

**Aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
(Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
Chefarzt Professor Dr. W. E. Simon**

**Die Bedeutung
des quantitativen immunhistochemischen
Nachweises von Protein S100A6
beim Mammakarzinom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Andreas Gerteis
aus
Spaichingen**

- 2006 -

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. E. Simon

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Wallwiener

**Meinen Eltern Rosmarie und Albert Gerteis
und
meiner Ute gewidmet**

1.	Einleitung	5
2.	Protein S100A6	8
2.1.	Die Protein S100 Familie	8
2.2.	Genetische Determination von S100A6	9
2.3.	Molekularer Aufbau von S100A6	10
2.4.	Biochemische Eigenschaften von S100A6	12
2.5.	Molekularbiologische Eigenschaften von S100A6	15
2.6.	Biologische Bedeutung von S100A6	20
2.6.1.	Proliferation und Differenzierung	20
2.6.2.	Drüsensekretion	22
2.6.3.	Endokrine Funktion	23
2.6.4.	Zn ²⁺ und Ca ²⁺ Homöostase in der Neuroglia	24
2.6.5.	Kontraktion glatter Muskelzellen	25
2.7.	Bedeutung von S100A6 bei Tumoren allgemein	26
2.8.	Bedeutung von S100A6 beim Mammakarzinom	28
3.	Material und Methoden	29
3.1.	Patienten	29
3.1.1.	Patientenrekrutierung	29
3.1.2.	Bestimmung des auswertbaren Patientenkollektivs	30
3.2.	Datenerhebung	32
3.2.1.	Datenerhebung bei Aufnahme in die Studie	32
3.2.2.	Follow up	33
3.3.	Pathomorphologische Daten der ausgewerteten Patienten	35
3.4.	Histologische Aufarbeitung	36
3.5.	Immunhistochemische Anfärbung	37
3.5.1.	Färbeprinzip	37
3.5.2.	Durchführung der immunhistochemischen Färbung	38
3.5.3.	Qualitätskontrolle	41
3.6.	Auswertung der Präparate	42

3.7.	Chemikalien	43
3.8.	Photographische Techniken	44
3.9.	Statistische Methoden	44
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Patienten	47
4.1.1.	Vergleich des eingeschlossenen mit dem ausgeschlossenen Patientenkollektiv	47
4.1.1.1.	Vergleich der Nominaldaten	48
4.1.1.2.	Vergleich der Intervalldaten	52
4.1.2.	Klinische Daten und deren prognostische Bedeutung	53
4.1.2.1.	Lebensalter	54
4.1.2.2.	Menopausenstatus	55
4.1.3.	Ergebnisse des Follow up	56
4.1.3.1.	Nominaldaten	56
4.1.3.2.	Intervalldaten	57
4.2.	Prognostische Bedeutung der konventionellen Prognosefaktoren	59
4.2.1.	Ergebnisse der klassischen Prognosefaktoren	59
4.2.1.1.	Tumorgröße	60
4.2.1.2.	Nodalstatus	61
4.2.1.3.	Metastasenstatus	62
4.2.1.4.	Grading	63
4.2.1.5.	Histologischer Typ	64
4.2.1.6.	UICC-Stadieneinteilung	65
4.2.2.	Ergebnisse der molekularbiologischen Prognosefaktoren	66
4.2.2.1.	Steroidrezeptoren	66
4.2.2.2.	c-erb-B2 Rezeptor	68
4.3.	Protein S100A6: Auswertungsergebnisse	70
4.3.1.	Deskriptive Ergebnisse	70
4.3.2.	Nominale Ergebnisse	72
4.3.2.1.	Zytoplasmafärbung	72

4.3.2.2.	Kernfärbung	76
4.3.3.	Ermittlung des Schwellenwertes für den S100A6-Status	78
4.3.4.	Intra- und Interobservervariabilität	79
4.3.4.1.	Intraobservervariabilität	79
4.3.4.2.	Interobservervariabilität	80
4.4.	Korrelation des S100A6-Status mit Tumormerkmalen	81
4.5.	S100A6 als Prognosefaktor	85
4.5.1	Gesamtüberleben	85
4.5.2	Rezidivfreies Überleben	87
4.6.	S100A6 als Prognosefaktor für Subgruppen	89
4.6.1.	UICC-Stadium	89
4.6.2.	Tumorgrösse	90
4.6.3.	Nodalstatus	91
4.6.4.	Grading	93
4.7.	S100A6 als prädiktiver Faktor	94
4.7.1.	Radiotherapie	95
4.7.2.	Antiöstrogentherapie mit Tamoxifen	97
4.7.3.	CMF-Polychemotherapie	99
4.7.4.	Anthrazyklinhaltige Chemotherapie	103
4.8.	S100A6 und Metastasenlokalisierung	105
5.	Diskussion	106
5.1.	Protein S100A6: Zusammengefasste Erkenntnisse	106
5.2.	Meßmethodik und Auswertung	107
5.3.	Repräsentativität des vorliegenden Patientenkollektivs	108
5.4.	S100A6 in Abhängigkeit von Prognoseparametern	109
5.5.	S100A6 als Prognosefaktor	111
5.6.	S100A6 als prädiktiver Faktor	112
5.6.1.	Ergebnisse	112
5.6.2.	Bioaktivierung und biologische Wirkung von Cyclophosphamid	114
5.6.3.	Hypothesenbildung	121

5.7.	S100A6 als Marker für den Metastasierungort	125
5.8.	Ausblick	126
6.	Zusammenfassung (Abstract)	128
7.	Anhang	130
	Abbildungen	130
	Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach der UICC	135
	Abkürzungsverzeichnis	136
	Literaturverzeichnis	138
	Danksagung	153
	Lebenslauf	154

1. Einleitung

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor bei Frauen. Allein in Deutschland erkrankten im Jahr 1996 etwa 46 000 Frauen neu an einem Mammakarzinom.

In Westeuropa und Nordamerika war seit Anfang der 70er Jahre ein Anstieg der Inzidenzraten um jährlich ca. 2% zu beobachten, bevor in den letzten Jahren ein Plateau mit 100 – 110 Neuerkrankungen pro 100 000 Frauen/Jahr erreicht wurde (Cancer Facts and Figures 1995). Nach dem Krebsregister des Saarlandes lag die Gesamtinzidenz 1993 bei 102,4 pro 100 000 Frauen/Jahr.

Etwa 19 000 Frauen versterben in Deutschland jährlich an einem Mammakarzinom (44 Todesfälle pro 100 000 Frauen/Jahr). Die Mortalitätsraten stiegen lange Zeit fast parallel zu den Inzidenzraten an. Seit Mitte der 80er Jahre ist aber auch bei der tumorbezogenen Mortalität ein Plateau zu beobachten, ab 1989 sogar ein leichter Rückgang der Mortalitätsrate um 5% (Ries, 1994). Dieser Trend kann als Erfolg der verbesserten Früherkennung und einer effektiveren Therapie interpretiert werden.

Obwohl also in den letzten Jahren Fortschritte in der frühzeitigen Diagnosestellung, der chirurgischen Therapie und bei der Weiterentwicklung adjuvanter Therapiemaßnahmen erzielt wurden, hat sich die Prognose der einzelnen Patientinnen nicht befriedigend verbessert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass jene Risikofaktoren, die gegenwärtig als Entscheidungsgrundlage für adjuvante Behandlungsempfehlungen herangezogen werden, für eine zuverlässige Prognosestellung bei der individuellen Mammakarzinompatientin nicht ausreichend sind (Funke et al., 2002)

Es ist daher nur folgerichtig, dass sich die Forschung verstärkt um die Entdeckung neuer möglicher Prognosefaktoren bemüht und Studien zu deren Evaluation durchführt. Weit über 100 Faktoren mit möglichem prognostischen oder prädiktiven Wert wurden bisher in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben.

Die Ca^{++} -bindende S100-Proteinfamilie ist in den letzten Jahren mehr in den Mittelpunkt dieses Interesses gerückt, seit eine auffällige Expression in verschiedenen Tumorgeweben und ein Einfluss auf den Metastasierungsprozess beschrieben wurde. Bei verschiedenen Tumoren konnte auch eine gehäufte genetische Veränderung im Bereich der q21-Region des Chromosoms 1 nachgewiesen werden, in der 14 bisher bekannte S100 Gene in einem Gen-Cluster organisiert sind.

Antikörper gegen S100-Proteine werden weltweit zur immunhistochemischen Klassifikation von benignen und malignen neuroendokrinen Tumoren, Melanomen, Schilddrüsen- und Nierenkarzinomen, bronchoalveolären Lungenkarzinomen und anderen Tumoren eingesetzt (Ilg et al., 1996).

Für Protein S100A6 konnte eine Überexpression in Melanomen (Maeldandsmo et al., 1997) und Adenokarzinomen des Kolons (Komatsu et al., 2000; Stulik et al., 2000) nachgewiesen werden. Bei Melanomen besteht eine eindeutige Korrelation zwischen S100A6-Expression und Prognose der Erkrankung.

Die Bedeutung von S100A6 beim Mammakarzinom wurde bisher nur im Ansatz untersucht. In vitro Versuche an Zelllinien und eine kleine Studie mit 18 Mammabiopsaten hatten dabei keinen Zusammenhang zwischen der malignen Entartung der Brustdrüse und der Expression von Protein S100A6 aufzeigen können (Pedrocchi et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wird nun anhand eines Patientenkollektivs von 266 Patientinnen, die zwischen 1986 und 1997 an einem Mammakarzinom erkrankten, die Bedeutung der Expression von S100A6 im Tumorgewebe für den weiteren Krankheitsverlauf untersucht.

Hierbei wird zunächst ein Verfahren entwickelt, das immunhistochemisch eine Aussage über den quantitativen Gehalt eines Mammakarzinoms an Protein S100A6 zulässt. Auf der Basis von Signifikanztestungen wird danach, entsprechend dem Vorgehen bei der Beurteilung des Steroidhormon-Rezeptorstatus,

eine Status-Einteilung in die Kategorien S100A6 positiv und S100A6 negativ vorgenommen.

Mit den im Follow-up erhobenen Daten wird dann die prognostische Wertigkeit des S100A6-Status mit anderen Prognosefaktoren verglichen und der Einfluß auf den Krankheitsverlauf abgebildet.

