikörper (s.u.) und mit dem APAAP - Komplex je 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und zwischen jeder Inkubation viermal in Tris – Puffer (s. Anhang 8.2) gewaschen. Wiederholung der Inkuba-

tionen mit Link und APAAP für je zehn Minuten dienten der Verstärkung der Reaktion. Tabelle sechs zeigt die entsprechenden Antikörper der APAAP – Technik.

Tab.6 Antikörper der APAAP - Technik

Antikörper	Clone	Spezifität	Herkunft	Verdünnung in RPMI
APPAP	AP7/6/7	AP	Dako	1:50
LINK	Z 259	Kaninchen Anti Maus	Dako	1:25

Anschließend wurden die Objektträger unter ständigem Rütteln zur besseren Verteilung für 25 Minuten der Entwicklungslösung (s. Anhang 8.1) ausgesetzt.

3.6.2.3 DAB - Methode

Für die Östrogenrezeptor - und Progesteronrezeptor - Antikörperfärbung hat sich in der Routine bereits die DAB-Methode als günstig erwiesen. Bei dieser Methode wird ein Enzymkomplex (Streptavidin – Peroxidase) durch eine Entwicklerlösung aus *Diaminobenzylidintetrahydrochlorid* (DAB®) sichtbar gemacht. Um unerwünschte Kreuzreaktionen mit endogener Peroxidase zu verhindern, wurden die nach dem unter 3.6.1 beschriebenen Verfahren vorbehandelten Präparate für 30 Minuten in 3%ige Wasserstoffperoxyd-Lösung getaucht und anschließend ausgiebig mit Tris - Puffer gespült. Es folgten je 30 minütige Inkubationen mit dem in BSA - Puffer verdünnten Primärantikörper, dem biotinylierten Kaninchen - Anti – Maus - Antikörper (Link) und der Streptavidin - Peroxidase (Enzymkomplex). Zwischen den einzelnen Schritten wurde stets viermal mit Tris - Puffer gespült. Zur Entwicklung wurden die Objektträger acht Minuten mit DAB®-Lösung beschichtet.

3.6.3 Gegenfärbung und Eindecken

Im Anschluss an die oben beschriebenen Färbeschritte wurde bei beiden Methoden eine Gegenfärbung mit Hämalaun für 45 Sekunden vorgenommen. Daraufhin wurden die Präparate mit Glycergel® (DAKO) und Deckgläschen bedeckt.

3.7 Auswertverfahren (Datenevaluation)

Um den verschiedenen Reaktionsmodalitäten gerecht zu werden, bedurfte es für die verschiedenen Antikörpergruppen unterschiedlicher Verfahren der Auswertung.

3.7.1 Ermittlung des immunreaktiven Score (IRS) von Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Zur Bewertung der Hormonrezeptoren konnte das modifizierte Verfahren zur Ermittlung eines immunreaktiven Score nach Remmle und Stegner Anwendung finden.¹³⁴ Dabei wurden sowohl die überwiegend vorliegende Intensität (SI) der Färbereaktion als auch der Anteil positiver Zellen pro Präparat (PP) berücksichtigt. Die Bestimmung dieser beiden Modalitäten unterliegt der subjektiven Schätzung des Untersuchers, jedoch soll die Einschätzung des SI anhand des Vergleichs mit einer Positivkontrolle erfolgen (Abbott – Kit®). Codierung beider Informationen (SI und PP) in Kategorien von null bis drei (vier) und Multiplikation dieser ergeben den aussagekräftigen Endwert (Score) zwischen null und zwölf.

3.7.2 Beurteilung von MIB1

Zur Beurteilung der Mitoserate der Tumoren wurde die MIB-1-Immunreaktion herangezogen (1.2.1). Die Anzahl der positiven Zellen, das heißt in Teilung befindlicher Zellen, wurde in vier an verschiedenen Stellen des Tumors liegenden high-power-fields (HPF) ausgezählt ebenso wie die Gesamtzahl der in den HPF vorliegenden Zellen. Aus diesen Zahlen wurde dann der Prozentsatz positiver Zellen auf alle vorliegenden Zellen berechnet, im Schnitt ca. 250 Tumorzellen. Anschließend wurde die Wachstumsfraktion wie in Tabelle 7 eingeteilt:

Tab.7 Beurteilung der MIB-1-Immunreaktion

Anzahl pos. Zellen im HPF	Score
0 - 15%	0
15 - 50%	1
50 - 100%	2

3.7.3 Beurteilung der CD44 - Reaktion

In die Beurteilung der CD44-Reaktion gingen Intensität, Anteil positiver Zellen sowie Ort der Immunreaktion ein. Die Einteilung der Intensität erfolgte in drei Gruppen:

keine Reaktion (= null), schwache Reaktion (= eins) und starke Reaktion (= zwei).

Der Anteil der positiven Zellen wurde daraufhin abgeschätzt, ob er negativ war, unter fünf % - also fokal positiv, zwischen fünf und 75% (heterogen positiv) oder über 75% lag (homogen positiv) und dementsprechend mit null, eins, zwei oder drei bewertet.

3.7.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramms SPSS™. Neben der Kaplan - Meier – Analyse der Überlebensdaten erfolgte die Statistik mittels Chi-Quadrat-Test (Pearson), ggf. mit Fisher's Exact-Test bei kleinen Kollektivgrößen. Die für verschiedene Tests notwendige Einteilung erfolgte nach Klassifikationsstufen, die in den vorhergehenden Kapiteln dargestellt wurden. Zusätzlich wurden die Tests auch an dichotomisierten Daten durchgeführt, z.B. durch Gleichsetzung von null und eins (= null) sowie von zwei und drei (= eins). Zur multifaktoriellen Analyse des Kollektivs wurde mit Spearmans Korrelationen und der Coxschen Regressionsanalyse gearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Deskription des Mammakarzinomkollektivs

Es wurden für diese Studie 250 Patientinnen mit invasivem Brustkrebs nachbeobachtet, wobei der mittlere Beobachtungszeitraum sechseinhalb Jahre betrug. Minimal wurden die Patientinnen zwei Jahre nachkontrolliert, maximal 13 Jahre. Zur Beschreibung des Patientenkollektivs wurden zunächst das Alter der Patientinnen bei Studienbeginn und Studienende sowie die Überlebenszeit deskriptiv statistisch ermittelt (Tabelle 8).

Tab.8 Patientinnenalter und Überlebenszeitraum

	Mittelwert	Minimum	Maximum
Alter bei Studienbeginn (<i>Jahre</i>)	58,237	21,88	86,04
Alter bei Studienende (<i>Jahre</i>)	64,023	22,56	92,15
Überlebenszeitraum (<i>Monate</i>)	69,438	2,89	157,97

Von den Patientinnen waren bei Diagnosestellung 26 % prämenopausal, 13,2 % perimenopausal und 60,8 % postmenopausal. Während der Studiendauer erlitten 85 Patientinnen ein Tumorrezidiv. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Patientinnen bei Studienende lebten oder verstorben waren, wobei die Verstorbenen unterteilt wurden in Patientinnen, die durch das Karzinom verstarben und solche, die durch andere Erkrankungen ablebten (Tabelle 9).

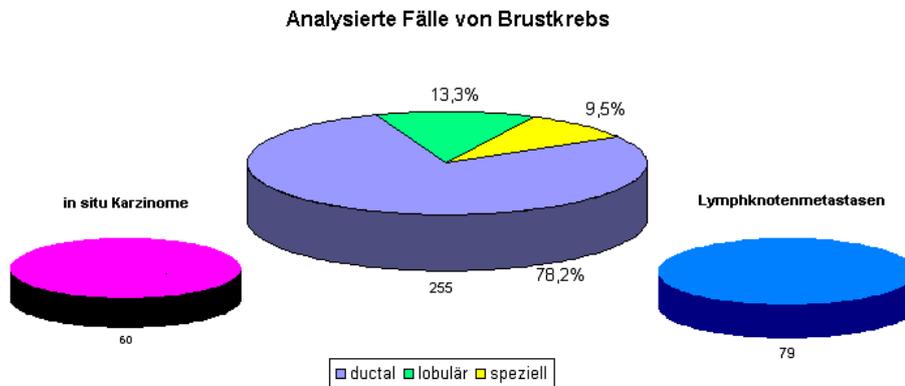
Tab.9 Überleben und Tod während der Studie

	Anzahl	Prozent
Pat. hat überlebt	157	62,80
Pat. ist verstorben	93	37,20
davon am CA verstorben	72	28,80

4.1.1 Allgemeine Klassifikation, Grading und pTNM

Die Ergebnisse der allgemeinen Klassifikation sind in Abb. 3 graphisch veranschaulicht. Im hier vorliegenden Kollektiv ließen sich unter den Primärtumoren 205 duktale und 22 lobuläre Karzinome sowie 28 Sonderfälle klassifizieren. Zusätzlich fanden sich 60 Carcinoma in situ, die neben den invasiven Tumoren bei einzelnen Patientinnen vorlagen, ferner 79 Lymphknotenmetastasen (Abb.3).

Abb.3 Häufigkeiten der allgemeinen Klassifikation



Das einheitlich neu durchgeführte Tumorgrading erfolgte nach der unter 3.5 beschriebenen Methode und führte zu den in Tabelle 10 gezeigten Ergebnissen:

Tab.10 Häufigkeiten der Tumorgrade

	Häufigkeit	%
G1	44	17,3
G2	131	51,3
G3	80	31,4
Gesamt	255	100

Die pTNM Klassifikation wurde aus den pathologischen Originalunterlagen übernommen und lag im Patientenkollektiv wie in Tabelle 11 und 12 vor:

Tab.11 Häufigkeit der Tumorgrößen

	Häufigkeit	%
pT₁	73	29,9
pT₂	130	53,3
pT₃	16	6,6
pT₄	25	10,2
Gesamt	254	100

Tab.12 Häufigkeiten des Nodalstatus

	Häufigkeit	%
pN₀	119	49,8
pN₁	104	43,5
pN_{2/3}	16	6,7
Gesamt	239	100

Fernmetastasen waren zum Zeitpunkt der Diagnose bei 16 Patientinnen dokumentiert. Wie unter 1.2.4 beschrieben, gehört auch der Befall der Haut zu den klassischen Prognosefaktoren und korreliert überzufällig häufig mit einem schlechten Krankheitsverlauf. Die überwältigende Mehrzahl der Patientinnen dieses Kollektiv zeigten keinen Befall der Haut, knapp 8 % zeigten eine Hautinfiltration (Tabelle 13):

Tab.13 Häufigkeit des Hautbefalls

	Häufigkeit	Prozent
kein Befall	226	91,9
exulzerierter Tumor	9	3,7
Befall des M. pectoralis	3	1,2
M.Paget der Mamille	6	2,4
mikroskop. Befall der Haut	2	0,8
Gesamt	246	100

Der Einbruch in Lymph – und Blutgefäße ist ein Zeichen fortgeschrittenen infiltrativen Wachstums und fand sich in einer Verteilung entsprechend Tabelle 14.

Tab.14 Verteilung von Lymph- und Hämangiosis carcinomatosa

Lymphangiosis carcinomatosaHämangiosis carcinomatosa

	Häufigkeit	Prozent	Häufigkeit	Prozent
Ja	103	42,2	3	1,2
Nein	141	57,8	241	98,8

4.1.2 Spezielle Histomorphologie

Wie unter 1.2.2. beschrieben, lassen sich die Tumoren neben der allgemeinen Klassifizierung zusätzlich nach histomorphologischen Gesichtspunkten in Untergruppen einteilen. Ihrer Mor-

phe nach wurden die Tumoren dieses Kollektivs in zwölf Subtypen unterteilt, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind. Zusätzlich sind die Häufigkeiten entsprechend ihres Vorkommens angegeben (Tabelle 15):

Tab.15 Häufigkeiten der verschiedenen histologischen Typen

Subtyp	Häufigkeiten	in Prozent
szirrhös	68	27,6
papillo - tubulär	60	24,4
solid - tubulär	26	10,6
solid -medullär	43	16,9
metaplastisch	2	0,8
lobulär, klassisch	11	4,3
lobulär, pleomorph	17	6,7
tubulär	10	3,9
kribriform	7	2,8
mucinös	4	1,6
papillär	1	0,4

Um aussagekräftige Fallzahlen zu erreichen, wurden die oben beschriebenen Wachstumsformen weiterhin unter Berücksichtigung ihrer engeren Verwandtschaft wie folgt zusammengefasst: Papilläre und papillo-tubuläre Wachstumsformen wurden zu einer Entität zusammengefasst, ebenso tubuläre und kribriforme. Die überwiegend solid strukturierten Tumorarten wurden summiert, ebenso die beiden lobulären Tumorklassen. Die wenigen sarkomatösen/metaplastischen Karzinome wurden den szirrhösen Wachstumsformen zugefügt, die Häufigkeiten sind in Tabelle 16 wiedergegeben:

Tab.16 Häufigkeit von Wachstumsformen engerer Verwandtschaft

Subtyp	Häufigkeiten	Häufigkeit in Prozent
szirrhös / metaplastisch	70	28,1
papillo - tubulär/ papillär	61	24,5
solid - tubulär/ -medullär	69	27,7
lobulär	28	11,2
tubulär/kribriform	17	6,8
mucinös	4	1,6
Gesamt	249	100

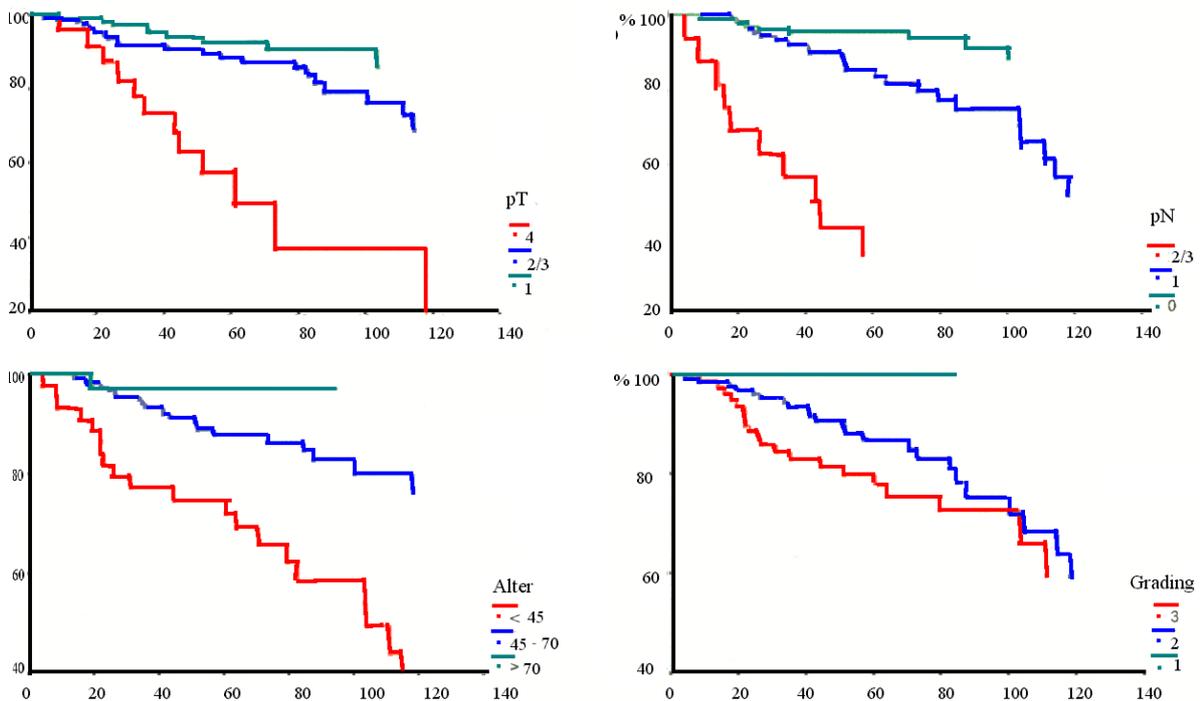
4.1.3 Korrelationen zu prognostischen Faktoren

Bei dem Vergleich der Wachstumsformen mit den klassischen prognostischen Faktoren zeigte sich eine hochgradig signifikante Korrelation der differenziert höher einzustufenden Wachstumsmuster zu niedrigem Grading ($\rho=0,473$; $p<0,01$), dem Hormonrezeptorstatus ($\rho=0,198$; $p<0,001$), geringer Expression des Proliferationsmarkers MIB1 ($\rho=0,185$; $p<0,01$) sowie signifikante Korrelationen zu geringem Nodalstatus ($\rho=0,153$; $p<0,05$) und geringer TumorgroÙe ($\rho=0,153$; $p<0,05$).

4.1.4 Korrelationen mit Überlebensfunktionen

Um die Zuverlässigkeit der erhobenen Daten weiterhin zu prüfen, wurden sowohl die morphologischen Daten als auch die bekannten prognostischen Faktoren in Bezug auf ihren Aussagewert für die Überlebensfunktionen getestet. Hier zeigten sich hochsignifikante Korrelationen zwischen den Überlebensdaten und Grading ($\rho=0,214$; $p<0,01$), Nodalstatus ($\rho=0,341$; $p<0,01$) und TumorgroÙe ($\rho=0,288$; $p<0,01$). Dementsprechend drücken sich auch die oben genannten Daten in der Kaplan-Meier-Analyse aus:

Abb.4: Kaplan-Meier-Kurven der klassisch prognostischen Faktoren in 250 Fällen von Brustkrebs



Überleben in Monaten

Korrelationen ließen sich auch zwischen den histologischen Typen mit hoher Differenzierung und langer rezidivfreier Zeit ($\rho=0,139$; $p<0,05$) sowie langer Überlebenszeit nachweisen ($\rho=0,128$; $p<0,05$).

4.2 Proliferationsmarker MIB1, Östrogen - und Progesteronrezeptor

4.2.1 MIB1

Die Bedeutung des MIB1 AK wurde bereits in Kapitel 1.2.3 dargestellt. In diesem Kollektiv fanden sich nur etwa 1/5 der Tumoren mit ihrer Wachstumsfraktion unterhalb der 15 % Grenze. Tabelle 17 gibt die gruppierten Häufigkeiten sowie die entsprechenden Prozentzahlen wieder.

Tab.17 Häufigkeit von MIB 1 Gruppierungen im Kollektiv

MIB1	Häufigkeit	%
< 15%	50	22,1
15 - 50%	165	73
> 50%	11	4,9
Gesamt	226	100

Diese Ergebnisse wurden dann mit den klassischen Prognosefaktoren, dem histologischen Typus und den Überlebensdaten in Beziehung gesetzt. Es liegen statistisch signifikante inverse Korrelationen von MIB 1 zum Alter der Patientinnen bei Studienbeginn ($\rho=-0,159$; $p<0,05$) sowie zur Überlebenszeit ($\rho=-0,179$; $p<0,01$) vor. Statistisch hochsignifikant ist ferner die Korrelation von hohen MIB 1 Werten zum karzinominduzierten Tod ($\rho=0,185$; $p<0,01$). Bezüglich der klassischen Prognosefaktoren finden sich jeweils hochsignifikante Zusammenhänge zum Nodalstatus ($\rho=0,209$; $p<0,01$), Tumorgröße ($\rho=0,227$; $p<0,01$) und Grading ($\rho=0,336$; $p<0,01$). Es besteht eine inverse Korrelation zum Östrogenrezeptorstatus ($\rho=-0,168$; $p<0,05$). Die Korrelation zur Progesteronrezeptorexpression war statistisch interessanterweise nicht signifikant. Auch zwischen niedrig differenzierten Wachstumsformen und hohem Anteil an MIB 1- positiven Zellen besteht eine hochsignifikante Korrelation ($\rho=0,185$; $p<0,01$).

4.2.2 Östrogen - und Progesteronrezeptor

Das vorhandene Tumormaterial wurde mit den unter 3.6.2.1 beschriebenen kommerziell erhältlichen Östrogen- und Progesteronrezeptor Antikörpern gefärbt.

Das Ergebnis waren nukleäre Anfärbungen, die in ihrer Qualität mit internen (unveränderten duktalem Epithelien) und externen Positivkontrollen vergleichbar waren. Die Tabelle 18 gibt die Expressionsverteilung der Steroidhormone innerhalb dieses Kollektivs wieder:

Tab.18 Expressionsverteilung der Steroidhormone

PR - IRS	Häufigkeit	%	ER - IRS	Häufigkeit	%
0	107	47,6	0	123	54,7
1	17	7,6	1	13	5,8
2	18	8	2	1	6,2
3	2	0,9	3	11	4,9
4	14	6,2	4	18	8
6	27	12	6	23	10,2
8	7	3,1	8	10	4,4
9	16	7,1	9	3	1,3
12	17	7,6	12	10	4,4
Gesamt	225	100	Gesamt	225	100

Zwischen dem Hormonrezeptorstatus und dem Alter ist statistisch auf dem 5% Niveau ein inverser Zusammenhang zu sichern ($\rho=0,137$; $p=0,042$), ebenso besteht eine Korrelation zum Menopausenstatus sowie der Hormonrezeptoren ($\rho=0,77$; $p<0,01$) untereinander. Die gegenläufige Beziehung zum Grading ist hochsignifikant ($\rho=0,343$; $p<0,01$), zu den hochdifferenzierten Wachstumsformen besteht eine geringere Korrelation ($\rho=0,16$; $p<0,01$).

4.3 CD44 - Isoformen

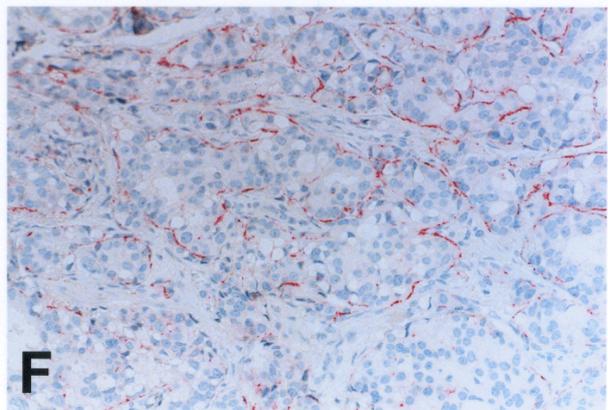
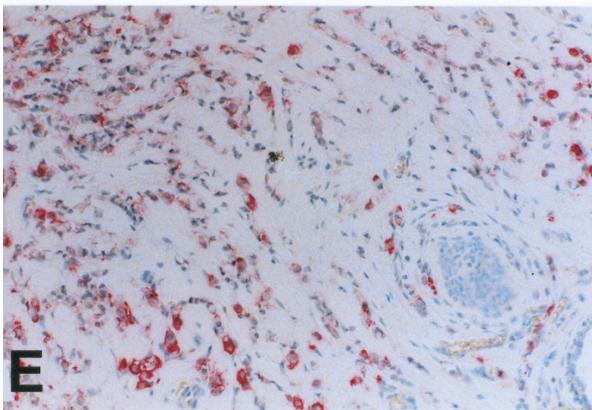
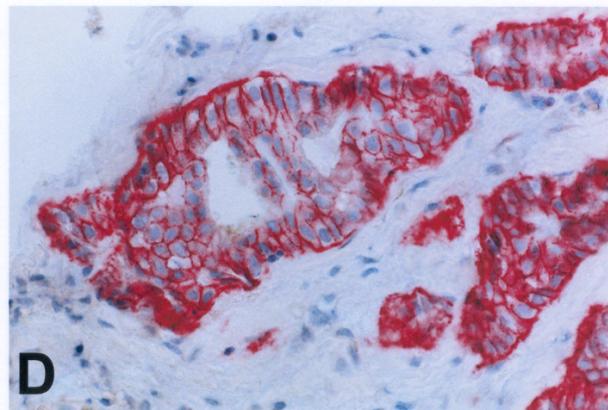
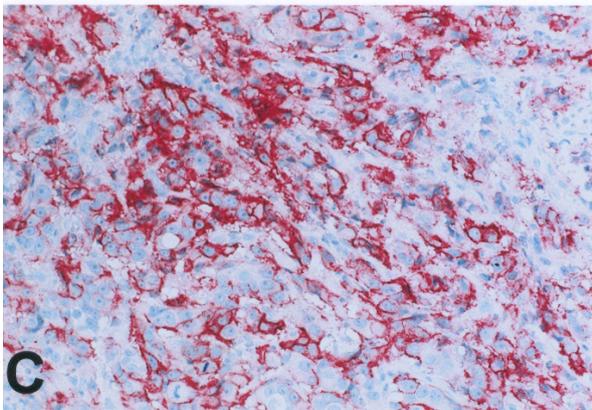
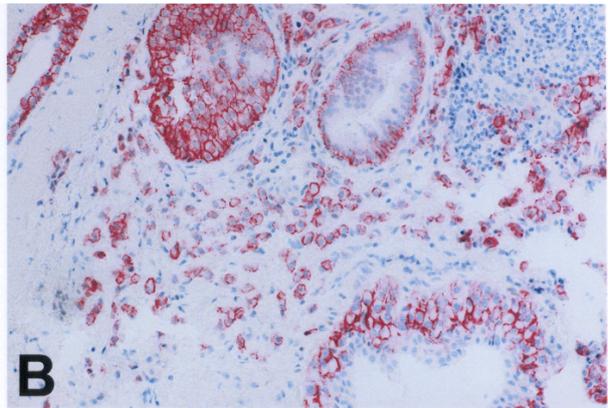
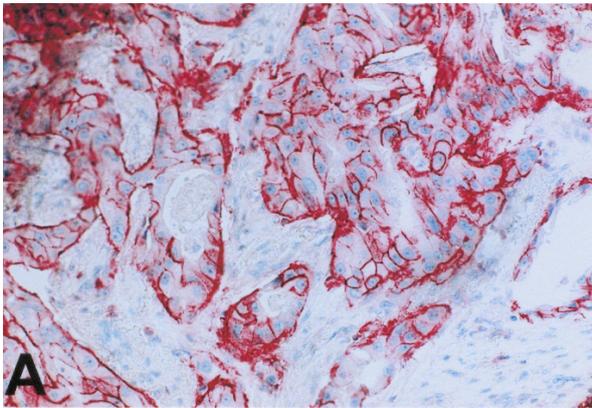
Die unter 3.6.2.1 genannten Antikörper gegen CD44 wurden am gesamten Kollektiv analysiert. Dabei entfielen aufgrund der schlechten Paraffingängigkeit die in Tabelle 4 aufgeführten Marker. Hier konnten trotz hoher Konzentrationen des Primärantikörpers und langen Vorbereitungszeiten in der Mikrowelle entweder keine ausreichenden Anfärbungen erzielt werden oder es zeigten sich unspezifische Anfärbungen des Stromas. Mit den AK der Tabelle 5 konnten einwandfreie Färbeergebnisse erzielt werden. Betrachtet wurde neben der Verteilung der CD44 - Moleküle im Tumor auch die Expression in Lymphknotengewebe und im in situ Karzinom. Die Anfärbungen waren sowohl für die invasiven Tumoren als auch für die Lymphknotenmetastasen ausgesprochen heterogen. So fanden sich neben vollständig negativen Tumoren auch überwiegend positiv reagierende Tumoren sowie gering und stark reagierende Fälle.