Abschließend wird der S100A6-Status in Bezug auf die nach der Operation erfolgte Weiterbehandlung analysiert, um eine mögliche prädiktive Relevanz für das Ansprechen eine Radio-, Hormon- oder Chemotherapie aufzuzeigen.

Zusammenfassend sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Erkenntnisse über den Aufbau, die biochemischen Eigenschaften und die biologische Funktion von S100A6 sind bisher bekannt?
2. Ist immunhistochemisch eine verlässliche Quantifizierung der Expression des Protein S100A6 im Tumorgewebe möglich?
3. Steht der S100A6-Gehalt eines Tumors in Zusammenhang mit einem der bisher bekannten klassischen Prognosefaktoren?
4. Stellt der S100A6-Gehalt im Tumor einen relevanten Faktor hinsichtlich der Prognose des weiteren Krankheitsverlaufs oder der Prädiktion eines Therapieansprechens dar?
5. Welche Hypothesen können aus der Verbindung der bisherigen Erkenntnisse über S100A6 und den Ergebnissen dieser Arbeit für ein biologisches Modell bezüglich der Wirkung oder Funktion von S100A6 beim Mammakarzinom aufgestellt werden?

2 Protein S100A6

2.1 Die Protein S100 Familie

Die S100-Proteine wurden 1965 von Moore erstmals in Hirngewebe identifiziert und als eine Gruppe saurer Proteine mit niederem Molekulargewicht (10 – 12 kDa) charakterisiert. Ihren Namen verdanken sie dem ungewöhnlichen Umstand, daß die ersten beiden Mitglieder dieser Familie, S100A1 und S100B, zu 100% in Ammoniumsulfat löslich waren (**S**oluble in **100** % ammonium sulfate).

Heute sind bereits 18 verschiedene S100-Proteine bekannt, die in Ihrer Aminosäuresequenz in 25 – 65 % übereinstimmen (Heizmann et al.,2002).

Isobe und Okuyama zeigten 1981, daß S100-Proteine aus zwei Polypeptidketten (α und β) bestehen, die bei den verschiedenen S100-Proteinen in ihrer Zusammensetzung gleich (homodimer) oder verschieden (heterodimer) sein können (s.u.). Jede enthält zwei spezielle AS-Sequenzen, die zur Ca^{2+} - Bindung fähig sind und „EF-hand“ genannt werden (s.u.). Die biochemischen Eigenschaften der S100-Proteine variieren, einige binden außer Ca^{2+} auch Cu^{2+} oder Zn^{2+} -Ionen (Maelandsmo et al., 1997).

S100 Proteine gehören zu der großen Gruppe der Ca^{2+} -Rezeptorproteine und bewirken ihren biologischen Effekt wahrscheinlich durch die Modulation der Aktivität spezifischer Effektorproteine, entsprechend dem Wirkungsmechanismus von Calmodulin.

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, führt zu einer Bindung und damit zu einer Konformationsänderung des S100-Proteins. Hierdurch wird eine Enthüllung hydrophober Domänen auf der Moleküloberfläche bewirkt. Diese wiederum interagieren mit den korrespondierenden hydrophoben Domänen eines Effektorproteins, welches dadurch in seiner Aktivität verändert wird und eine biochemische Wirkung erzielt. Der Zyklus wird beendet, indem der Ca^{2+} -Spiegel abfällt und der S100-Effektor-Komplex dissoziiert.

S100-Proteine sind in viele verschiedene zelluläre Vorgänge involviert: Zytoplasmatische (Modulation von Enzymaktivitäten, Energiemetabolismus, Motili-

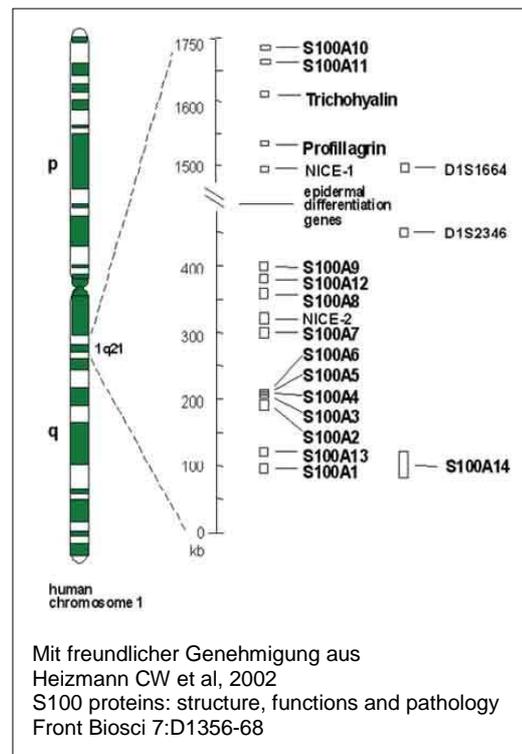
tät oder Sekretion), nukleäre (Transkription, Apoptose) und extrazelluläre Vorgänge (Sekretion, Neuritenverlängerung, Chemotaxis) sowie Ca^{2+} -Pufferung (Heizmann et al., 1998).

Eine Vielzahl verschiedener Krankheiten werden mittlerweile in den Zusammenhang mit S100-Proteinen gebracht. Vorherrschend sind hierbei neurologische (z.B. Morbus Alzheimer, amyotrophe Lateralsklerose, Down-Syndrom, Epilepsie) und neoplastische Veränderungen (Melanom, Mammakarzinom, Metastasierung allgemein), aber auch Kardiomyopathie, chronische Entzündungen, zystische Fibrose, Diabetes (Zimmer et al., 1997) und Allergien scheinen durch eine Deregulation von S100-Proteinen beeinflusst zu werden (Schäfer et al., 1996).

2.2 Genetische Determination von S100A6

Das S100A6 Gen wurde 1992 von Weterman geklont (Weterman et al., 1992). Zusammen mit 14 anderen S100-Genen bildet es ein Gen-Cluster auf Chromosom 1q21 (d.h. im Bereich der 1. Bande der Region 2 auf dem langen Arm q des 1. Chromosoms) (Heizmann et al., 2002).

Diese aneinandergrenzende DNA-Sequenz von 1600 Kilobasen, einem der engsten Cluster, die bei Säugetieren bekannt sind, zeigt eine häufige Umordnung im Rahmen der malignen Entartung, speziell im Zusammenhang mit der Metastasierung. Eine Beteiligung der 1q21-Region ist zum Beispiel bei Mammatumoren in 30% der Fälle nachzuweisen und gibt zu der Vermutung Anlaß, daß es während der Tumorprogression durch eine Chromosomenaberration zu einer



veränderten Organisation der S100-Gene kommt. Andererseits zeigt sich die Wichtigkeit der korrekten Anordnung innerhalb des Gen-Clusters auch darin, daß es durch die Evolution kaum verändert wurde: Bei der Maus zeigt sich eine sehr ähnliche Anordnung von S100-Genen auf dem Chromosom 3 (Engelkamp et al., 1993).

Die Expression der Protein S100-Gene ist mit der, der übrigen bekannten Gen-Cluster, nicht zu vergleichen. So werden z.B. die Globin Gen-Cluster nur in einem speziellen Zelltyp exprimiert (erythroid cells), zeitlich und räumlich abhängig von der Anordnung der einzelnen Gene im Cluster. S100-Gene dagegen werden in verschiedenen Zellen unterschiedlich exprimiert und auch ein zeitlicher Zusammenhang kann nicht gefunden werden. Eine individuelle und unabhängige Expression der einzelnen Gene ist also zu vermuten. Die extreme Heterogenität der S100-Promotorregion scheint diese These zu unterstützen (Engelkamp et al., 1993).

Die Clusterbildung der S100-Gene auf Chromosom 1q21 führte zur Einführung einer neuen Nomenklatur und damit auch zur Umbenennung von Calcyclin in Protein S100A6 (Schäfer et al., 1995).

Synonyme für S100A6 sind Calcyclin, CACY, 2A9, PRA, CaBP, 5B10 und Caltropin.

2.3 Molekularer Aufbau von S100A6

Protein S100A6 ist ein homodimeres Protein, das heißt, es besteht aus zwei gleichen (homologen), jeweils aus 90 Aminosäuren zusammengesetzten Einzelsträngen (Monomeren), die durch hydrophobe Regionen zu einem Dimer (Dimerisation: Vereinigung zweier gleicher Teilchen) zusammengehalten werden (Kordowska et al., 1998).

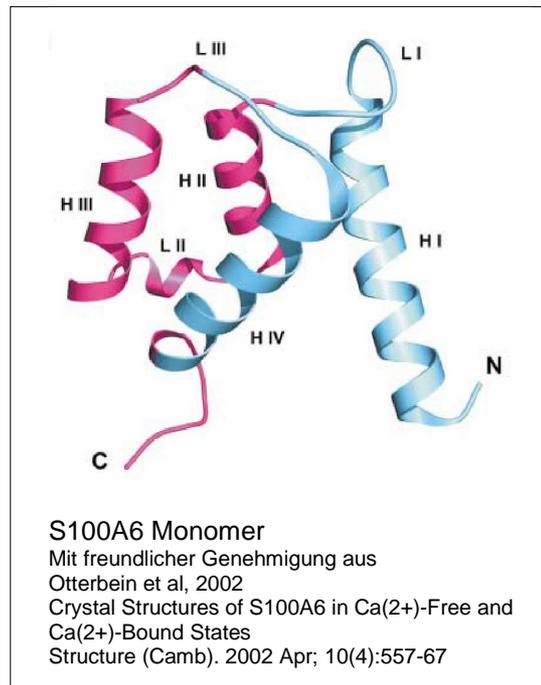
Jedes Monomer besteht, wie bei den meisten S100-Proteinen (s.o.), aus zwei zur Ca^{2+} -Bindung fähigen Strukturen oder „Händen“, die „EF-hands“ genannt werden. Eine „EF-hand“ enthält spezielle, nicht variable Aminosäurereste in

einer Schleifenstruktur (**Loop**), der eine α -Helix vorangeht („E“) und eine nachfolgt („F“) (Kligman et al., 1988). Zwischen den beiden „EF-hands“ liegt eine weitere Schleife (nebenstehend mit **L II** markiert), die auch als „hinge“-Region (Scharnier) bezeichnet wird (Schäfer et al., 1996).

Die „EF-hand“ am C-terminalen Ende des S100A6 besteht aus 12 Aminosäuren, 3 AS-Resten am Ende der Helix III, den 5 Aminosäuren der 3. Schleifenregion und 4 AS-Resten der Helix IV. Zwei

Glutaminsäuren (Glu67 / Glu72), zwei Asparaginsäuren (Asp61 / Asp65) sowie eine Asparagin-Gruppe (Asn63) können zusammen ein Ca^{2+} -Ion binden (Heizmann et al., 1998) (Otterbein et al., 2002). Da allen Proteinen, die Ca^{2+} über eine „EF-hand“ binden (mittlerweile mehr als 200 verschiedene Proteine) genau diese, aus 12 Aminosäuren bestehende Anordnung, gemein ist, wird sie auch als „kanonische EF-hand“ (lat. canon, „Regel, Norm“) bezeichnet (Nakayama et al., 1994).

Die „EF-hand“ am N-terminalen Ende besteht dagegen aus 14 Aminosäuren und ist für die S100-Proteinfamilie spezifisch. Sie besteht aus 3 AS-Resten der Helix I, 7 Aminosäuren der ersten Schleifenregion und 4 AS-Resten der Helix II. Wiederum zwei Glutaminsäuren (Glu3 / Glu23), ein Asparagin- (Asp25), ein Serin- (Ser20) und ein Threoninrest (Thr28) bilden hier die Bindungsstellen für ein zweites Ca^{2+} -Ion (Otterbein et al., 2002).

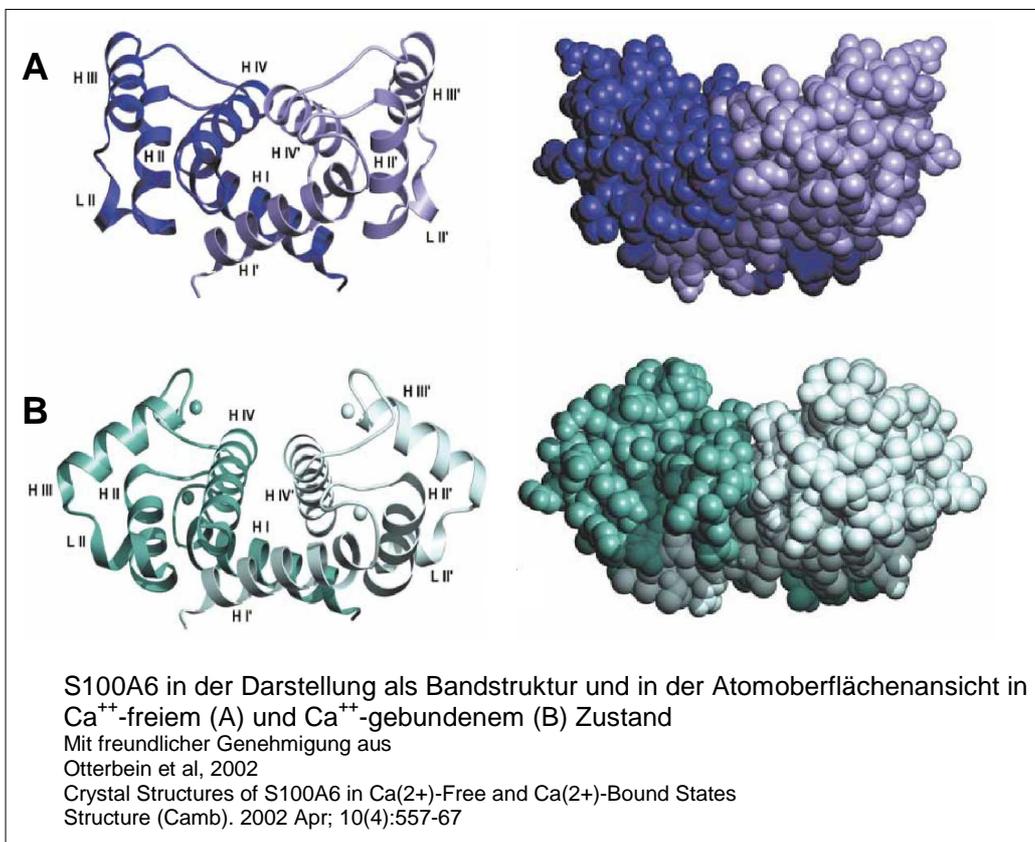


2.4 Biochemische Eigenschaften von S100A6

Wie nahezu alle anderen S100-Proteine auch, ist S100A6 zur Ca^{2+} -Bindung fähig. Da S100A6 in Ca^{2+} -freiem und gebundenem Zustand Homodimere bildet und pro Monomer zwei Ca^{2+} -Ionen binden kann, können insgesamt 4 Ca^{2+} -Ionen gebunden werden (Schäfer et al., 1996).

Ca^{2+} wirkt als second-messenger, indem durch dessen Bindung eine Änderung der Molekülkonformation bei S100A6 erreicht wird, welche wiederum die Anlagerung an ein spezifisches „Effektor-Protein“ erlaubt. Die Komplexbildung mit diesem Effektorprotein, bewirkt dessen Modulation und erzielt dadurch einen biochemischen Effekt (Kligman et al., 1988).

Durch die Bindung von Ca^{2+} kommt es beim S100A6-Dimer zu einer deutlichen Konformationsänderung, die sich auf die Oberflächenstruktur und die Ladungsverteilung des Moleküls auswirkt. Es kommt zu einer Freilegung zweier symmetrisch angeordneter, hydrophober Oberflächenbezirke, die als Bindungsstellen für die Effektorproteine fungieren. Die N-terminale „S100 - EF-hand“ wird



hierbei strukturell weniger verändert, als die C-terminale „kanonische EF-hand“, welche großen Konformationsänderungen unterworfen wird. Bildlich gesprochen kommt es abhängig von der Ca^{2+} -Bindung zu einem Öffnen bzw. Schließen der gegensätzlich orientierten „Arme“ Helix II – Scharnierregion – Helix III der beiden Monomere, während das Dimer insgesamt durch eine relativ fixierte Zentrumsregion, gebildet aus Helix I und IV beider Monomere, verbunden bleibt. Diese Erkenntnisse sind different zu denen des Kaninchen-S100A6, das durch die Bindung an Ca^{2+} kaum eine Veränderung erfährt. (Otterbein et al., 2002)

Obwohl die hydrophobe Zentrumsregion, die das S100A6-Dimer zusammenhält, durch die Ca^{2+} -Bindung nicht sehr verändert wird, ist die intermonomere Oberfläche in Ca^{2+} -gebundenem Zustand doch um immerhin ca. 8% kleiner. Dieses und die Enthüllung von hydrophoben Stellen auf der Moleküloberfläche, bedingen eine geringere Stabilität des Dimers in Ca^{2+} -gebundenen Zustand und eine etwas größere Moleküloberfläche. Ob das Effektorprotein bei der Anlagerung an S100A6 mit beiden Monomeren gleichzeitig Kontakt aufnimmt, wie bei den Verbindungen von S100A10 mit Annexin II und bei S100A11 mit Annexin I, oder ob, wie bei der Bindung von p53 an S100B, die Anlagerung nur an jeweils eines der beiden Monomere erfolgt, ist bisher noch nicht geklärt (Otterbein et al., 2002).

Die Affinität der kanonischen EF-hand für Ca^{2+} ist größer, als die der S100-EF-hand. Abhängig von der Höhe der Ca^{2+} -Konzentration, werden also zunächst nur die kanonischen EF-hands besetzt. Dabei wird eine hydrophobe Oberflächenstruktur enthüllt, die sich von der unterscheidet, die bei weiterem Ansteigen der Ca^{2+} -Konzentration entsteht, wenn alle 4 Bindungsstellen besetzt werden. Hieraus resultiert die Hypothese, daß alle S100-Proteine mit vier EF-hands in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration mit unterschiedlichen Regionen eines Effektor-Proteins oder sogar mit unterschiedlichen Effektor-Proteinen interagieren könnten. Auch S100A6 könnte demnach „heterobifunktional“ sein (Heizmann et al., 1998).

Die mittlere Dissoziationskonstante für die Ca^{2+} -Bindungsaffinität wird in der Literatur mit $K_{0,5} = 0,5 \text{ mM}$ angegeben (Heizmann, et al.,2002), wobei dieser Wert je nach Reduktions- oder Oxidationszustand von S100A6 variiert. Diese Affinität wäre so niedrig, daß es bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen zu keiner signifikanten Bindung kommen kann. Dies wiederum führt zu der Vermutung, daß S100A6 nur in den Zellkompartimenten aktiviert wird, in denen eine hohe Ca^{2+} -Konzentration vorliegt. Außerdem steigt die Ca^{2+} -Affinität mit abnehmender Ionenkonzentration und es gibt Hinweise, daß sie bei Anlagerung an ein Effektorprotein gleich um ein mehrfaches zunimmt (Kordowska et al., 1998).

S100A6 kann auch vier Zn^{2+} -Ionen binden. Die Bindungsstellen sind von denen für Ca^{2+} verschieden und die Bindungsaffinität für Ca^{2+} scheint durch Zn^{2+} nicht oder nur gering negativ beeinflusst (Heizmann et al.,2002).

Ein Cystein-Rest in Position 3 jedes Monomers ist der Ligand für ein Zn^{2+} -Ion. Die zweite Bindungsstelle für Zn^{2+} ist bisher noch unklar. Die Bindungsaffinität für Zn^{2+} bei völlig reduziertem S100A6 ist etwa 300fach höher als jene für Ca^{2+} und führt zu einer dreidimensionalen Strukturänderung, die hydrophobe Bezirke auf der Moleküloberfläche freilegt, welche sich sehr von der durch Ca^{2+} verursachten unterscheidet. Die nachgewiesene Dissoziationskonstante für die Zn^{2+} Bindung an S100A6 $K_{0,5} = 0,55 - 10,4 \text{ }\mu\text{M}$, ist ungefähr in der Größenordnung für extrazelluläres Zn^{2+} , wobei die Angaben in der Literatur sehr uneinheitlich sind. Zink, als essentielles Spurenelement für Eukaryonten und wichtige Komponente bei mehr als 300 Enzymen, Transskriptionsfaktoren, Nukleinsäure bindenden Proteinen und Rezeptoren bekannt, könnte also auch bei S100A6 eine regulatorische Funktion ausüben (Kordowska et al.,1998).