Auch die Carcinoma in situ zeigten kein einheitliches Expressionsmuster. Beispiele für die Immunreaktivitäten sind in Abbildung 5 gezeigt.

Abb.5: CD 44 Isoformen bei invasiven und in situ Mammakarzinomen

Die Immunreaktion stellt sich rotfarbig dar.

- A: CD 44s (BBA 10) wird von diesem metaplastischen Karzinom intensiv exprimiert.(APAAP, x 80)
- B: Neben invasiv lobulären Karzinomanteilen exprimiert auch das in situ Karzinom mit pagetoidem Ausbreitungsmuster innerhalb der aufgeweiteten Gangstrukturen CD44v3.(APAAP, x 80)
- C: Zeigt die Übersicht eines stark CD44v5 positiven invasiven duktales Karzinoms.(APAAP, x 80)
- D: Das Expressionsmuster von CD44v6 am Beispiel eines duktales in situ Karzinoms. (APAAP, x 160)
- E: Zeigt die Übersicht eines heterogen CD44v6 exprimierenden Tumors von invasiv - lobulärem Typ mit den typischen gänsemarschartig angeordneten Tumorzellen. (APAAP, x 80)
- F: In diesem invasiven Karzinom vom kribriformen Typ zeigt sich die Expression von CD44v9 an den basalen, dem Stroma zugewandten Polen der Tumorzellen. (APAAP, x 80)



4.3.1 Standardform CD44s

Der AK BBA 10 gegen das CD44-Standardmolekül zeigt wenig zytoplasmatische Reaktion, angefärbt wurde vor allem die dem Bindegewebe zugewandte Seite der Brustdrüsenzellen mit basolateraler Betonung. Wie Tabelle 19 zeigt, findet sich CD44s in fast allen Tumoren, Lymphknoten und Carcinoma in situ. Die meisten Tumoren exprimieren CD44s jedoch heterogen. Rein positive und rein negative Tumoren sind selten.

Es ließ sich eine deutliche Korrelation zwischen der Expression von CD44s im invasiven Tumor und korrespondierenden Lymphknoten nachweisen. Eine Korrelation von Expression im CIS zu der im Lymphknoten (Fallzahl n=17) bzw. von Expression im CIS und invasiven Karzinom war statistisch nicht zu beweisen.

Tab.19 Häufigkeiten und Korrelationen von CD44s in verschiedenen Geweben

CD44s Expression	CIS		Invasiver Tumor		LK	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0%	2	4,3	15	6,6	13	14,1
< 5%	9	19,1	71	31,4	28	30,4
5 - 75%	27	57,5	120	53,1	34	37
> 75%	9	19,1	20	8,8	17	18,5
Gesamt	47	100	226	100	92	100

$$r = 0,316; p = 0,32; n = 46$$

$$r = 0,551; p < 0,01; n = 73$$

$$r = 0,105; p = 0,688; n = 17$$

4.3.2 Variante Formen CD44-v

4.3.2.1 CD44v3

Die Verteilung der Expression der Variante v3 ist von der Standardform geringgradig verschieden. Im Tumor und Lymphknoten liegen mehr negative bzw. schwach positive Fälle vor als stark positive. Die Verteilung in den in situ Karzinomen verschiebt sich jedoch zugunsten der positiven Fälle (Tabelle 20).

Eine statistisch relevante Korrelation liegt hier allerdings nur zwischen der Expression im Tumor und in der korrespondierenden Lymphknotenmetastase vor.

Tab.20 Häufigkeit und Korrelationen von CD44 v3 in verschiedenen Geweben

CD44 v3 Expression	CIS		Invasiver Tumor		LK	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0%	3	6,7	68	30,1	34	36,6
< 5%	12	26,6	70	31	23	24,7
5 - 75%	27	60	69	30,5	23	24,7
> 75%	3	6,7	19	8,4	13	14
Gesamt	45	100	246	100	93	100

 $r = -0,082; p = 0,601; n = 43$
 $r = 0,569; p < 0,01; n = 74$
 $r = -0,394; p = 0,146; n = 15$

Der AK BBA11 gegen das v3 Epitop erzielte insgesamt eine geringe Färbeintensität, jedoch war diese zur Beurteilung der Expressionsquantität ausreichend. Es bestand vereinzelt eine geringe zytoplasmatische Reaktion.

4.3.2.2 CD44v5

Der AK VFF 8 gegen die Variante 5 war der einzige AK, der eine deutliche zytoplasmatische Reaktion hervorrief. Trotzdem war stets die Anfärbung der Zellmembran von der zytoplasmatischen Färbung abgrenzbar.

Ähnlich wie bei der Variante v3 bestand hier nur eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von CD44v5 in Tumor und Lymphknotenmetastase. Die Verteilung des v5 Epitops war in allen drei Geweben ähnlich, lediglich im CIS lag eine etwas geringere Zahl negativer Tumoren vor.

Tab.21 Häufigkeit und Korrelationen von CD44v5 in verschiedenen Geweben

v5 Expression	CIS		Invasiver Tumor		LK	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0%	1	3	43	19,2	17	19,1
< 5%	8	24,2	55	24,6	20	22,4
5 - 75%	19	57,6	95	42,4	37	41,6
> 75%	5	15,2	41	13,8	15	16,9
Gesamt	33	100	234	100	99	100

 $r = 0,145; p = 0,418; n = 33$
 $r = 0,570; p < 0,01; n = 68$
 $r = 0,211; p = 0,558; n = 10$

4.3.2.3 CD44v6

Der AK BBA 13 erwies sich als besonders zuverlässig, eine zytoplasmatische Reaktion fand sich nicht. Hier zeigen sich statistische Signifikanzen zwischen den Verteilungsmustern der Expression von CD44 v6 in CIS und invasivem Tumor sowie zwischen invasivem Tumor und Lymphknotenmetastase. Das Verteilungsmuster in den verschiedenen Gewebepositionen des Tumors ähnelt dem der beiden vorangegangenen Varianten. Auch hier erschienen im CIS weniger nicht-exprimierende Zellen vorzuliegen als im invasiven Anteil der Tumoren (Tabelle 22).

Tab.22 Häufigkeit und Korrelationen von CD44v6 in verschiedenen Geweben

CD44 v6 Expression	CIS		Invasiver Tumor		LK	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0%	3	6	20	9	18	19,4
< 5%	7	14	57	25,6	20	21,5
5 - 75%	24	48	100	44,8	36	38,7
> 75%	16	32	46	20,6	19	20,4
Gesamt	50	100	223	100	93	100

$$r = 0,414; p = 0,004; n = 47 \quad r = 0,604; p < 0,01; n = 73$$

$$r = 0,264; p = 0,305; n = 17$$

4.3.2.4 CD44 v9

Der AK gegen die Variante 9 (11-24) zeigte eine saubere Anfärbung der basolateralen Membranregionen, zytoplasmatische Reaktionen lagen nicht vor.

Auch hier ist, wie bei allen bereits beschriebenen Varianten, das Expressionsmuster sehr heterogen. Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Verteilungsmuster von CD44 v9 im invasiven Tumor und Lymphknotenmetastase.

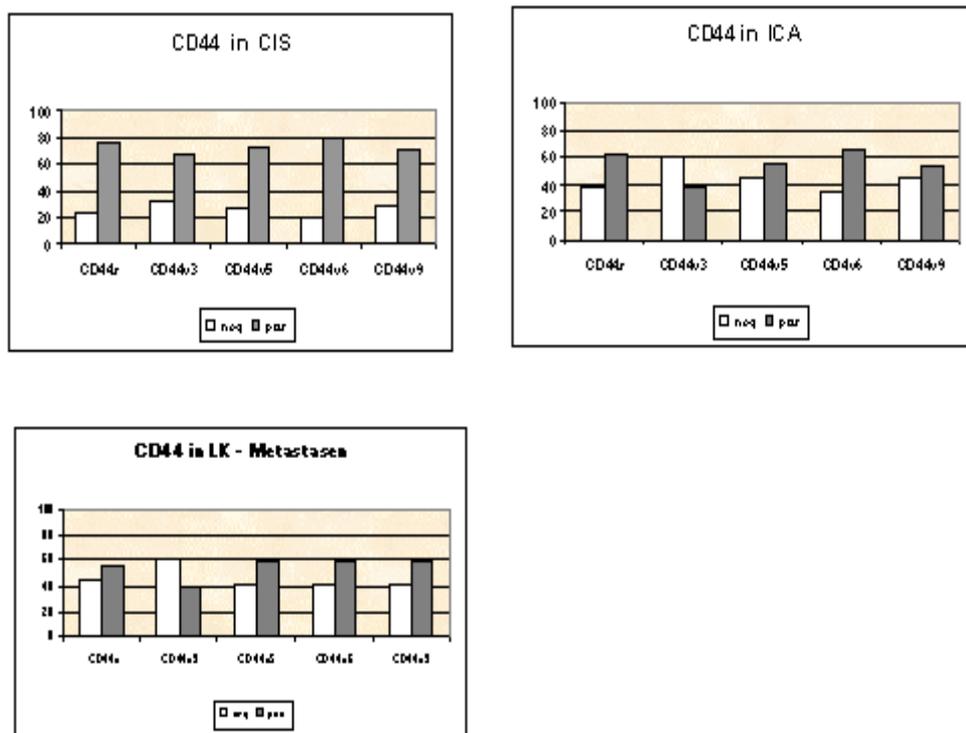
Tab.23 Häufigkeit und Korrelationen von CD44v9 in verschiedenen Geweben

v9 Expression	CIS		Invasiver Tumor		LK	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0%	3	4,8	36	16,3	19	21,3
< 5%	16	25,4	65	29,4	18	20,2
5 - 75%	37	58,7	80	36,2	28	31,5
> 75%	7	11,1	40	18,1	24	27
Gesamt	63	100	221	100	89	100

 $r = 0,194; p = 0,148; n = 58$
 $r = 0,650; p < 0,01; n = 67$
 $r = 0,2; p = 0,148; n = 21$

Im Vergleich der dichotomisierten Daten fällt auf, dass sich das Verhältnis positiver zu negativen Tumoren in invasiven Tumorgeweben mit Ausnahme der Variante 3 stark ähnelt. Sowohl im Primärtumor als auch in den Lymphknotenmetastasen überwiegen die positiven Fälle (= Tumoren mit mehr als 5% immunreaktiver Zellen). Rund 40% der Tumoren sind demnach als CD44 negativ zu werten, 60% als positiv. Das Verhältnis von positiven zu negativen Tumoren ist nur für die Variante v3 umgekehrt (Abbildung 6). In in situ Karzinomen sind die Expressionsmuster dagegen für alle Varianten und das Standardmolekül gleich (Abb.6). Insgesamt liegen hier ca. 10% mehr CD44 exprimierende Zellen vor als in den invasiven Tumoranteilen. Für CD44v3 hat der Anteil der positiven Fälle im invasiven Tumor dagegen um mehr als 30% im Vergleich zum in situ Karzinom abgenommen, wohingegen sich das quantitative Verhältnis der Expression im Primärtumor und Lymphknotenmetastase annähernd entspricht. Diese Ergebnisse decken sich mit den Interkorrelationen, die in den Tabellen 19 bis 23 dargelegt wurden. Hier ließen sich signifikant gleichsinnige Interkorrelationen zwischen der Expression in invasivem Tumorgewebe und Lymphknotenmetastasen darstellen, die Sonderstellung von CD44v3 konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Abb.6 Verteilung der CD44 - Isoformen in CIS, ICA und Lymphknoten



4.4 Multifaktorielle Analysen

Zwischen den CD44 - Isoformen zeigten sich in der Rang – Korrelationsanalyse nach Spearman hochgradig signifikante Abhängigkeiten bzw. Interkorrelationen, und zwar nicht nur - wie zu erwarten - zwischen den Varianten und der Standardform, sondern auch der einzelnen Varianten untereinander. Das heißt, wenn eine CD44 Isoform exprimiert ist, ist auch die Wahrscheinlichkeit der Co – Expression anderer varianter Exons sehr hoch (Tab. 24).