Es ist vorstellbar, daß Ca^{2+} und Zn^{2+} durch die Bindung mit S100A6 eine jeweils spezifische Interaktion mit einem anderen Effektorprotein bewirken und dadurch eine ganz spezifische Kettenreaktion in der Zelle initiieren (Kordowska et al.,1998).

Die verschiedenen Wirkungen von S100A6 scheinen jedoch nicht nur auf die unterschiedlichen Bindungs- und Ladungszustände zurückzuführen zu sein. Vielmehr gibt es daneben auch Hinweise auf eine posttranslationale Modifikation von S100A6 durch Acetylierung und Formylierung (Stulik et al., 2000).

Zwei Isoformen der S100A6 Monomere (A und B), die sich durch einen bei B fehlenden C-terminalen Lysin-Rest unterscheiden, wurden von Allen beim Huhn nachgewiesen. Die Isoformen lagen hierbei in homodimerer (AA und BB) und in heterodimerer Form (AB) vor (Allen et al., 1997).

2.5 Molekularbiologische Eigenschaften von S100A6

Bei normaler Ca^{2+} -Konzentration wird S100A6 ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen. Eine vom Kern zur Peripherie hin abnehmende Verteilungsdichte wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Müller et al., 1999). Diese Verteilung ist bemerkenswerterweise unabhängig von der vorherrschenden Zn^{2+} -Konzentration.

Steigt die Ca^{2+} -Konzentration an, kommt es zu einer Umverteilung und Interaktion von S100A6 mit der Plasmamembran und der Kernhülle.

Zunächst konzentriert sich S100A6 in kleinen Vesikeln im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas. Ein Abfall des Ca^{2+} -Spiegels, z.B. durch Zugabe von Chelatbildnern, stellt den Ausgangszustand wieder her.

Steigt die Ca^{2+} Konzentration jedoch über ein gewisses Maß hinaus an, lösen sich die Vesikel teilweise wieder auf und S100A6 verdichtet sich um die Kernhülle. Diese Umverteilung ist nicht reversibel.

Dies deutet darauf hin, daß S100A6 an Plasmamembran und Kernhülle mit verschiedenen Bindungspartnern interagiert (Stradal et al., 1999).

Subramanian zeigte in einer Studie, daß, im Gegensatz zu einem transienten Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels, ein persistierender Anstieg zu einer Fragmentierung des sarkoplasmatischen Retikulums in Vesikel führte (Subramanian et al., 1997).

Die in Tumorzellen nachgewiesene andauernde Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels könnte also zu einer Fragmentierung des glatten endoplasmatischen Retikulums und damit zu einer irreversiblen Umverteilung von S100A6 (und auch S100A4) führen (Mueller et al., 1999).

Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß die Umverteilung von S100A6 eher in Zusammenhang mit Actinfilamenten steht: In ECV-Zellen (eine von der humanen Umbilicalvene stammende Endothelzelllinie) wurde durch Angiotensin II eine zytoplasmatische Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels verursacht (Angiotensin II aktiviert GTP abhängig die Phospholipase C, welches durch die Bildung von Inositol-triphosphat zu einer Entleerung der zellulären Ca^{2+} -Speicher führt). Die Umverteilung von S100A6 in Vesikel war hier unabhängig von ER-Golgi-Apparat und Tubulin, stand jedoch in Zusammenhang mit den Actinfilamenten (Hsieh et al.,2002).

Mehrere „Effektorproteine“ mit denen S100A6 Ca^{2+} -abhängig interagieren kann wurden in den letzten Jahren in vitro identifiziert:

Filipek et al.,1991:	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	❶
	Annexin II	❸
Tokumitsu et al.,1992:	Annexin XI	❺
Mani et al.,1992:	Caldesmon	❻
Zeng et al., 1993	Annexin VI	❻
Filipek et al.,1998:	CacyBP (Calcyclin-binding protein)	❼
Hirata et al.,2002:	Annexin I	❷

- ❶ Die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase ist ein wichtiges Enzym im Rahmen der Glykolyse. Durch die Modulation der Enzymaktivität kann S100A6 so in den Energiemetabolismus der Zelle eingreifen (Schäfer et al.,1996). Die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase hat ebenso die Fähigkeit mit Einzelstrang-DNS zu interagieren und spielt damit im DNS-Metabolismus ein Rolle (Grosse et al., 1986).

②-⑤ Annexine sind eine Gruppe von Proteinen, die Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide und damit an Biomembranen binden. Sie kommen in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen vor und sind normalerweise an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Regulation von verschiedenen zellulären Funktionen zugeschrieben: Hemmung der Phospholipase A2 (Prostaglandinsynthese), Kontrolle der Membranfusion im Rahmen der Exozytose und Endozytose, Funktionen im Rahmen von Zellproliferation und Blutgerinnung, Verbindung zwischen Membran und Zytoskelett, Regulation der Ausprägung von Rezeptoren an der Zelloberfläche (Raynal et al., 1994).

② Annexin I (Synonym: Lipocortin I) scheint in die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren für die Zellteilung involviert zu sein (Aldridge et al., 1999). Als Hauptsubstrat einiger Membranrezeptoren mit onkogener Tyrosinkinaseaktivität, wie des EGF-Rezeptors und des MET-Onkoproteins (Rezeptor des HGF (Hepatocyte Growth Factor)) (Hirata et al., 2002) führt es wohl über die Steigerung der Phospholipase A2-Aktivität im Zytosol zu einer gesteigerten Freisetzung von intrazellulären Botenstoffen, wie z.B. PGE2 (Prostaglandin E2), die vielfältige Funktionen im Rahmen der Zellproliferation, Chemotaxis und Angiogenese ausüben. Eine Reduktion der Annexin I -Synthese und deren Phosphorylierung führt so einer Hemmung des Zellwachstums (Skouteris et al., 1996).

Nach anderen Erkenntnissen gelangt Annexin I nach der von Wachstumsfaktoren abhängigen Phosphorylierung in den Zellkern. Hier kommt es zur Bildung eines Annexin I –S100A6 –Heterotetramers und zur Anlagerung an Doppelstrang-DNS. Das Heterotetramer entwickelt eine Helicase-Aktivität die Mg^{2+} und Ca^{2+} abhängig reguliert wird (Hirata et al., 2002).

S100A6 wäre demnach nicht nur ausschließlich im Zytosol zu finden, sondern gelangt unter besonderen Umständen auch in den Zellkern. Stradal wies für S100A6 eine Ca^{2+} -abhängige Anlagerung an der inneren Membran der Kernhülle nach (Stradal et al., 1998).

- ③ Annexin II (Synonym: Calpactin I) ist im Bereich der Plasmamembran lokalisiert. Es ermöglicht als Co-Rezeptor für Plasminogen und tPA (tissue plasminogen activator) die Bildung von Plasmin und spielt damit eine wichtige Rolle im Rahmen der Fibrinolyse. Das reichhaltige Vorkommen von Annexin II auf der Zelloberfläche von Monozyten oder verschiedenen Karzinomzellen gibt zu der Vermutung Anlass, daß es durch die Plasmin-Bildung oder durch die Plasmin vermittelte proteolytische Aktivierung von Metalloproteinasen zur invasiven Potenz dieser Zellen beiträgt. Außerdem soll es eine Rolle im Rahmen der Angiogenese spielen (Kim et al., 2002).

Annexin II ist ein Hauptsubstrat der onkogenen SRC-Kinase, einer ausschließlich im Zellinneren lokalisierten Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase (Zeng et al., 1992). In der menschlichen kolorektalen Karzinogenese werden im Verlauf der Progression von Polypen über Primärtumoren bis hin zu Fernmetastasen steigende Aktivitäten der SRC-Kinase beobachtet (Wagener, Molekulare Onkologie, Thieme Verlag).

- ④ Annexin VI (Synonym: Lipocortin VI) scheint eine Rolle bei der Bildung von Stachelsaum-Vesikeln (clathrin-coated pits) im Rahmen der Endo- und Exocytose zu spielen (Lin et al., 1992). Welche genaue Funktion es bei der Kontaktaufnahme und Fusion zwischen Plasma- und Vesikelmembran einnimmt, ist immer noch unklar (Burgoyne et al., 1992), jedoch zeigt sich hier eine überraschende Parallele zu der oben beschriebenen Ca^{2+} -abhängigen Konzentration von S100A6 um Vesikel im Bereich der Zellmembran und des Zytoplasmas. Allerdings wurde auch eine Ca^{2+} -unabhängige und damit wahrscheinlich auch Annexin unabhängige Interaktion von S100A6 mit Plasmamembranen nachgewiesen (Lesniak et al., 1996).

- ⑤ Annexin XI (Synonym: CAP 50 [Calcyclin-associated-protein, 50 kDa]) bindet Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide und damit an Biomembranen. Es kann die Phospholipase A2 inhibieren (Tokumitsu et al., 1991) und durch die Komplexbildung mit S100A6 die Zellteilung beeinflussen (Sudo et al., 1997).

Annexin XI kommt durch alternatives Splicing in den zwei Isoformen A und B vor. Annexin XI-B, das mit S100A6 **keine** Komplexe bilden kann, kommt hauptsächlich im Zytoplasma vor und geht Ca^{2+} -unabhängig Verbindungen mit den Plasmamembran und dem endoplasmatischen Retikulum ein.

In der Interphase findet man Annexin XI überall im Nukleoplasma (Mizutani et al.,1992). Annexin XI-A kann Ca^{2+} -abhängig mit S100A6 Komplexe bilden (Watanabe et al.,1993). Dieser Komplex ist in der späten Prophase der Zellteilung, kurz vor der Auflösung der Kernhülle, im Bereich der Kernmembran nachweisbar (Tomas et al., 2003). Die Lokalisation im Kern scheint also gerade von der Komplexbildung mit S100A6 abhängzuhängen (Sudo et al., 1997).Während der weiteren Mitose ändert Annexin XI seine Lokalisation und bildet eine bogenförmige Struktur um die Mitosespindel (Mizutani et al.,1992), während S100A6 hier nicht mehr nachweisbar ist (Tomas et al., 2003).

Zellen ohne Annexin XI durchliefen bei Versuchen von Tomas et al. die letzte Phase der Zellteilung nicht vollständig und endeten in der Apoptose (Tomas et al., 2004).

- ⑥ Caldesmon bindet an Actin- und Myosinfilamente in glatten Muskelzellen. Durch die Bindung inhibiert es die Actin vermittelte Aktivierung der Myosin ATPase und damit die ATP-Hydrolyse, die essentiell für die Muskelkontraktion ist. S100A6 (hier häufig Caltropin genannt) bindet Ca^{2+} -abhängig an Caldesmon und ruft eine Konformationsänderung hervor, ohne es aus der Bindung zum Actinfilament herauszulösen. Das Myosin kann dadurch ungehindert mit Actin interagieren, das heißt, der inhibitorische Effekt von Caldesmon wird blockiert (Mani et al.,1994).

- ⑦ CacyBP (Synonym: SIP [Siah-1-interacting protein]) wurde als S100A6 Zielprotein zunächst in Gehirnzellen der Maus und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nachgewiesen (Filipek et al.,1998). Die physiologische Relevanz der Interaktion beider Proteine ist bisher noch unklar (Nowotny et al.,2000). Erwähnenswert ist, daß CacyBP nach neueren Untersuchungen eine Rolle bei der

Regelung der β -Catenin Degradation spielen soll (Matsuzawa et al.,2001). β -Catenin (und γ -Catenin) ist das Bindeglied zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett. E-Cadherin wiederum ist ein funktioneller Tumorsupressor in seiner Eigenschaft als Zelladhäsionsmolekül. Eine verminderte oder fehlende Exprimierung sowohl der Catenine als auch des E-Cadherins gehen mit einer erhöhten invasiven Potenz einher (Chow et al.,2001). Bei 50% der lobulären Mammakarzinome ist E-Cadherin vermindert exprimiert (Berx et al. 1996). CacyBP bindet auch an S100A1, S100A12, S100B, S100P, jedoch nicht an S100A4, Calbindin, Parvalbumin, Calmodulin (Filipek et al.,2002).

2.6 Biologische Bedeutung von S100A6

S100A6 wurde in humanen Geweben vor allem in der Lunge, Niere, Intestinum, Magen, Plazenta, Ovar, Brustdrüse, Herz, Haut, Ureter, Blase, Monozyten und Gallengängen aber nicht in gesunden Leberzellen gefunden (Maelandsmo et al., 1997). Es ist nahezu ausschließlich in Fibroblasten und Epithelzellen (Kuznicki et al.,1992) sowie in Neuroglia (Filipek et al.,1993) lokalisiert.

Die S100A6 cDNA, die aus humanen Fibroblasten (Calabretta et al.,1986), Plazenta (Ferrari et al.,1987), Herz (Engelkamp et al.,1992) und Mammagewebe (Murphy et al.,1988) isoliert wurde, scheint identisch zu sein.

S100A6 als Ca^{2+} -Rezeptorprotein ist ein essentielles Bindeglied in der Signaltransduktion für verschiedene Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren oder Hormone), die über Membranrezeptoren zu einer Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führen um eine spezifische zelluläre Antwort auszulösen.

2.6.1 Proliferation und Differenzierung

Verschiedene Untersuchungen geben zu der Vermutung Anlass, daß S100A6 wie auch einige andere S100-Proteine an der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion im Rahmen des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung beteiligt sind.

Hohe Expressionsgrade von S100A6 wurden in Zellen mit hoher Proliferationsrate und sich differenzierenden Zellen gefunden, jedoch ergibt sich keine generelle Rolle für S100A6 im Rahmen der Zellteilung *in vivo*.

Durch PDGF (platelet derived growth factor) und den EGF (epidermal growth factor) können Fibroblasten, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, zur Proliferation angeregt werden. Dies geht direkt mit einer gesteigerten Transkription von S100A6 einher und zwar vor allem in der frühen G₁-Phase. Der Promotor für die Transkription besitzt ein PDGF-responsives Element (Ghezzi et al., 1989). Ob Annexin I als Bindungspartner von S100A6 hier eine Rolle spielt, ist noch nicht geklärt (s.o.).

In vivo konnte eine erhöhte S100A6-mRNA Expression in den Epithelzellen der Cornea von Kaninchen nach Verletzung nachgewiesen werden. Durch Entzündungsmediatoren und einen platelet-activating factor (PAF) kam es im Rahmen der Wundheilung zu einer erhöhten Proliferation der Epithelzellen, d.h. Eintritt in die G₁-Phase des Zellzyklus, und zeitgleich zu einem transienten Anstieg von S100A6 (Bazan et al., 1992).

Ebenso führte der Heilungsprozess nach Ischämie im Nierenepithel (Lewington et al., 1997) und eine erhöhte mechanische Belastung mit nachfolgenden Umbauprozessen in den Fibroblasten der Lunge (Breen et al., 1999) bei Ratten zur erhöhten S100A6-Expression.

Eine lediglich von der Proliferationsaktivität abhängige S100A6 Expression korreliert jedoch nicht mit den kontinuierlich hohen Expressionsraten in Lunge und Niere, in deren Gewebe normalerweise nur ein geringer Prozentsatz proliferierender Zellen gefunden wird (Murphy et al., 1988).

Interessante übergreifende Zusammenhänge der biologischen Funktionen von S100A6 und dessen Bindungspartner Annexin XI im Rahmen der Reaktion von Lungengewebe auf mechanischen Stress wurden in Versuchen von Breen et al., 1999 aufgezeigt:

1. Durch eine vermehrte autokrine Ausschüttung von PDGF kam es zu einer erhöhten Proliferation der Fibroblasten mit gleichzeitiger Erhöhung der

S100A6 Expression (PDGF responsives Element im Promotor der S100A6 Transkription).

2. Durch eine Öffnung von Stress-reaktiven Ionenkanälen kam es zu einem raschen Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen. Dieser ist wiederum essentiell für die Signaltransduktion von S100A6 und dessen Bindungspartner Annexin XI.
3. Die Stress-bedingte Überexpression der SRC-Kinase steht in Zusammenhang mit der erhöhten Phosphorylierung und Translokation von Annexin XI aus dem Kern ins Zytoplasma und der Dissoziation von Phospholipidmembranen.
4. Der mechanische Stress führte zu einer lotrechten Ausrichtung der Fibroblasten zum Streßvektor, was eine dramatische Veränderung der Zelloberfläche bedeutet und mit einer Umordnung der Filamente des Zytoskeletts einhergeht. Dies wiederum könnte in Zusammenhang mit der spezifischen Bindung von S100A6 an Tropomyosin stehen.

Ein Anstieg der S100A6 mRNA in Neuroblastom-Zellen während des neuronalen Differenzierungsprozesses (ausgelöst durch Retinsäure), führte zu der Hypothese, daß S100A6 auch im Rahmen der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt (Tonini et al.,1991).

2.6.2 Drüsensekretion

S100A6 spielt bei der Exocytose eine Rolle. Hierzu wurden Untersuchungen von Timmons bei der Maus durchgeführt, nach denen hohe Expressionsraten besonders häufig in Mucus sezernierenden Zellen vorkommen: Pylorus und Magenfundus, Gallengang und Papilla vateri, Becherzellen des Dünndarmes, Trachea, Hauptbronchien. Darüberhinaus enthielt eine kleine Untergruppe von Hormon- und Neurotransmitter produzierenden Zellen ebenfalls große Mengen S100A6: Auerbach- und Meissner-Plexus, Corpus luteum (nicht in Corpus albicans oder Follikel) und Plazenta. Trotz eigentlich hoher Exocytoseaktivität war S100A6 in Pankreas, Hoden und Schilddrüse nicht nachweisbar (ebenso in

Nebenschilddrüse, Leber, Thymus, Gehirn und Rückenmark) (Timmons et al., 1993).

Diese Untersuchungen führten zu der Hypothese, daß der Ca^{2+} - abhängige Stimulus zur Sekretion in Zellen mit extremer Exocytose S100A6 vermittelt sein könnte (Timmons et al., 1993). Inwiefern die nachgewiesene Interaktion von Annexin VI mit S100A6 eine Rolle spielt ist noch nicht geklärt (s.o.).

Eine Sekretion von S100A6 selbst wurde bisher nicht beobachtet (Fullen et al., 2001).

2.6.3 Endokrine Funktion

a. Insulin:

Genauere Untersuchungen des Pankreas der Ratte zeigten, daß zwar in den Drüsenzellen kein S100A6 nachzuweisen ist (s.o.), jedoch Epithelzellen, Fibroblasten und vor allem die Inselzellen sehr wohl S100A6 enthalten.

Auch die Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas ist ein durch Ca^{2+} stimulierter Exocytose-Vorgang. Okazaki konnte eine sowohl vom Ca^{2+} -Spiegel als auch von der S100A6-Konzentration abhängige Insulinfreisetzung aufzeigen. Dies führte zu der Hypothese, daß S100A6 eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der Ca^{2+} induzierten Insulinfreisetzung spielt (Okazaki et al., 1993).

b. Antidiuretisches Hormon (ADH, Vasopressin):

Das Hypophysenhinterlappenhormon ADH führt in der Niere über einen Kurz- und einen Langzeitmechanismus zur vermehrten Rückresorption von Wasser und NaCl. Der Langzeitmechanismus wird unter anderem mit einer ADH vermittelten Erhöhung der de novo Synthese von Aquaporin-2 (AQP2) - H_2O -Kanälen in den Zellen der Sammelrohre bewirkt. Eine erhöhte Expression von S100A6 wird offensichtlich durch ADH reguliert und steht mit der erhöhten AQP2-Produktion in Zusammenhang. S100A6 scheint für die Langzeitwirkung von ADH essentiell zu sein (Courtois-Coutry et al., 2002).

c. Prolaktin:

Antiseren gegen den Prolaktinrezeptor führten zur Isolierung von S100A6 (in diesem Zusammenhang wurde S100A6 auch mit PRA (prolactin receptor associated protein) bezeichnet), wobei nicht klar ist, ob S100A6 dem Prolaktinrezeptor sehr ähnlich ist oder ob es Teil der Prolaktin vermittelten Signaltransduktion ist.