Tab.24 Korrelationen zwischen CD44s und v in invasivem Tumorgewebe

		CD44v3	CD44 v5	CD44 v6	CD44 v9	CD44s
CD44v3	rho		0,449	0,55	0,518	0,502
	Sig.		p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01
	n		219	219	218	223
CD44v5	rho			0,418	0,41	0,251
	Sig.			p<0,01	p<0,01	p<0,01
	n			216	214	219
CD44v6	rho				0,538	0,398
	Sig.				p<0,01	p<0,01
	n				213	218
CD44v9	rho					0,47
	Sig.					p<0,01
	n					217

Extrem deutliche und höchst signifikante Abhängigkeiten der Varianten untereinander betrafen die invasiven Karzinome und die Lymphknotenmetastasen (nicht gezeigt). Hatte die Variante CD44v3 in der deskriptiven Statistik eine Sonderstellung mit vermehrt negativen Fällen eingenommen, korrelierte sie dennoch in der multivariaten Analyse mit den übrigen Isoformen, allerdings auf niedrigem Expressionsniveau.

4.4.1 Korrelation von CD44 - Isoformen im invasiven Primärtumor zu prognostischen Faktoren

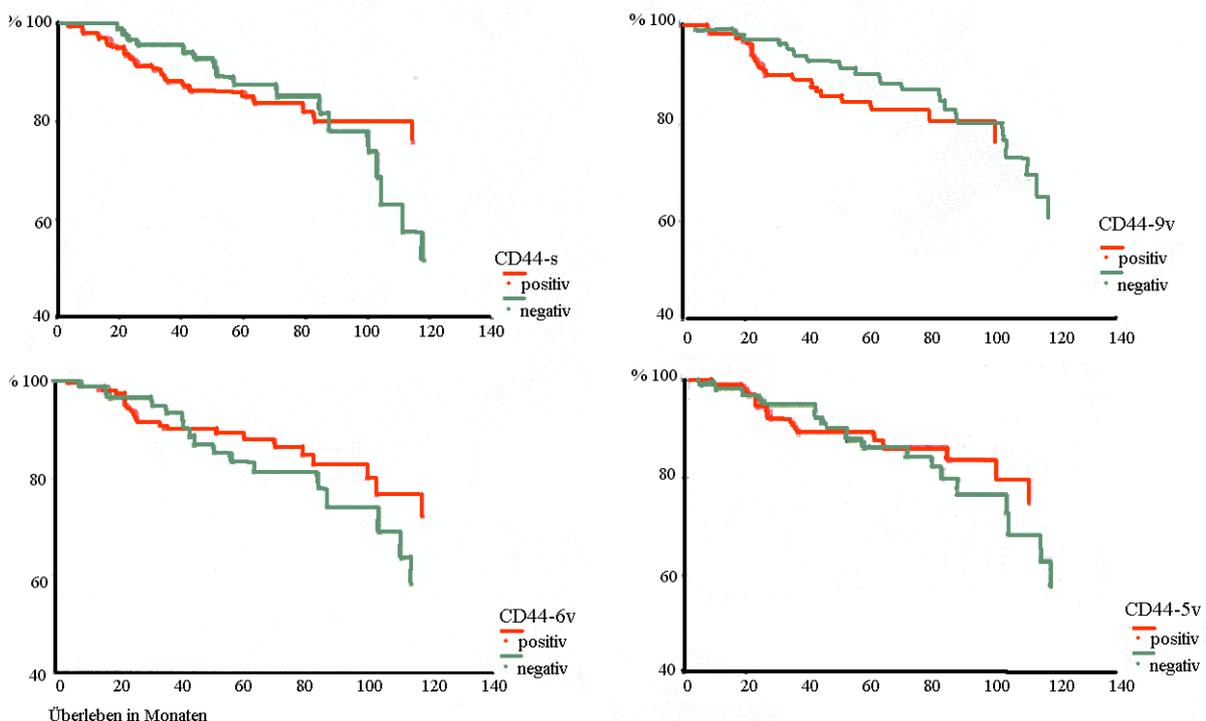
Die multifaktorielle Analyse der CD44 - Expression im invasiven Primärtumor ergab im Vergleich zu den klassischen Prognosefaktoren einige signifikante Korrelationen. Der Antikörper gegen v6 ergab eine inverse Korrelation mit der Tumorgröße sowie eine gleichsinnige Beziehung zum Hormonrezeptorstatus (Tab.25) und dem Menopausenstatus. v6 war außerdem mit der tubulären Wachstumsentität signifikant assoziiert (nicht gezeigt). Für die Expression des Standardmoleküls sowie von v9 ergab sich eine schwache, inverse Korrelation zum Tumorstadium. CD44s korrelierte invers mit MIB1 im Gewebe, d.h. geringe Expression von CD44s ging mit erhöhter proliferativer Aktivität einher. v3 korrelierte gleichsinnig zum Alter bei Tumoraufreten und zum Hormonrezeptorstatus.

Tab.25 Korrelation von CD44 im Primärtumor zu prognostischen Faktoren

		CD44v3	CD44v5	CD44v6	CD44v9	CD44s
Alter	rho	0,149				
	p	0,025				
	n	226				
Menopause	rho			0,149		
	p			0,026		
	n			215		
OST	rho				0,182	
	p				0,007	
	n				221	
pT	rho			-0,156		
	p			0,02		
	n			222		
Hormonrezeptor	rho	0,168		0,15		
	p	0,014		0,028		
	n	216		214		
MIB-1	rho					-0,167
	p					0,02
	n					194

Im Prinzip war die Expression von CD44s und Varianten ganz überwiegend mit günstigen prognostischen Indikatoren korreliert. Dies deutet am ehesten auf eine Beziehung zu Prozessen der Tumordifferenzierung hin. Die Kaplan-Meier-Analysen konnte weder im Log-Rank-Test, im Testverfahren nach Breslow oder Tarone-Ware eine Beziehung zu den Überlebensdaten mit aussagekräftigen Parametern und Signifikanzen nachweisen. Dies gilt sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben. Abbildung 7 zeigt die grafische Darstellung der CD44 - Isoformen im untersuchten Kollektiv bezüglich des Gesamtüberlebens. Auf die Darstellung bzgl. des rezidivfreien Überlebens wird hier verzichtet, da sich aufgrund der fehlenden Signifikanzen hier keine wesentlichen Abweichungen ergeben. In der Abb.7 ist auf den Abszissen die Überlebenszeit in Monaten, auf den Ordinaten das kumulative Überleben in Prozent dargestellt.

Abb.7 Kaplan – Meier-Überlebensfunktionen der CD44 - Isoformen in 250 invasiven Mammakarzinomen



4.4.2 Korrelation von CD44 in Lymphknotenmetastasen zu prognostischen Faktoren

Interessanter Weise lag ein hochgradig signifikanter Zusammenhang für die Expression aller Varianten in den Lymphknotenmetastasen und dem Hormonrezeptorstatus vor, für die Varian-

ten v3, v5 und v6 bestand außerdem eine inverse Korrelation zu dem Proliferationsmarker MIB1 (Tabelle 26). Beides deutet wiederum auf eine Bedeutung von CD44 als günstigem prognostischen Faktor hin.

Weder für die Expression der CD44 - Isoformen im invasiven Karzinom noch im in situ Karzinom konnte eine statistisch signifikante Beziehung zu den Überlebensfunktionen hergestellt werden.

In der multifaktoriellen Analyse konnte jedoch für eine Reihe von Isoformen eine inverse Korrelation der Expression in Lymphknotenmetastasen zum rezidivfreien Überleben und zum durch das Mammakarzinom verursachten Sterben hergestellt werden. Auffällig ist hier, dass nur die Variante CD44v6 keine Korrelationen zu den Überlebensdaten aufweist (Tabelle 26).

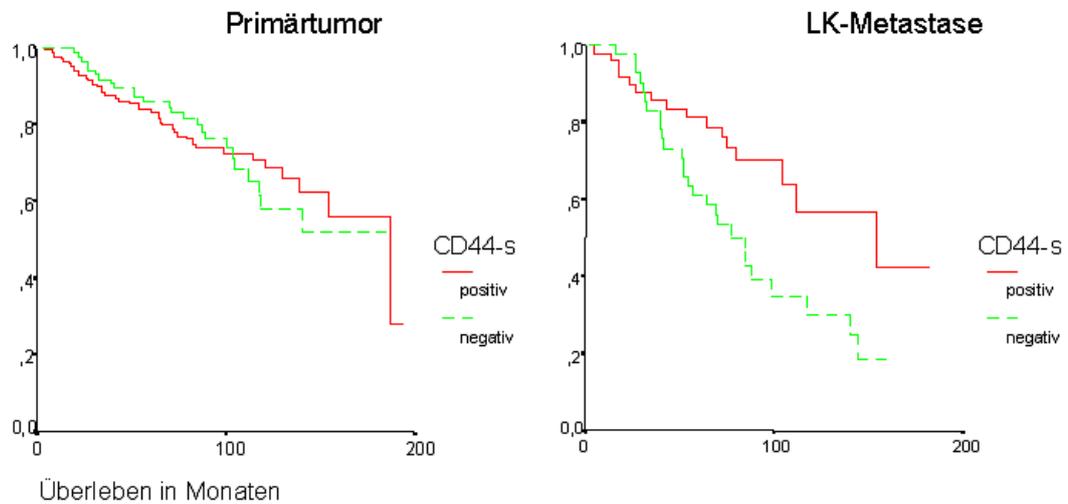
Invers bedeutet in dieser Darstellung, dass die Expression der CD44 - Isoformen mit einer günstigen Prognose verknüpft ist, d.h. eher als molekularer Differenzierungsmarker des Tumors zu interpretieren ist.