Die Expression des S100A6 Gens steht jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit der Dichte der Prolaktinrezeptoren auf der Zelloberfläche. So finden sich z.B. in der laktierenden Brustdrüse der Ratte niedere S100A6 mRNA Spiegel, während sie in der Schwangerschaft relativ hoch sind. Umgekehrt nimmt die Dichte der Prolaktinrezeptoren im Vergleich zur Schwangerschaft während der Laktation stark zu. Diese Inkonsistenz könnte durch eine vielfältigere Rolle von S100A6 in der Signaltransduktion von Peptidhormonen, genauso wie durch die Multifunktionalität von Prolaktin in verschiedenen Geweben erklärt werden (Leigh et al.,1987).

2.6.4 Zn²⁺ und Ca²⁺ Homöostase in der Neuroglia

Hoyaux stellte eine S100A6 Überexpression bei der amyotrophen Lateralsklerose in den Astrocyten des Stammhirns fest. Die Ursache ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, jedoch wurde ein Zusammenhang mit S100A6 als Ca²⁺-bindendem Protein vermutet, da vor allem die Motoneurone mit einer geringen Ca²⁺-Pufferkapazität betroffen sind.

Eine zweite Hypothese ist, daß auch die vermehrte Zn²⁺-Bindung durch S100A6 eine Rolle spielen könnte: Durch den Abfall der Zn²⁺ Konzentration wird das Enzym Superoxid Dismutase (SOD), das Zn²⁺ als Katalysator benötigt, in seiner Aktivität beeinträchtigt, was zu einem Anstieg der Superoxydradikale führt und die Zellschädigung von Astrozyten und Motoneuronen beschleunigt (Hoyaux et al.,2000).

2.6.5 Kontraktion glatter Muskelzellen

Hohe Expressionsraten von S100A6 wurden in glatten Muskelzellen von Uterus, Blase, Ureter, Magen gefunden (Weterman et al.,1992).

Tropomyosin und Actin bilden das Actinfilament in der glatten Muskelzelle (Troponin, das im quergestreiften Muskel Ca^{2+} bindet, fehlt). Eine Kontraktion kommt durch die Bindung von Myosin-ATP-Komplexen an Actin zustande. ATP wird hierbei hydrolytisch zu ADP umgesetzt. Caldesmon inhibiert diesen Vorgang durch eine gleichzeitige Bindung an die Actin- und schweren Meromyosinfilamente. Theoretisch wird somit die Relaxation gesteuert.

S100A6 bindet Ca^{2+} abhängig an Caldesmon, ruft bei diesem eine Konformationsänderung hervor und behindert dessen Bindung mit Myosin, ohne es aus der Actin-Bindung herauszulösen. Myosin kann dadurch mit Actin interagieren und der inhibitorische Effekt von Caldesmon ist aufgehoben. Ein Abfall der Ca^{2+} Konzentration löst S100A6 aus der Bindung mit Caldesmon und der Effekt wird umgekehrt (Mani et al.,1994). S100A6 Interaktion mit Caldesmon schwächt dessen Bindung mit Actin –oder schweren Meromyosinfilamenten 10fach effektiver als Calmodulin (Calmodulin wird als das Troponin-Äquivalent beim glatten Muskel angesehen) (Golitsina et al.,1996).

S100A6 interagiert Ca^{2+} -abhängig auch mit Tropomyosin und Calponin. Vermutlich wird durch die Ca^{2+} abhängige Konformationsänderung von S100A6 die Bindung an Tropomyosin ermöglicht (Golitsina et al.,1996). Calponin kann eine Konformationsänderung beim Actin hervorrufen und hat dadurch die Fähigkeit, die Bewegung des Actinfilaments anzuhalten (Strasser et al.,1993).

Da Aktinfilamente in jeder Zelle vorkommen, könnte dies zu der Hypothese führen, dass die Interaktion von S100A6 und Tropomyosin auch in anderen Geweben von Bedeutung ist.

Außerdem könnte es eine Querverbindung zur malignen Entartung geben, denn eine Erniedrigung der Tropomyosinexpression steht nach Boyd vermutlich in Zusammenhang mit der Reorganisation des Zytoskeletts, einer Veränderung

der Zelloberfläche und dem Verlust des durch die Zelladhäsion regulierten Zellwachstums bei Karzinomzellen (Boyd et al.,1995).

2.7 Bedeutung von S100A6 bei Tumoren allgemein

Schon seit einiger Zeit wird vermutet, daß S100A6 als ein mit der Proliferation assoziiertes Protein auch im Rahmen der malignen Progression eine Rolle spielt. Die eigentliche Funktion ist jedoch immer noch unklar. Seit bei verschiedenen Ca^{2+} -bindenden Proteinen, insbesondere anderen S100-Proteinen (A2, A3, A4, A7), auch ein Zusammenhang mit maligner Transformation oder Metastasierung gefunden wurde, rückt die Bestimmung Rolle von S100A6 in diesem Zusammenhang immer mehr ins Zentrum des Interesses.

Da bei einigen ras-transformierten Zellen eine erhöhte S100A6-Expression nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, daß zumindest bei einigen Tumoren die Deregulation von S100A6 durch Onkogene beeinflusst wird (Chambers et al.,1993).

Die Überexpression von S100A6 wurde in verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen: Melanom (Weterman et al.,1992), akute myeloische Leukämie (Ferrari et al., 1988), Schilddrüsenkarzinom (Ilg et al.,1996), Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Berta et al.,1997) und Kolonkarzinom (Komatsu et al.,2000).

Melanom:

Bei malignen Melanomen ist die Eindringtiefe entscheidend für die Prognose. Maelandsmo konnte zeigen, daß zwischen dem Expressionsgrad von S100A6 mRNA in den Metastasen eines Melanoms und der vertikalen Ausdehnung des Primärtumors eine sehr enge Korrelation besteht. Eine große Eindringtiefe ging stets mit einer hohen S100A6-Expression einher. Dementsprechend waren bei

Patienten mit hohem S100A6-Gehalt in einer Metastase krankheitsfreies und Gesamtüberleben kürzer (Maelandsmo et al.,1997).

Kolonkarzinom:

Eine Mehrschrittkarzinogenese wird bei kolorektalen Karzinomen angenommen, bei der es durch Aktivierung von Onkogenen (K-ras) (s.o.) und Inaktivierung oder Deletion von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53) über Adenome zur Ausbildung von Malignomen kommt (Adenom-Karzinom-Sequenz).

Bei allerdings kleiner Fallzahl konnte Komatsu immunhistochemisch nachweisen, daß der Prozentsatz S100A6-positiver Zellen dieser Sequenz entsprechend zunimmt: In der normalen Darmmukosa waren lediglich 5% (N=42) der Zellen S100A6 positiv, in Adenomen 42% (N=13), in Adenokarzinomen 55% (N=42) und in den Lebermetastasen 100% (N= 13). Der Expressionsgrad von S100A6 in den positiven Zellen war in den Karzinomzellen ebenfalls höher als in den normalen Mukosazellen, während sich Primärtumor und Metastasen hier nicht unterschieden (Komatsu et al.,2000).

Stulik wies vier in der elektrischen Ladung unterschiedliche S100A6-Isoformen nach. Im gesunden Gewebe war die basische Isoform (IV) am häufigsten vertreten, während in den prämaligen und malignen Läsionen die sauren Isoformen (I+III) signifikant zunahmen (Stulik et al.,2000). Hier könnte auch ein Zusammenhang mit der kontinuierlich erhöhten Ca^{2+} -Konzentration in Tumorzellen bestehen (s. 2.5.).

Ebenso konnte eine statistisch signifikante Zunahme der S100A6 Konzentration im Bereich der Tumorränder, also im Bereich der „Invasionsfront“, nachgewiesen werden. Dies führte zu der Hypothese, daß S100A6 mehr in den invasiven als in den proliferativen Prozess involviert ist. Dementsprechend konnte im Zentrum der Tumoren oder Metastasen, in dem wieder glanduläre Strukturen nachweisbar waren, eine abnehmende S100A6-Expression nachgewiesen werden (Komatsu et al.,2002).

2.8 Bedeutung von S100A6 beim Mammakarzinom

Die Funktion von S100A6 beim Mammakarzinom ist bislang nur im Ansatz untersucht worden. Ob es wie beim Kolonkarzinom und beim Melanom auch beim Mammakarzinom einen Zusammenhang mit der Progression und der Metastasierung der Erkrankung gibt, ist bisher ungeklärt.

Bisherige Aussagen wurden hauptsächlich aufgrund von Untersuchungen an Zelllinien in vitro gemacht.

Ilg zum Beispiel konnte keine Unterschiede der S100A6-Expression zwischen der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 und der nicht malignen Mammapithel-Zelllinie HBL-100 aufzeigen. Bemerkenswert war die konzentrierte Lokalisation von S100A6 um die perinukleäre Membran. Beim Vergleich benigner und maligner Gewebeproben aus verschiedenen Organen, zeigte hier das Mammakarzinomgewebe eine deutlich höhere S100A6 Expression als die gegenübergestellte benigne Gewebeprobe (Ilg et al., 1996).

Pedrocchi untersuchte 12 Mammakarzinom-Zelllinien. S100A6 war in 10 Zelllinien und in der Normalkontrolle nachweisbar. Eine Korrelation zwischen Expressionsgrad und histologischem Subtyp, Verdopplungszeit, Invasivität oder verschiedener Prognosefaktoren wie Hormonrezeptorstatus, uPA, KathepsinD, EGFR oder p53 bestand nicht.

In einer kleinen Studie wurden 15 Mammakarzinombiopsien und 3 Biopsien mit Normalgewebe verglichen. Die S100A6-Konzentration wurde durch eine Western-blot Analyse ermittelt und zeigte keine auffällige Verteilung. Sowohl die Karzinomproben als auch die gesunden Kontrollen enthielten S100A6. Dies führte zu der Hypothese, daß S100A6 im Mammagewebe nicht in direktem Zusammenhang mit der malignen Entartung steht (Pedrocchi et al., 1994).