Tab.26 Korrelationen von CD44 in Lymphknotenmetastasen zu prognostischen Faktoren

		CD44v3	CD44v5	CD44v6	CD44v9	CD44s
Rezidivfreies	rho	-0,238	-0,222		-0,303	-0,282
Überleben	p	0,03	0,047		0,006	0,01
	n	83	81		80	83
Tod durch	rho	-0,243			-0,283	-0,307
Mammakarzinom	p	0,019			0,007	0,003
	n	93			89	92
pT	rho	-0,211				
	p	0,044				
	n	92				
Hormonrezeptor	rho	0,303	0,437	0,344	0,218	
	p	0,003	<0,01	0,001	0,041	
	n	92	88	92	88	
MIB-1	rho	-0,26	-0,356	-0,324		
	p	0,038	0,005	0,009		
	n	64	61	64		

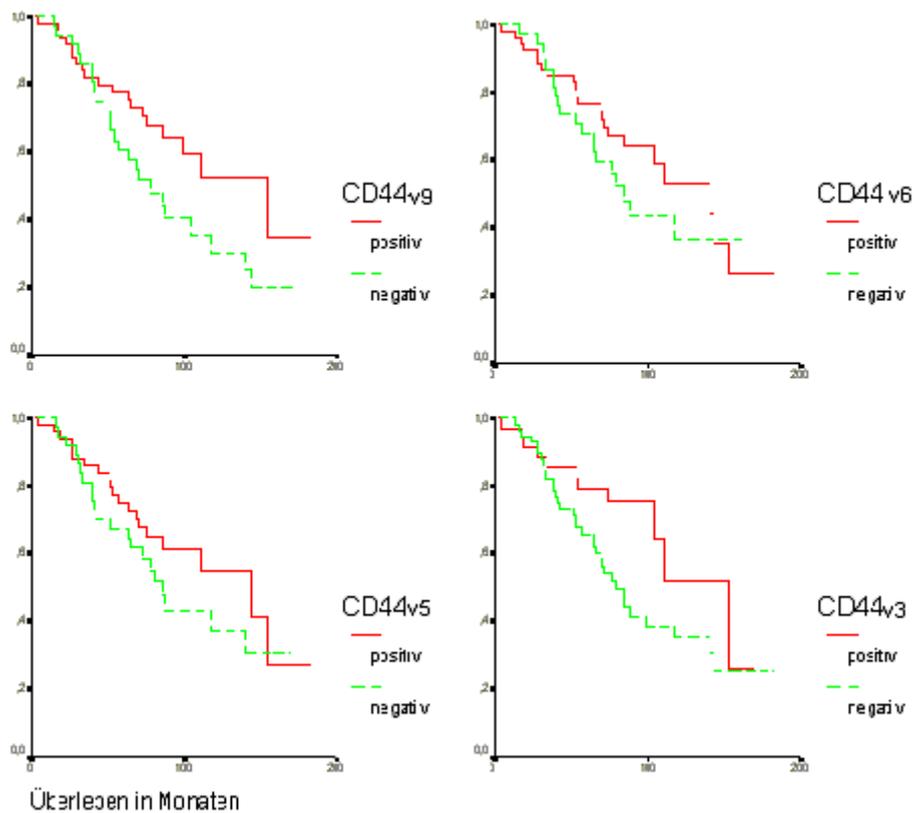
Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte nun auch eine signifikante Beziehung (Log Rank 6,13, $p=0,013$; Breslow 4,29, $p=0,038$; Tarone-Ware 5,37, $p=0,0020$) zwischen Expression von CD44s in Lymphknotenmetastasen und längeren Überlebenszeiten, einen Zusammenhang, der für die Expression im Primärtumor noch nicht nachzuweisen war (Abb.8).

Abb.8 Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen von CD44s im Primärtumor und Lymphknotenmetastase



Im Gegensatz dazu haben die Unterschiede für das Überleben bei vorhandener bzw. fehlender Expression der Varianten im Lymphknoten eine Signifikanz nur knapp verfehlt (Abb. 9).

Abb.9 Kaplan-Meier-Überlebensfunktionen von CD44v in Lymphknotenmetastasen



5. Diskussion

Die Kausalität für Tumorprogression und Metastasenbildung ist in ihrer Komplexität bisher nur abstrakt verstanden. Daher waren die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Günthert, Zoller, Ponta und Herrlich, die 1991 vermuten ließen, dass ein einziges Molekül in einer spezifischen Isoform, CD44v6, in der Lage ist, metastatisches Potential auf Tumorzellen zu transferieren, Aufsehen erregend.⁶¹ Dies gab Anlass zu der Hoffnung, dass ein grundlegender und einzelner Mechanismus, der zur Entwicklung von Malignität in Tumoren führt, erkannt wurde. Viele Arbeitsgruppen versuchten daraufhin, die am Modell einer Pankreaskarzinom-Zelllinie erhobenen Befunde an menschlichen Tumoren nachzuvollziehen und die tumorbiologische Relevanz von CD44 und seinen Isoformen zu prüfen.^{95,159} Die vorliegende Arbeit ist Teil dieser Bemühungen, da rasch monoklonale Antikörper hergestellt wurden, die den direkten Nachweis der Expression verschiedener CD44 - Isoformen in Tumorgewebe zulassen.¹⁰⁶

Allerdings widersprechen sich die Ergebnisse der verschiedenen Forschungsgruppen und nur für wenige Tumoren kann eine Korrelation der CD44 - Expression zu klinischen oder pathologischen Daten als gesichert gelten. Beim Magenkarzinom zum Beispiel wurde eine Assoziation bestimmter CD44-Varianten zu unterschiedlichen histologischen Tumortypen festgestellt.^{93,96,149} In kolorektalen Karzinomen fehlt offenbar die Verbindung von CD44 - Isoformen zur Malignität der Tumoren.⁵⁷ Einige Untersucher berichten sogar über den Verlust der Expression von CD44v6 in malignen Geweben.^{60,141} Am widersprüchlichsten stellen sich die Befunde unterschiedlicher Studien bzgl. der Bedeutung von CD44 aber für das Mammakarzinom dar. Hier reicht das Spektrum von der Erkenntnis, CD44 - Isoformen seien kein unabhängiger Faktor und eher als Differenzierungsmarker zu begreifen,^{49,84} bis hin zu dem Postulat, CD44v6 sei ein entscheidender und unabhängiger Prognosefaktor, der mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliere.⁸⁷ Letztere Studie ist aus dem Umfeld des eigenen Arbeitskreises offen kritisiert worden.⁴⁷ Nachfolgende Studien beschreiben Änderungen des CD44-Expressionsmodells bereits in frühen Stadien der Tumorprogression, wobei diese in der Beurteilung prämaligener Veränderung möglicherweise helfen können.^{8,19,29}

Aufgrund der uneinheitlichen und unklaren Wertung von CD44 werden in der vorliegenden Dissertation seine wichtigsten Isoformen beim menschlichen Mammakarzinom analysiert. Mit auf Zuverlässigkeit geprüften monoklonalen Antikörpern wird die prognostische Bedeutung dieser Gruppe von Adhäsionsmolekülen an Paraffinmaterial eines repräsentativen und aussagekräftigen Patientenkollektivs abgeschätzt. Dies geschieht im Vergleich zu anerkannten patho-

logischen und molekularen Prognosekriterien und einer langen Nachbeobachtungszeit der Patientinnen. Die generelle und signifikante Übereinstimmung der klassischen Faktoren (siehe 4.1 und 4.2) mit der etablierten Literatur legt nahe, dass die Grundvoraussetzungen und Anforderungen an das untersuchte Patienten- und Tumorkollektiv sicher erfüllt wurden.⁶⁴ Digitalisierte Daten und eine Software-gestützte Evaluation können hier ferner der umfassenden und objektiven Auswertung dienen.

In situ Karzinome

Betrachtet man die in situ Karzinome, so verhalten sich alle Isoformen gleichartig. Ein Großteil der Tumoren ist für alle Isoformen positiv. Dies stimmt mit dem Wissen überein, dass vor allem die Standardform des Moleküls auch in gesundem Brustgewebe und nicht malignen Veränderungen vorkommt.⁴⁸

In multifaktoriellen Untersuchungen lässt sich kein Zusammenhang zwischen Expression von CD44s oder v im in situ Karzinom und den Prognosefaktoren herstellen. Das Vorhandensein oder Fehlen der Expression zeigt ebenfalls keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf.

Invasive Tumoren

Zunächst fällt bei den quantitativen Erfassungen auf, dass die Expression von CD44v3 in Primärtumoren eine Sonderstellung einzunehmen scheint. Im Gegensatz zu allen übrigen Isoformen und zu seinem Vorkommen im in situ Karzinom exprimiert mehr als die Hälfte der Fälle dieses Exon nicht, was ein erster Hinweis darauf sein kann, dass ein Zusammenhang besteht zwischen maligner Transformation und Verlust der Expression von v3. Trotzdem korreliert CD44v3 gleichsinnig und hochsignifikant mit den übrigen Isoformen und dem Standardmolekül in den multifaktoriellen Analysen (Tab.25). Es liegt also gleichartiges Verhalten auf abgeschwächtem Expressionsniveau vor.

Auch die übrigen Formen von CD44 weisen eine starke Interkorrelation auf. Diese Konkordanz der verschiedenen Varianten mit der Standardform zeigt sich auch im lichtmikroskopischen Vergleich. Damit entsprechen die Ergebnisse der Tatsache, dass bei zellulärer Expression der CD44 Varianten immer auch der Standardanteil des CD44 - Moleküls vorhanden ist (vgl. Abb.1), da die Varianten durch zusätzliche Insertion von Produkten alternativen Splicings in das Standardmolekül entstehen. Bei der Untersuchung der CD44 - Isoformen auf Korrelationen mit klassischen Prognosefaktoren und klinischem Verlauf zeigen vor allem die Varianten

v3 und v6 viele Signifikanzen, so z.B. mit höherem Patientenalter, erhaltenen Hormonrezeptoren und eine gegenläufige Beziehung zum Tumorstadium. V6 korreliert zusätzlich noch mit tubulärer, also histologisch differenzierter Tumorwachstumsform. Die Tendenz zu positiven Prognoseparametern manifestiert sich auch bei der Isoform v9 (korreliert mit langem Überleben) und der Standardform (Korrelation zu niedrigem Nodalstatus und geringer Tumorstadiumsfraction). Lediglich Isoform v5 zeigt keine Beziehung welcher Art auch immer zu Prognosefaktoren oder klinischem Verlauf. Insbesondere die Isoformen v3 und v6, in geringerem Maße auch v9 und s, können damit als Differenzierungsmarker angesehen werden. Ihr Erhalt in invasivem Gewebe zeugt vom Erhalt einer gewissen ursprünglichen Differenzierung und ist damit eher Hinweis auf eine günstigere Prognose.

Lymphknotenmetastasen

Die Expression von CD44 im invasiven Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastasen zeigen eine starke Korrelation. Der Erhalt dieses Moleküls im invasiven Tumor setzt sich also in der LK - Metastase fort. Fälle, die in der Metastase CD44 neu exprimieren, spielen also statistisch gesehen eher keine Rolle. Dementsprechend zeigen sich hochsignifikante Korrelationen zwischen der Expression von CD44 und günstigen prognostischen Faktoren. Insbesondere v3 ist hochsignifikant mit niedrigem Tumorstadium, geringer Tumorstadiumsfraction, erhaltenem Hormonrezeptorstatus, langem rezidivfreien Überleben und selten mit Tod durch das Mammakarzinom korreliert. Auch v9 und s zeigen in dieser Studie Verbindung mit positivem klinischen Verlauf (langem rezidivfreien Überleben und seltenerem Tod durch Brustkrebs). Hier zeigt auch Variante 5 eine Korrelation zu positiven Prognosefaktoren (erhaltenem Hormonrezeptorstatus und geringer Wachstumsfraction) sowie klinischem Verlauf (langes rezidivfreies Überleben). Die erzielten Ergebnisse an Lymphknotenmetastasen sind hoch- bis höchstsignifikant (auf kleiner 0,01% Niveau), während die meisten Korrelationen auf Primärtumorebene auf unter 0,05% Niveau signifikant waren.

Erhaltene CD44 - Expression in Metastasen erweist sich jetzt auch als günstiger Einfluss auf die Überlebensdaten. Für das Standardmolekül zeigt sich dies auch in den Kaplan-Meier-Kurven (Abb.8). Diese Tendenz ist angedeutet auch für die Varianten erkennbar, auch wenn hier die Signifikanz in der Kaplan-Meier-Statistik knapp verfehlt wurde (Abb.9). Hier lässt sich spekulieren, dass die fehlende Signifikanz durch relativ niedrige Fallzahlen bedingt ist und bei Auswertung eines größeren Kollektivs wahrscheinlich wäre.

Als unabhängiger prognostischer Faktor ist CD44 damit nicht geeignet, das Molekül kann jedoch als Differenzierungsmarker (besonders deutlich bei den Varianten v3 und v6) verstanden werden und gibt eher Hinweis auf eine günstige Prognose. Die neuen Erkenntnisse bezüglich der Verbindung des CD44 - Rezeptors mit dem Zytoskelett und seines Vorkommens an den lateralen Zellmembranen, wo die Zellen untereinander Kontakte bilden, die die Bildung von Geweben ermöglichen,¹²¹ stehen dazu in gutem Einklang.