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1. Patientenrekrutierung

Für die vorliegende Studie wurden in einer ersten Phase in den Jahren 1986 bis 1988 und in einer zweiten Phase von 1993 bis 1997 insgesamt 343 Patientinnen rekrutiert. Die operative Therapie wurde in der ersten Phase in den Kliniken Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart (Abteilung für Gynäkologie) und Marienhospital Stuttgart (Abteilungen für Chirurgie, plastische Chirurgie und Gynäkologie), in der zweiten Phase ausschließlich im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart durchgeführt.

Die Aufnahme in die Studie erfolgte zufällig. Einziges Einschlußkriterium war zunächst lediglich die Primärdiagnose eines Mammakarzinoms. Ausschlußkriterien wurden nicht festgelegt.

Im einzelnen wurden 147 Patientinnen aus dem Marienhospital Stuttgart (42,9%) und 196 Patientinnen (1.Phase 102 (29,7%), 2. Phase 94 (27,4%)) aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus (57,1%) in die Studie aufgenommen.

Folgende Operationstechniken wurden durchgeführt:

1. Radikale Mastektomie mit Resektion der Mm. pectorales major et minor und vollständiger Entfernung der axillären Lymphknoten bis zur Klavikula.
2. Eingeschränkte radikale Mastektomie (unter Belassung der Pectoralermuskulatur) mit Entfernung der axillären Lymphknoten bis zur V. axillaris.
3. Brusterhaltende Therapie (Quadrantenresektion, weite Exzision („wide excision“), Segmentresektion, sowie partielle Mastektomie) mit Entfernung der axillären Lymphknoten

Die Aufarbeitung und Beurteilung der histologischen Präparate wurde ausschließlich in der Abteilung für Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses durchgeführt. Die Diagnose des diensthabenden Pathologen wurde der Statistik zugrunde gelegt.

3.1.2. Bestimmung des auswertbaren Patientenkollektivs

Für die Festlegung des letztendlich auswertbaren Patientenkollektivs galten folgende Ausschlußkriterien:

- ① Kein Auswertungsergebnis eines immunhistochemisch gefärbten Präparates.
- ② Keine Angaben über die Überlebenszeit des Patienten verfügbar.

Zu ①:

Bei 59 (17,2%) der 343 in die Studie aufgenommenen Patienten lagen keine Auswertungsergebnisse der immunhistochemisch gefärbten Präparate vor:

1. Bei 15 Präparaten waren keine Tumorzellen nachweisbar.
2. Bei 5 Präparaten lagen keine eindeutig invasiven Karzinomzellen vor.
3. In 15 Fällen war das Präparat abgeschwommen
4. In 26 Fällen war kein Präparat zur Auswertung verfügbar.

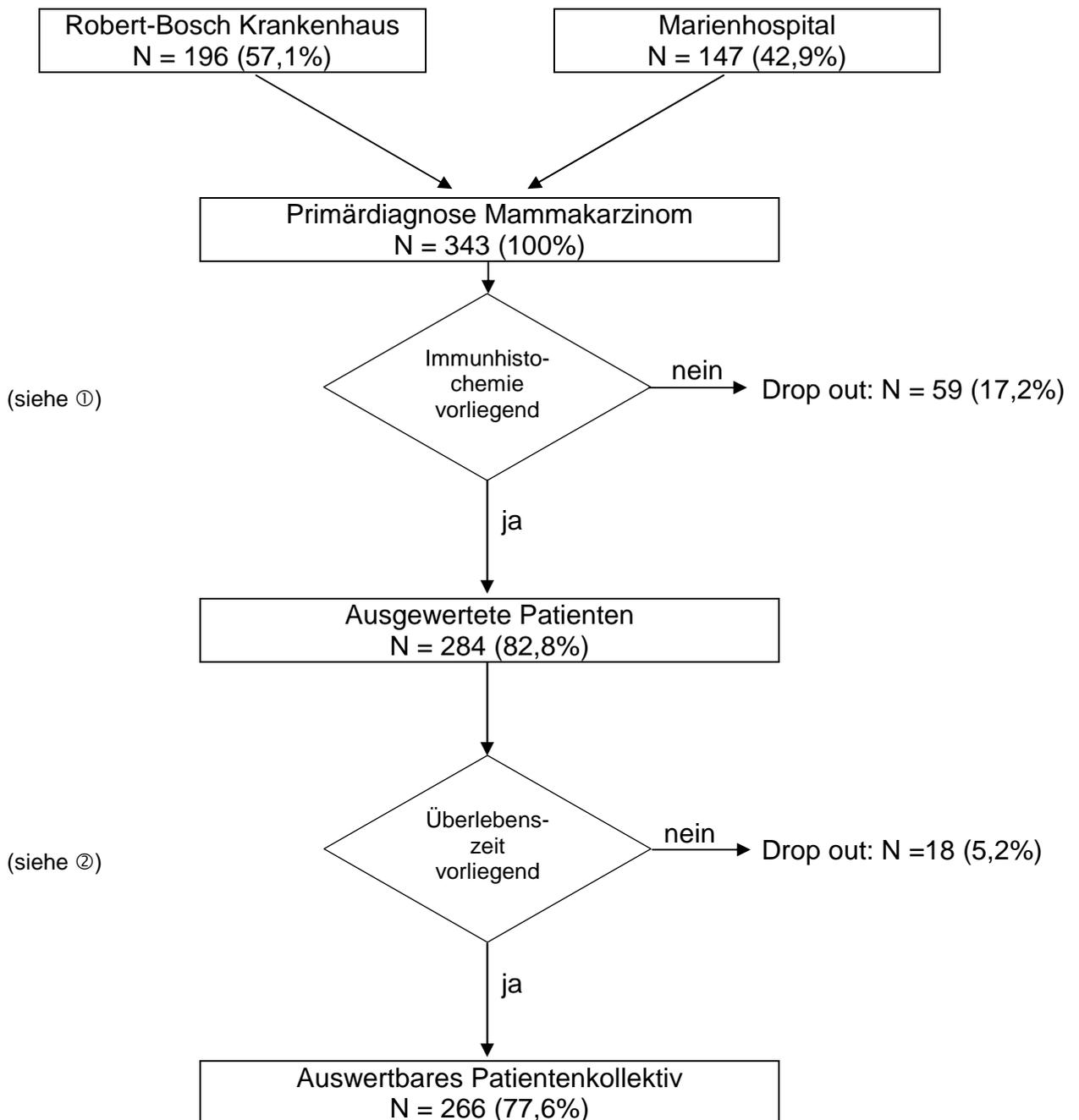
Zu ②:

Bei 19 Patienten (5,5%) lagen keine Angaben über eine Überlebenszeit vor, wobei bei einem Patienten weder eine Angabe der Überlebenszeit noch ein immunhistochemisches Auswertungsergebnis eines Präparates vorhanden war.

Von den 343 rekrutierten Patientinnen mussten also 77 (22,4%) aus der Studie ausgeschlossen werden.

Bei 266 Patientinnen (77,6%) lagen sowohl ein Auswertungsergebnis als auch Angaben zur Überlebenszeit vor. Diese gingen als auswertbare Fälle in die Studie ein $[(343 - 59 \times \text{①}) - 18 \times \text{②}]$.

Schaubild zur Patientenrekrutierung:



Gesamt Drop out
N = 77 (22,4%)

3.2 Datenerhebung

3.2.1 Datenerhebung bei Aufnahme in die Studie

Die Datenerhebung erfolgte durch Studium der Patientenakten und Ambulanzkarten in den Archiven des Marienhospitals und des Robert-Bosch-Krankenhauses. Fehlende Parameter wurden durch schriftliche oder telefonische Befragung der jeweils angegebenen Haus- oder Frauenärzte ergänzt.

Der Evaluationsbogen war in folgende Bereiche untergliedert:

1. Behandelnder Arzt und Krankenhaus:
 - Behandelndes Krankenhaus; Chefarzt der jeweiligen Abteilung
2. Persönliche Daten:
 - Name; Geburtsdatum; Adresse, Staatsangehörigkeit;
 - Anschrift des betreuenden Hausarztes und des betreuenden Frauenarztes;
 - Journalnummer; Präparatenummer
3. Klinische Daten:
 - Gewicht; Größe, Diabeteserkrankung;
 - Menarche; Menopause; bisherige Hormonbehandlung (auch zur Antikonzeption); mastopathische Vorerkrankung
 - Lebensalter und Menopausenstatus zum Zeitpunkt der Karzinomdiagnose;
 - Familienstand; Zahl der Kinder; Zahl der Schwangerschaften; Lebensalter bei Geburt des ersten Kindes; Stillzeiten
 - Familiäre Karzinombelastung
4. Histologischer Befund
 - Tumorlokalisation und –größe; histologischer Typ
 - Anzahl der entfernten und der befallenen Lymphknoten

- Fernmetastasen
 - TNM-Stadium
 - Hormonrezeptorstatus
5. Laborwerte zu Zeitpunkt der Primäroperation
- Hämoglobinwert; Erythrozytenzahl; Leukozytenzahl, Blutsenkungsgeschwindigkeit; Kalzium, LDH und AP im Serum.
 - Tumormarker CEA, CA 15-3 und CA 12-5
6. Art der Therapie
- Art der operativen Therapie
 - Durchführung und Art der Strahlentherapie
 - Durchführung einer Chemotherapie, Schema, Anzahl der durchgeführten Zyklen, Behandlungsbeginn und –ende; Bewertung der Response bei palliativer Chemotherapie
 - Durchführung einer Hormontherapie, Präparat, Behandlungsbeginn und -ende, Bewertung der Response bei palliativer Hormontherapie

3.2.2 Follow up

Zur Erhebung des weiteren Krankheitsverlaufs wurden im August 1998 und im Februar 2002 nochmals schriftliche und telefonische Befragungen der Haus- und Frauenärzte durchgeführt.

War in den mittlerweile EDV-gestützten Dokumentationsprogrammen der Kliniken eine Patientin während einer erneuten ambulanten oder stationären Vorstellung erfasst worden, wurde in den zugehörigen Patientenakten oder Ambulanzkarten nochmals recherchiert.

Besonders bei lange zurückliegender Primärtherapie lag häufig die aktuelle Nachsorge und Behandlung nicht mehr in den Händen der damals angegebenen Haus- und Frauenärzte. In diesen Fällen wurde, wenn möglich, mit den

Patientinnen Kontakt aufgenommen und eine direkte Befragung durchgeführt oder auf diesem Wege der aktuell nachsorgende Arzt festgestellt.