Die Bedeutung von CD44 für die Metastasierung ist damit noch ungeklärt. Der Unterschied zwischen den klinisch erhobenen Daten und den Ergebnissen des Rattenmodells legt nahe, dass dieses Modell nicht den komplexen Vorgang der Entwicklung von maligner Potenz erklären kann. Die Tatsache, dass mit CD44v6 metastatisches Potential in einem Rattentumormodell übertragen wurde, mag viele Ursachen haben. Die im Modell verwendeten Zelllinien entsprechen offenbar nicht mehr einem natürlichen Tumor, der sich an Ort und Stelle entwickelt hat und im umgebenden Ursprungsgewebe normalen Zellkommunikationen unterliegt.

Solange die tatsächliche Funktion von CD44s und -v in Organen nicht erforscht ist, werden weiterhin widersprüchliche Ergebnisse für verschiedene Tumoren und deren Abhängigkeit von CD44 unerklärbar bleiben. Derzeit versuchen einige Forschungsgruppen sowohl die Funktion als auch die Wirkmechanismen der Signaltransduktion des CD44 - Moleküls zu erforschen und so die Änderungen, die durch Bindung von Molekülen an CD44 entstehen, offen zu legen.^{104,139} Auch das Verständnis der Regulationsmechanismen für alternatives Splicing der mRNA ist notwendig, um zu verstehen, wie und zu welchem Zweck bestimmte Splicingprodukte exprimiert werden und andere nicht.⁴⁵ Dabei kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese Mechanismen in allen Organen gleich sind.⁵³

Die Erforschung der Bedeutung von CD44 in immunologischen Zellen ist schon weiter fortgeschritten und hat bereits Eingang in gängige Modelle gefunden. Die Tatsache, dass CD44 auf T-Zellen und Granulozyten diesen Zellen die Extravasation in infizierte Gewebe und Adhäsion an Zellen sowie die Aggregation von Lymphozyten⁵⁶ ermöglicht, hatte anfänglich zu der Spekulation Anlass gegeben, metastasierende Zellen würden (dank CD44) die Migrationsmechanismen dieser Zellen der immunologischen Abwehr imitieren.⁷⁴ Die Expression von CD44 in zahlreichen gesunden Geweben und die fehlende Assoziation einer Neoexpression von CD44 im Falle eines invasiven Verhaltens hat diese Vermutung bereits widerlegt. Obwohl seine Bedeutung für die Tumorbiologie noch nicht vollständig geklärt ist, bleibt CD44 aber auch aufgrund der unterschiedlichen Verbindungen zu klassischen Prognosefaktoren in verschiedenen Tumortypen

ein hochinteressantes Adhäsionsmolekül. Rasche Aufklärung der Ursachen und Mechanismen für maligne Entartung durch CD44 ist allerdings derzeit nicht zu erwarten. Aus dem Misserfolg, CD44v6 als zentrales Molekül der malignen Entartung zu etablieren, ergibt sich die Folgerung, dass auch vielversprechende Zufallsbefunde wie die der Forschungsgruppe von U. Günthert nicht das Verständnis komplexer Vorgänge ersetzen können, sondern im besten Fall richtungsweisend sind.

6. Zusammenfassung

Adhäsionsmolekülen wird eine entscheidende Rolle in der Tumormetastasierung zugeschrieben. Besonders für den Hyaluronrezeptor CD44 und seine Isoformen liegen diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse vor. Die vorliegende Arbeit hat daher die potentielle Bedeutung dieser Gruppe von zellulären Adhäsionsmolekülen an einem großen Mammakarzinomkollektiv untersucht. Dazu wurden zunächst geeignete Antikörper und immunhistochemische Protokolle geprüft, die eine erfolgreiche Verarbeitung von paraffinasserviertem Material zuließen. In Zusammenarbeit mit der Frauenklinik des Universitätsklinikums Gießen (PD Dr. K. Münstedt) wurden 255 invasive Mammakarzinome untersucht, von denen in 79 Fällen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen, in 159 nur der nodal-negative Tumor und in 17 Fällen nur Lymphknotenmetastasen als Gewebe zur Verfügung stand. Zu allen Fällen lagen Verlaufsbeobachtungen von bis zu 13 Jahren vor, die klassischen Prognosefaktoren waren entweder vollständig vorhanden oder aber für diese Arbeit neu erhoben worden. Die Immunhistologie mit CD44 - Antikörpern wurde mit der sensitiven APAAP Technik systematisch durchgeführt, und die membranständigen immunreaktiven Signale durch semiquantitativen Auswertungsschemata erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels etablierter Verfahren (SPSS™), wobei wesentliche klinische, histologische und pathologische Faktoren mit berücksichtigt wurden. Als Zeichen der Repräsentativität des untersuchten Kollektivs zeigten sich alle klassischen Prognosefaktoren in Übereinstimmung mit der gängigen Literatur. Für CD44 und seine Isoformen konnte jeweils eine hohe Interkorrelation untereinander sowie mit der Standardform nachgewiesen werden, wobei letzteres aufgrund der molekularen CD44 - Struktur zu erwarten war. Dagegen zeigten sich nur einzelne Korrelationen zwischen der Expression von CD44 - Isoformen und prognostischen Faktoren, z.B. eine inverse Korrelation zwischen CD44v3 und v6 im Primärtumor und der Tumorgröße, eine erhöhte Expression von CD44v6 in der Postmenopause sowie in besser differenzierten Tumoren. War in Lymphknotenmetastasen die Expression von CD44 - Isoformen erhalten, bestand ein niedriges Tumorstadium, ein positiver Hormonrezeptorstatus sowie ein längeres rezidivfreies Überleben. Zu dem Proliferationsmarker MIB 1 bestand eine inverse Korrelation. Im Gegensatz zu Daten anderer konnte damit eine Korrelation von CD44 zu ungünstigem Krankheitsverlauf auch in einem großen und lang nachbeobachtetem Patientenkollektiv nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte die eigene Arbeit CD44 und die analysierten Isoformen nicht als unabhängige prognostische Faktoren aufzeigen. Stattdessen zeigte sich Korrelation v.a. von CD44v6 zu Faktoren, die mit einer günstigeren Prog-

nose einhergehen. Diese Korrelation wird umso deutlicher je konstanter CD44 in der Tumorprogression erhalten bleibt. Damit erscheinen CD44 und seine Isoformen weniger als prognostischer, sondern eher als ergänzende Differenzierungsmarker. Die Ergebnisse stehen damit in gutem Einklang mit Befunden, die die eigene Forschungsgruppe bereits an benignen Tumoren und in situ Karzinomen der Mamma erhoben hatte. Sicher muss die Auffassung revidiert werden, dass CD44 ein zentrales Molekül der Tumorgenese oder Tumorausbreitung ist, wie nach initialen Versuchen am Rattenmodell angenommen. Weitere Grundlagenforschung zu CD44 und seinen Varianten ist notwendig, um die Bedeutung dieses interessanten Moleküls in gesunden Geweben und seine tatsächliche Rolle in der Tumorbilogie zu klären.

7. Abstract

Adhesion molecules play a pivotal role in cancer progression and formation of metastases. In particular, the hyaluronat receptor CD44 and its isoforms (or variants, CD44v) attracted notice in tumors of different organs including the breast. In the latter, however, the published findings are controversial. Therefore, the presented study analyzed the potential role of CD44 isoforms using well-established anti-CD44 monoclonal antibodies on paraffin-embedded tissues of a large breast cancer collective. This material comprises 255 cases of invasive breast cancer, which were followed clinically for up to 13 years (PD Dr. K. Münstedt, Department of Obstetrics and Gynecology, Justus-Liebig University Giessen). In 79 cases, tissues of both, the primary tumor and its corresponding lymph node metastasis, were available, in 159 cases the nodal negative tumor tissue and in 17 further cases tissues of lymph node metastases only. For all cases, the classic prognostic factors (such as pTNM, tumor grading, MIB1, ER, PR) have already been determined or were reevaluated. Immunohistochemistry was performed by the APAAP technique and the membranous staining pattern of anti-CD44 antibodies was recorded in a semiquantitative manner. Statistical analyses were done using the standard software SPSS regarding all important clinical, histological and pathological factors. The impact of the latter on tumor progression and patients survival matched very well with data from literature, proving the quality of the analyzed tumor collective. The expression of CD44 isoforms showed a strong correlation to each other and, in particular, to CD44 (standard) because of the molecular organization. In contrast, only a weak but significant correlation between CD44v and established prognostic factors were found. The expression of CD44v3 and v6, for example, was increased in smaller tumors and CD44v6 was associated with post-menopause and higher tumor differentiation. Lymph node metastases, positive for CD44 isoforms, correlated with lower tumor stages, a positive estrogen hormone receptor status and longer disease free survival times. Furthermore, an adverse correlation to tumor cell proliferation (MIB1) was found. In conclusion, the expression of CD44 and its isoforms is not linked to a poor clinical outcome or represents as an independent prognostic factor in our long-term followed tumors. In contrast, CD44 and especially CD44v6 rather indicate a better prognosis in primary tumors and tumors already metastasized to local lymph nodes. This group of adhesion molecules thus may reflect cellular differentiation, which may be lost during tumor progression or not. The findings matches well with other studies of our group, analyzing normal tissues, benign tumors and in situ carcinomas of the breast. Yet, there is no striking evidence for a key role of CD44 in the

initiation and progression of breast cancer. Further research is necessary to understand the implication of this polymorphous adhesion molecule in normal tissue and neoplasm.

8. Literaturverzeichnis

1. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M *et al.* (1993) Comparison of classic and quantitative prognostic factors in hormone receptor-positive and hormone receptor-negative female breast cancer. *Am J Surg* **165**: 307-11.
2. Aamdal S, Bormer O, Jorgensen O *et al.* (1984) Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer* **53**: 2525-9.
3. Adams JC (2001) Cell-matrix contact structures. *Cell Mol Life Sci* **58**: 371-92.
4. Ahrens T, Assmann V, Fieber C *et al.* (2001) CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J Invest Dermatol* **116**: 93-101.
5. Anderson TJ, Battersby S, King RJ, McPherson K, Going JJ (1989) Oral contraceptive use influences resting breast proliferation. *Hum Pathol* **20**: 1139-44.
6. Arch R, Wirth K, Hofmann M *et al.* (1992) Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* **257**: 682-5.
7. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**: 1303-13.
8. Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D *et al.* (1998) Gains and losses of CD44 - Expression during breast carcinogenesis and tumour progression. *Histopathology* **33**: 107-16.
9. Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D *et al.* (1999) Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and beta-catenin expression during breast carcinogenesis and tumour progression: a comparative study with CD44. *Histopathology* **34**: 25-34.
10. Bargmann CI, Hung M-C, Weinberg RA (1986) The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* **319**: 226-30.
11. Bässler R (1997) Pathologie der Brustdrüse. In: Remmle W, ed. *Pathologie*. Berlin: Springer, pp. 133-368.

12. Beck T, Pollow K, Heubner A (1986) Monoclonal antibodies for the immunohistochemical detection of estrogen receptor status in tissue sections of primary breast cancers. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **46**: 490-4.
13. Bell CD, Shokry PE, Stadler J (1989) The relationship of nuclear staining density and mode of stromal invasion with axillary metastases and hormone receptor status in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* **91**: 377-85.
14. Bennett KL, Jackson DG, Simon JC *et al.* (1995) CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* **128**: 687-98.
15. Bezwoda WR, Esser JD, Dansey R, Kessel I, Lange M (1991) The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. Estrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen. *Cancer* **68**: 867-72.
16. Birchmeier C, Birchmeier W (1993) Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. *Annu Rev Cell Biol* **9:511-40.**: 511-40.
17. Birchmeier W, Weidner KM, Hulsken J, Behrens J (1993) Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin Cancer Biol* **4**: 231-9.
18. Bloom HJ (1957) Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* **11**: 359-77.
19. Bolodeoku J, Yoshida K, Sugino T, Goodison S, Tarin D (1996) Accumulation of Immature Intron-containing CD44 Gene Transcripts in Breast Cancer Tissues. *Mol Diagn* **1**: 175-81.
20. Borland G, Ross JA, Guy K (1998) Forms and functions of CD44. *Immunology* **93**: 139-48.

21. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Chen YW (2000) CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem* **275**: 1829-38.
22. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L, Zhu D, Chen YW (1999) Rho-kinase (ROK) promotes CD44v(3,8-10)-ankyrin interaction and tumor cell migration in metastatic breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **43**: 269-87.
23. Boyd J (1994) Molecular medicine quietly comes of age. New opportunities in the treatment of patients with breast cancer. *Cancer* **74**: 2215-7.
24. Bunting JS, Hemsted EH, Kremer JK (1976) The pattern of spread and survival in 596 cases of breast cancer related to clinical staging and histological grade. *Clin Radiol* **27**: 9-15.
25. Carter WG, Wayner EA (1988) Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J Biol Chem* **263**: 4193-201.
26. Castronovo V, Colin C, Claysmith AP *et al.* (1990) Immunodetection of the metastasis-associated laminin receptor in human breast cancer cells obtained by fine-needle aspiration biopsy. *Am J Pathol* **137**: 1373-81.
27. Cattoretti G, Becker MH, Key G *et al.* (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* **168**: 357-63.
28. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C *et al.* (1993) Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* **171**: 83-98.
29. Cooper NL, Bardy P, Bacani J *et al.* (1998) Correlation of CD44 - Expression with proliferative activity of normal human breast epithelial cells in culture. *Breast Cancer Res Treat* **50**: 143-53.

30. Cordell JL, Falini B, Erber WN *et al.* (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* **32**: 219-29.
31. Culty M, Shizari M, Thompson EW, Underhill CB (1994) Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *J Cell Physiol* **160**: 275-86.
32. Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980) Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* **10**: 737-44.
33. Dasgupta A, Takahashi K, Cutler M, Tanabe KK (1996) O-linked glycosylation modifies CD44 adhesion to hyaluronate in colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 110-7.
34. Davis (1990) International trends in cancer mortality. *Lancet* **336**: 474-81.
35. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH (1997) Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* **278**: 672-5.
36. Denning SM, Telen MJ, Hale LP, Liao HX, Haynes BF (1995) CD44 and CD44R cluster report. In: Schlossmann S, ed. *Leukocyte Typing*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, pp. 1713-1719.
37. Dupont WD, Page DL (1989) Relative risk of breast cancer varies with time since diagnosis of atypical hyperplasia. *Hum Pathol* **20**: 723-5.
38. el-Ashry D, Lippman ME (1994) Molecular biology of breast carcinoma. *World J Surg* **18** : 12-20.
39. Elston CW (1991) Pathological prognostic factors in breast. *Histopathology* **19**.
40. Esteban JM, Ahn C, Mehta P, Battifora H (1994) Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* **102**: 158-62.

41. Faassen AE, Mooradian DL, Tranquillo RT *et al.* (1993) Cell surface CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan is required for transforming growth factor-beta-stimulated mouse melanoma cell motility and invasive behavior on type I collagen. *J Cell Sci* **105**: 501-11.
42. Fenderson BA, Stamenkovic I, Aruffo A (1993) Localization of hyaluronan in mouse embryos during implantation, gastrulation and organogenesis. *Differentiation* **54**: 85-98.
43. Fischer ER, Gregorio RM, Fischer B (1975) The pathology of invasive breast cancer. *Cancer* **36**: 1-84.
44. Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* **1**,1.
45. Formby B, Stern R (1998) Phosphorylation stabilizes alternatively spliced CD44 mRNA transcripts in breast cancer cells: inhibition by antisense complementary to casein kinase II mRNA. *Mol Cell Biochem* **187**: 23-31.
46. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG *et al.* (1994) Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* **54**: 4539-46.
47. Friedrichs K, Kugler G, Franke F *et al.* (1995) CD44 isoforms in prognosis of breast cancer. *Lancet* **345**: 1237.
48. Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW *et al.* (1995) CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* **55**: 5424-33.
49. Friedrichs K, Kugler G, Franke F *et al.* (1995) CD44 isoforms in prognosis of breast cancer. *Lancet* **345**: 1237.
50. Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA (1995) High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* **55**: 901-6.
51. Frisch SM, Sreaton RA (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 555-62.

52. Fuchs R, Guggenberger D, Karl C (2001) *Mammakarzinom. Diagnostik und Therapie*. Eschweiler: Nora Verlag, p 6.
53. Gansauge F, Gansauge S, Schlosser W, Schmid R, Adler G, Beger HG (1998) The splice-pattern of CD44 is altered in chronic pancreatitis exhibiting dysplastic changes. *Eur J Med Res* **3**: 419-26.
54. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133**: 1710-5.
55. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Producton of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* **31**: 13-20.
56. Ghaffari S, Smadja-Joffe F, Oostendorp R *et al.* (1999) CD44 isoforms in normal and leukemic hematopoiesis. *Exp Hematol* **27**: 978-93.
57. Givehchian M, Worner S, Strater J *et al.* (1998) No evidence for cancer-related CD44 splice variants in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* **34**: 1099-104.
58. Goodfellow PN, Banting G, Wiles MV *et al.* (1982) The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur J Immunol* **12**: 659-63.
59. Graham MD, Yelland A, Peacock J, Beck N, Ford H, Gazet JC (1993) Bilateral carcinoma of the breast. *Eur J Surg Oncol* **19**: 259-64.
60. Granberg D, Wilander E, Oberg K, Skogseid B (1999) Decreased survival in patients with CD44-negative typical bronchial carcinoid tumors. *Int J Cancer* **84**: 484-8.
61. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W *et al.* (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**: 13-24.
62. Hall JM, Lee MK, Newman B *et al.* (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* **250**: 1684-9.

63. Harada Y, Katagiri T, Ito I *et al.* (1994) Genetic studies of 457 breast cancers. Clinicopathologic parameters compared with genetic alterations. *Cancer* **74**: 2281-6.
64. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W (1992) Breast cancer (1). *N Engl J Med* **327**: 319-28.
65. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W (1992) Breast cancer (2). *N Engl J Med* **327**: 390-8.
66. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W (1992) Breast cancer (3). *N Engl J Med* **327**: 473-80.
67. Hart IR, Goode NT, Wilson RE (1989) Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta* **989**: 65-84.
68. Hartmann LC, Ingle JN, Wold LE *et al.* (1994) Prognostic value of c-erbB2 overexpression in axillary lymph node positive breast cancer. Results from a randomized adjuvant treatment protocol. *Cancer* **74**: 2956-63.
69. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM (1989) CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* **10**: 423-8.
70. Heider KH . CD44-Varianten - als Metastasierungsmaker in menschlichen Tumoren. CD44 - Symposium Wien . 1994.
Ref Type: Abstract
71. Heider KH, Hofmann M, Hors E *et al.* (1993) A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* **120**: 227-33.
72. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL (1990) Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* **114**: 160-3.
73. Henderson M (1993) Current approaches to breast cancer prevention. *Science* **259**: 630-1.

74. Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H (1993) CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* **14**: 395-9.
75. Horak ER, Leek R, Klenk N *et al.* (1992) Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* **340**: 1120-4.
76. Hsieh HF, Yu JC, Ho LI, Chiu SC, Harn HJ (1999) Molecular studies into the role of CD44 variants in metastasis in gastric cancer. *Mol Pathol* **52**: 25-8.
77. Hughes EN, Mengod G, August JT (1981) Murine cell surface glycoproteins. Characterization of a major component of 80,000 daltons as a polymorphic differentiation antigen of mesenchymal cells. *J Biol Chem* **256**: 7023-7.
78. Ichikawa T, Itano N, Sawai T *et al.* (1999) Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* **113**: 935-9.
79. Iida N, Bourguignon LY (1995) New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J Cell Physiol* **162**: 127-33.
80. Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP (1992) Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **84**: 1109-14.
81. Jahanzeb M (2003) Trastuzumab-based combinations in metastatic breast cancer: how to make a choice. *Clin Breast Cancer* **4**: 28-38.
82. Jalkanen ST, Bargatze RF, Herron LR, Butcher EC (1986) A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol* **16**: 1195-202.
83. Jenson EV, Block GE, Smith S, Kyser K, DeSombre SR (1971) Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl Cancer Inst Monogr* **34**: 55-70.
84. Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S (1993) Glycoprotein CD44 - Expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol* **143**: 867-74.

85. Jones JL, Critchley DR, Walker RA (1992) Alteration of stromal protein and integrin expression in breast--a marker of premalignant change? *J Pathol* **167**: 399-406.
86. Jonjic N, Lucin K, Krstulja M, Iternicka Z, Mustac E (1993) Expression of beta-1 integrins on tumor cells of invasive ductal breast carcinoma. *Pathol Res Pract* **189**: 979-84.
87. Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von-Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P (1995) CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet* **345**: 615-9.
88. Kessler LG (1991) Projection of breast cancer burden. *Prevent Med* **20**: 170-82.
89. Kleine W (1993) Pregnancy and (pre)malignant diseases of the breast and endometrium. *Gynäkologe* **26**: 141-8.
90. Knapp W (1989) Leucocyte typing IV. In: Schlossmann, ed. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.
91. Kohda D, Morton CJ, Parkar AA *et al.* (1996) Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell* **86**: 767-75.
92. Koopman G, Griffioen AW, Ponta H *et al.* (1993) CD44 splice variants; expression on lymphocytes and in neoplasia. *Res Immunol* **144**: 750-4.
93. Koyama S, Maruyama T, Adachi S (1999) Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas: a two-color flow-cytometric analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* **125**: 47-54.
94. Kreipe H, Alm P, Olsson H, Hauberg M, Fischer L, Parwaresch R (1993) Prognostic significance of a formalin-resistant nuclear proliferation antigen in mammary carcinomas as determined by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol* **142**: 651-7.
95. Kuppner MC, Van-Meir E, Gauthier T, Hamou MF, de-Tribolet N (1992) Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int J Cancer* **50**: 572-7.

96. Kurozumi K, Nishida T, Nakao K, Nakahara M, Tsujimoto M (1998) Expression of CD44 variant 6 and lymphatic invasion: importance to lymph node metastasis in gastric cancer. *World J Surg* **22**: 853-7.
97. Land CE, Boice JD, Shore RE (1980) Breast cancer risk from low - dose exposure to ionizing radiation. *J Natl Cancer Inst* **65**: 353.
98. Le-Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M (1989) 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* **64**: 1914-21.
99. Lee S, Yang W, Lan KH *et al.* (2002) Enhanced sensitization to taxol-induced apoptosis by herceptin pretreatment in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* **62**: 5703-10.
100. Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R (1995) Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med* **182**: 431-7.
101. Lesley J, He Q, Miyake K, Hamann A, Hyman R, Kincade PW (1992) Requirements for hyaluronic acid binding by CD44: a role for the cytoplasmic domain and activation by antibody. *J Exp Med* **175**: 257-66.
102. Liotta LA (1992) Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* **266**: 54-3.
103. Lipponen P, Saarelainen E, Ji H, Aaltomaa S, Syrjanen K (1994) Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer. *J Pathol* **174**: 101-9.
104. Lokeshwar VB, Fregien N, Bourguignon LY (1994) Ankyrin-binding domain of CD44(GP85) is required for the expression of hyaluronic acid-mediated adhesion function. *J Cell Biol* **126**: 1099-109.
105. Lu YJ, Xiao S, Yan YS, Fu SB, Liu QZ, Li P (1993) Direct chromosome analysis of 50 primary breast carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **69**: 91-9.

106. Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Gunthert U (1994) Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* **124**: 71-82.
107. Mankiewitz v (1993) Value of steroid hormone receptors as prognostic factors in breast. *Gynäkologe* **26,2**: 100-6.
108. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L (1994) Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* **74**: 381-400.
109. Mareel MM, Van Roy FM, Bracke ME (1993) How and when do tumor cells metastasize? *Crit Rev Oncog* **4**: 559-94.
110. Martignone S, Menard S, Bufalino R *et al.* (1993) Prognostic significance of the 67-kilodalton laminin receptor expression in human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **85**: 398-402.
111. Mechtersheimer G, Munk M, Barth T, Koretz K, Moller P (1993) Expression of beta 1 integrins in non-neoplastic mammary epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **422**: 203-10.
112. Mies R, Fischer H, Pfeiff B, Winkelmann W, Würz H (1982) Klinefelter's syndrome and breast cancer. *Andrologia* **14**: 317-21.
113. Mikosz CA, Brickley DR, Sharkey MS, Moran TW, Conzen SD (2001) Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem* **276**: 16649-54.
114. Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W (1993) Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* **143**: 1731-42.
115. Moriya T, Silverberg SG (1994) Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ) of the breast. A comparison of pure noninvasive tumors with those including different proportions of infiltrating carcinoma. *Cancer* **74**: 2972-8.

116. Mormon MC, Bogdan A, Cormont S, Touitou Y, Levi F (2002) Cortisol diurnal variation in blood and saliva of patients with metastatic colorectal cancer: relevance for clinical outcome. *Anticancer Res* **22**: 1243-9.
117. Narod SA, Feunteun J, Lynch HT *et al.* (1991) Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet* **338**: 82-3.
118. Neame SJ, Isacke CM (1993) The cytoplasmic tail of CD44 is required for basolateral localization in epithelial MDCK cells but does not mediate association with the detergent-insoluble cytoskeleton of fibroblasts. *J Cell Biol* **121**: 1299-310.
119. Nio Y, Itakura M, Omori H *et al.* (2003) Implication of HER-2/neu overexpression for the efficacy of oral fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy in the patients with estrogen receptor negative breast cancer after surgery. *Anticancer Res* **23**: 745-53.
120. Nishimura R, Nagao K, Miyayama H *et al.* (2003) Higher plasma vascular endothelial growth factor levels correlate with menopause, overexpression of p53, and recurrence of breast cancer. *Breast Cancer* **10**: 120-8.
121. Olewniczak S, Chosia M, Kwas A, Kram A, Domagala W (2002) Angiogenesis and some prognostic parameters of invasive ductal breast carcinoma in women. *Pol J Pathol* **53** : 183-8.
122. Olsson H, Andersson H, Johansson O, Moller TR, Kristoffersson U, Wenngren E (1993) Population-based cohort investigations of the risk for malignant tumors in first-degree relatives and wives of men with breast cancer. *Cancer* **71**: 1273-8.
123. Page DL, Andersen J (1987) *Diagnostic histopathology of the breast*. Edinburgh: Churchill Livingston.
124. Peck D, Isacke CM (1998) Hyaluronan-dependent cell migration can be blocked by a CD44 cytoplasmic domain peptide containing a phosphoserine at position 325. *J Cell Sci* **111**: 1595-601.

125. Perschl A, Lesley J, English N, Hyman R, Trowbridge IS (1995) Transmembrane domain of CD44 is required for its detergent insolubility in fibroblasts. *J Cell Sci* **108**: 1033-41.
126. Picker LJ, Nakache M, Butcher EC (1989) Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* **109**: 927-37.
127. Pignatelli M, Hanby AM, Stamp GW (1991) Low expression of beta 1, alpha 2 and alpha 3 subunits of VLA integrins in malignant mammary tumours. *J Pathol* **165**: 25-32.
128. Plate KH (1993) Angiogenese und Anti - Angiogenese. *Dtsch Ärztesb* **90**.
129. Price JE (1990) The biology of metastatic breast cancer. *Cancer* **66**: 1313-20.
130. Railo M, Nordling S, von-Boguslawsky K, Leivonen M, Kyllonen L, von-Smitten K (1993) Prognostic value of Ki-67 immunolabelling in primary operable breast cancer. *Br J Cancer* **68**: 579-83.
131. Raymond WA, Leong AS (1989) The relationship between growth fractions and oestrogen receptors in human breast carcinoma, as determined by immunohistochemical staining. *J Pathol* **158**: 203-11.
132. Reber S, Matzku S, Gunthert U (1990) Retardation of metastatic tumor growth after immunization with metastatic-specific monoclonal antibodies. *Int J Cancer* **46**: 919-27.
133. Regidor PA, Callies R, Regidor M, Gunthert U, Zoller M, Schindler AE (1996) Expression of the CD44 variant isoforms 6 and 4/5 in breast cancer. Correlation with established prognostic parameters. *Arch Gynecol Obstet* **258**: 125-35.
134. Remmle S, Stegner HE (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines IRS. *Pathologe* **8**: 138-40.
135. Riede U-N, Schäfer H-E, Wehner H (1989) Brustdrüse. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart: Thieme, pp. 866-877.

136. Robert Koch Institut . Aktuelle Trends zu Inzidenz und Mortalität.
www.rki.de/GBE/krebs/krebs.htm *Internet* 1999.
137. Ruiz P, Schwarzler C, Gunthert U (1995) CD44 isoforms during differentiation and development. *Bioessays* **17**: 17-24.
138. Saad S, Bendall LJ, James A, Gottlieb DJ, Bradstock KF (2000) Induction of matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-2 by co-culture of breast cancer cells and bone marrow fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat* **63**: 105-15.
139. Sainio M, Zhao F, Heiska L *et al.* (1997) Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *J Cell Sci* **110**: 2249-60.
140. Saito H, Tsujitani S, Katano K, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N (1998) Serum concentration of CD44 variant 6 and its relation to prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* **83**: 1094-101.
141. Salmi M, Gron-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalkanen S (1993) Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* **122**: 431-42.
142. Sawan A, Randall B, Angus B *et al.* (1992) Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. *J Pathol* **168**: 23-8.
143. Schauer A (1994) Stellenwert der c-erb B-Onkogene für Behandlungsstrategien beim Mammakarzinom. *Forum DKG* **9**: 47-50.
144. Schauer M (1990) Die Multicenterstudie "Kleines Mammacarcinom". *Dtsch Ärztezt* **87,46**: 2125-30.
145. Schildberg FW, Meyer G, Piltz S, Koebe HG (1995) Surgical treatment of tumor metastases: general considerations and results. *Surg Today* **25**: 1-10.

146. Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG (1993) The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem* **268**: 12235-8.
147. Seiter S, Arch R, Reber S *et al.* (1993) Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* **177**: 443-55.
148. Seiter S, Schadendorf D, Herrmann K *et al.* (1996) Expression of CD44 variant isoforms in malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **2**: 447-56.
149. Setälä L, Lipponen P, Tammi R *et al.* (2001) Expression of CD44 and its variant isoform v3 has no prognostic value in gastric cancer. *Histopathology* **38**: 13-20.
150. Shattil SJ, Ginsberg MH (1997) Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* **100**: S91-S95.
151. Shibuya Y, Okabayashi T, Oda K, Tanaka N (1998) Ratio of CD44 epithelial variant to CD44 hematopoietic variant is a useful prognostic indicator in gastric and colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* **28**: 609-14.
152. Sinn HP, Oelmann A, Anton HW, Diel IJ (1994) Metastatic potential of small and minimally invasive breast carcinomas. *Virchows Arch* **425**: 237-41.
153. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA *et al.* (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**: 707-12.
154. Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B (1989) A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* **56**: 1057-62.
155. Stauder R, Günthert U. (1995) CD44 isoforms: Impact on lymphocyte activation and differentiation. *Immunologist* **3**: 78-83.

156. Stauder W (1995) Leucocyte typing V (Characterization and tissue distribution of CD4 variant isoforms). In: Schlossmann S, ed. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.
157. Stegert-Oelke A (1993) Psychological management of breast cancer patients in a group. I. The concept. *Z Lymphol* **17**: 15-7.
158. Streuli C (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 634-40.
159. Tanabe KK, Saya H (1994) The CD44 adhesion molecule and metastasis. *Crit Rev Oncog* **5**: 201-12.
160. Tarin D, Matsumura Y (1993) Deranged activity of the CD44 gene and other loci as biomarkers for progression to metastatic malignancy. *J Cell Biochem Suppl* 173-85.
161. Tauchi K, Hori S, Itoh H, Osamura RY, Tokuda Y, Tajima T (1989) Immunohistochemical studies on oncogene products (c-erbB-2, EGFR, c-myc) and estrogen receptor in benign and malignant breast lesions. With special reference to their prognostic significance in carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **416**: 65-73.
162. Terpe HJ (1994) Absence of CD44-standard in human neuroblastoma correlates with histological dedifferentiation, N-myc amplification and reduced survival probability. *Cell death and Diff* **1**: 123-8.
163. Terpe HJ, Stark H, Prehm P, Gunthert U (1994) CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry* **101**: 79-89.
164. Teulings FA, van Glise HA (1977) Demonstration of glucocorticoid receptors in human mammary carcinoma. *Horm Res* **8**: 107-16.
165. Thor AD, Yandell DW (1993) Prognostic significance of p53 overexpression in node-negative breast carcinoma: preliminary studies support cautious optimism. *J Natl Cancer Inst* **85**: 176-7.

166. Turetschek K, Preda A, Floyd E *et al.* (2003) MRI monitoring of tumor response following angiogenesis inhibition in an experimental human breast cancer model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **30**: 448-55.
167. Turkington RW (1974) Prolactin receptors in mammary carcinoma cells. *Canc Res* **34**: 758-63.
168. UICC (1997) Mammatumoren. In: Wittekind C, Wagner G, eds. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*. Berlin: Springer Verlag, pp. 119-125.
169. Underhill C (1992) CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* **103**: 293-8.
170. Unger C, Marme D (1994) Are there alternative therapeutic methods for breast carcinoma? Status and perspectives for treatment of metastatic breast carcinoma. *Gynakologe* **27**: 387-90.
171. van Bogaert L, Maldague (1980) Scirrhous carcinoma of the female breast. *Invest Cell Pathol* **3**: 377-82.
172. Venable JG, Schwartz AM, Silverberg SG (1990) Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity. *Hum Pathol* **21**: 333-8.
173. von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC (1995) A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* **82**: 989-99.
174. Wallgren A, Silfversward C (1976) Clinical and histological factors of prognostic importance in breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1**: 611-7.
175. Wang C, Tammi M, Tammi R (1992) Distribution of hyaluronan and its CD44 receptor in the epithelia of human skin appendages. *Histochemistry* **98**: 105-12.
176. Weidner N, Folkman J, Pozza F *et al.* (1992) Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **84**: 1875-87.

177. Wellings SR (1980) A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobular unit. *Pathol Res Pract* **166**: 515-35.
178. Wong WW, Vijayakumar S, Weichselbaum RR (1992) Prognostic indicators in node-negative early stage breast cancer. *Am J Med* **92**: 539-48.
179. Yang H, Binns RM (1993) CD44 is not directly involved in the binding of lymphocytes to cultured high endothelial cells from peripheral lymph nodes. *Immunology* **79**: 418-24.
180. Zetter BR (1993) Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* **4**: 219-29.

9. Anhang

9.1 Reagenzien

1. Hämalaun

	1g	Hämatoxylin
+	0,2g	NaJO ₃
+	50g	Kalialaun
+	1000ml	A.dest
+	50g	Chloralhydrat
+	1g	Zitronensäure

2. Propandiol

	21g	Propandiol
+	1000ml	A.dest

3. Neufuchsin

	5g	Neufuchsin
+	1000ml	2N HCl

4. RPMI – Ansatz (pH 7,4 – 7,6)

	50ml	RPMI
+	450ml	A.dest
+	50ml	inaktiviertes Rinderserum
+	0,5g	Natriumazid

5. Entwicklerlösung (1 Küvette á 10 Schnittpräparaten)

	35ml	Entwicklungspuffer
+	12,5ml	Propandiol
+	20mg	Laevamisol
+	10mg	Natriumnitrit
+	0,25ml	A.dest
+	25mg	Naphtol

- + 0,3ml Dimethylformamid
- + 0,1ml Neufuchsin

9.2 Puffer

1. BSA Puffer:

- 2g Bovinserumalbumin
- + 100g Tris Puffer (pH7,2)

2. Zitratpuffer (0,01 mol; pH6):

- 1,92 g Zitronensäure wasserfrei
- + 1000ml A.dest

3. Tris – Waschpuffer (Ansatz für 10l):

- 87,8g NaCl
- + 68,5g Tris – HCl
- + 9,0g Tris – Base
- + 1250g A.dest

4. Entwicklungspuffer

- 87g NaCl
- + 15g Tris - HCl
- + 49g Tris – Base
- + 1750g A.dest

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus–Liebig–Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.

Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name:	Luig
Vorname:	Henrike
Geburtsdatum/ -ort:	30.05.1969, Dortmund
Anschrift:	Wiesenberger Ring 4 35440 Linden
Familienstand:	ledig
Eltern:	Heike Luig, geb. Wolf, Realschullehrerin Alois Luig, Realschullehrer

Schulbildung:

1975 – 1979	Grundschule in Dortmund-Aplerbeck
1979 – 1988	Gymnasium an der Schweizer Allee, Dortmund Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

WS 1988 – SS 1991	Ruhr-Universität Bochum: Studiengang: Biologie Abschluss: Vordiplom
-------------------	---

SS 1991 – SS 1997

Justus-Liebig-Universität in Gießen

Studiengang: Humanmedizin

Abschluss: dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang:

1997 – 2002

ÄIP und Assistenzärztin in der Herz- und Gefäßchirurgie der Justus-Liebig-Universität in Gießen

seit 2002

Assistenzärztin in der chirurgischen Abteilung der Asklepiosklinik Lich

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mir bei der Erstellung meiner Dissertation geholfen haben, bedanken:

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Schulz, Leiter des Instituts für Pathologie an der Universitätsklinik in Gießen, danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, dieses in den Räumlichkeiten seines Instituts zu bearbeiten.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Folker E. Franke, Institut für Pathologie in Gießen, für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit, insbesondere für die Einarbeitung in die Histologie des Mammakarzinoms.

Weiterhin danke ich Herrn PD Karsten Münstedt, Frauenklinik der Justus-Liebig- Universität in Gießen, für die Überlassung der klinischen Daten des Patientenkollektivs.