Konnten durch die oben genannten Maßnahmen keine weiteren Daten zum Krankheitsverlauf einer Patientin gewonnen werden, wurden bei der Einwohnermeldebehörde der letzte Meldestatus bzw., falls gegeben, das Sterbedatum ermittelt.

Für die statistische Auswertung wurde bei allen Patientinnen, bei denen lediglich ein Sterbedatum vorlag, die Erkrankung am Mammakarzinom als Todesursache angenommen.

Für die Berechnung des **overall survival** wurde in zwei Kategorien unterteilt:

1. Patient nicht am Mammakarzinom verstorben (censored data), d.h.
 - a. Der Patient wurde zu einem letzten Zeitpunkt als lebend in die Studie eingebracht, danach erfolgt kein follow-up mehr, der Patient scheidet also zu diesem Zeitpunkt als lebend aus der Studie aus.
 - b. Der Patient ist verstorben, das Mammakarzinom war jedoch nicht die Todesursache.
 - c. Der Patient lebt am Ende des Beobachtungszeitraumes (hier Februar 2002)
2. Patient am Mammakarzinom verstorben oder Todesursache unbekannt (s.o.)

Für die Berechnung des **disease free survival** wurde in drei Kategorien unterteilt:

1. Patient erlitt kein Rezidiv der Erkrankung (censored data):
 - a. Patient scheidet ohne Rezidiv aus der Studie aus (s.o.)
 - b. Patient ohne Rezidiv an einer anderen Erkrankung verstorben
2. Patient an einem Rezidiv des Mammakarzinoms erkrankt
3. Status unbekannt

3.3 Pathomorphologische Daten der ausgewerteten Patienten

Parameter		Anzahl	Prozentsatz
Histologie	Duktal	212	79,7
	Lobulär	25	9,4
	Sonderformen	29	10,9
Primärtumor (pT)	1	69	26,3
	2	134	51,1
	3	26	9,9
	4	33	12,6
	unbekannt	4	
Nodalstatus (pN)	0	112	42,7
	1	132	50,4
	2	13	5,0
	3	5	1,4
	unbekannt	4	
Fernmetastasen (M)	0	247	95,4
	1	12	4,6
	unbekannt	7	
Grading	1	10	3,8
	2	168	64,4
	3	83	31,8
	unbekannt	5	
UICC-Stadium	1	43	16,9
	2	143	56,1
	3	57	22,3
	4	12	4,7
	unbekannt	11	
Östrogenrezeptor	positiv	158	62,5
	negativ	95	37,5
	unbekannt	13	
Progesteronrezeptor	positiv	150	59,5
	negativ	102	40,5
	unbekannt	14	
Rezeptorstatus	ER+ / PR+	133	52,8
	ER- / PR +	17	6,7
	ER+ / PR -	24	9,5
	ER- / PR -	78	31,0
	unbekannt	14	

3.4 Histologische Aufarbeitung

Die histologische Aufarbeitung der Präparate erfolgte nach Standardmethoden, d.h. Fixierung in Formalinlösung, makroskopische Beurteilung und Beschreibung (Art des Präparates, Größe, Tumorgröße), Aufteilung in 0,5 cm dicke Gewebsblöcke im Tumorbereich, Paraffineinbettung, Anfertigung von 3 µm dicken Schnitten und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE).

Jeder Schnitt wurde nochmals auf das Vorhandensein von Tumorgewebe überprüft.

Zur histologischen Klassifikation wurde eine Einteilung in drei Kategorien, nämlich duktal, lobulär und Sonderformen (z.B. medullär, tubulär, muzinös, papillär, etc.) vorgenommen.

Nicht-invasive Tumoranteile wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt.

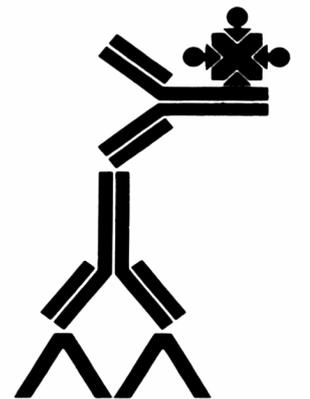
Die weitere histopathologische Klassifikation erfolgte nach den Regeln der UICC (International Union Against Cancer, 1987 bzw. 1992): Festlegung eines TNM-Stadiums, histopathologisches Grading und Stadiengruppierung.

3.5 Immunhistochemische Anfärbung

3.5.1 Färbeprinzip

Die Anfärbung von S100A6 erfolgte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Verfahren (ABC-Verfahren), welches auf einer 3 Schritt immunhistochemischen Färbereaktion beruht (Hsu et al. 1980). Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin mit extrem hoher Affinität physikalisch zu binden (Dissoziationskonstante $K = 10^{-15} \text{ M/l}$):

Zunächst bindet ein spezifischer Primärantikörper an das zu bestimmende Antigen. Ein Sekundärantikörper (sog. Brückenantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist und an diesen bindet, ist mit Biotin konjugiert. Als drittes Reagenz wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex verwendet, bei dem lediglich drei der vier Bindungsstellen des Avidinmoleküls besetzt sind. Die freie Stelle ermöglicht die Anlagerung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Jetzt wird durch Zugabe eines Chromogens und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) die Peroxidase und damit das Antigen sichtbar gemacht. Das Enzym Peroxidase bildet hierbei mit dem hinzugefügten Substrat H_2O_2 zunächst einen Komplex. Dieser reagiert zusammen mit einem Elektronendonator (hier DAB, ein Chromogen, das eine braune Farbe ergibt und in Alkohol unlöslich ist) zu einem Farbmolekül und Wasser. Das Farbmolekül präzipitiert und markiert somit das Antigen.



Schlüssel

 Gewebsantigen

 Primärantikörper

 Sekundärantikörper

 Peroxidase-Enzym

 Biotin

 Avidin

3.5.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Der monoklonale Antikörper gegen S100A6 wurde zunächst hinsichtlich seiner Verdünnung ausgetestet und die Vorbehandlung der Präparate mit Enzymen bzw. Wärme (Mikrowelle) erprobt. Folgendes Verfahren erwies sich als optimal:

1. Entparaffinierung und Rehydrierung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte für 30 Minuten in ein Detergens (Micro-clear) eingelegt.

Dann erfolgte die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe, d.h. die Präparate wurden für je 5 Minuten in eine 100, 96 und 70 %ige Etanollösung eingebracht.

2. Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität

Zur irreversiblen Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Präparate 30 Minuten in 3%ige H_2O_2 -Methanol Lösung eingelegt und anschließend mit Tris-Puffer gespült.

Die Substrat-Chromogenreaktion (Anfärbung der Immunkomplexe) beruht auf einer Reaktion des Enzyms Peroxidase mit H_2O_2 , wobei DAB (Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid) als H_2 -Donator zur Verfügung steht. Um diese Reaktion auf die Immunkomplexe und damit auf das gesuchte Antigen zu beschränken, muss also zunächst alle (endogene) Peroxidaseaktivität, die bereits im Gewebe vorhanden ist, irreversibel gehemmt werden.

Endogene Peroxidasen besitzen als prosthetische Gruppe (Coenzym) Hämin (entsprechend dem Häm des Hämoglobins) und kommen vorrangig in Erythrozyten und Leukozyten vor, d.h. die Aktivität der endogenen Peroxidasen ist gewöhnlich größtenteils auf Blutgefäße beschränkt.

3. Antigen-Demaskierung

Zur Aufschließung des Antigens und vollständigen Entfernung des Paraffins aus dem Gewebe wurden diese 3 x 5 Minuten bei 600 Watt in einer Mikrowelle

erhitzt und nochmals in Tris-Puffer (dieser enthält unter anderem Tween als weiteres Detergens) gespült.

4. Verringerung unspezifischer Hintergrundfärbung

Die häufigste Ursache für eine unspezifische Hintergrundfärbung ist die Anlagerung von Proteinen (Antikörper sind Proteine) an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate.

Um eine unspezifische Adsorption des Primärantikörpers an diese geladenen Stellen zu verhindern, wurde die Primärantikörper-Lösung mit einer neutralen Proteinlösung, hier unspezifisches Schweineserum, versetzt, welches diese besetzt.

Durch Zusatz von Kochsalzlösung (0,5M NaCl) zum Tris-Puffer wurde eine höhere Salzkonzentration erreicht, um unspezifische Bindungen noch effektiver zu reduzieren und damit Hintergrundfärbungen zu verringern.

5. Inkubation mit dem Primärantikörper

Jedes Präparat wurde mit 100 µl verdünnter Primärantikörperlösung (S100A6 rabbit, Verdünnung 1:150) über Nacht in der Feuchtkammer inkubiert.

Durch die langen Inkubationszeiten konnte bei höherer Verdünnung des Antikörpers eine intensivere spezifische Markierung bei Verringerung der unspezifischen Hintergrundfärbung erreicht werden.

Gleichzeitig kam es so zu einer Verringerung der relativen Differenz in der Inkubationszeit bei den unterschiedlichen Präparaten.

6. Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Nach erneutem Spülen mit Tris-Puffer und Vorbehandlung mit 5%igem unspezifischen Schweineserum über 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (goat anti rabbit biotinyliert (s. Kapitel 2.7. Chemikalien), Verdünnung 1:200) über 30 Minuten in der Feuchtkammer.

7. Markierung mit dem ABC-Komplex und Anfärbung mit DAB

Ein ABC-Elite Kit (Avidin und Biotin im Verhältnis 1:3 für 30 Minuten vorinkubiert) wurde auf die Schnitte aufgebracht (3 Tropfen pro Schnitt) und für 30 Minuten inkubiert.

Nach erneuter Spülung mit Tris-Puffer wurden die Schnitte in eine mit DAB (Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid) versetzte Phosphatpufferlösung für 30 Minuten eingelegt. Zum Reaktionsstart wurde H_2O_2 zugegeben, der Reaktionsstopp wurde unter fließendem Wasser erreicht.

8. Gegenfärbung, Dehydrierung und Einbettung

Zur besseren Kontrastierung wurde für 15 Sekunden mit Hämalaun (Hämatoxylin und Alaun, blaue Anfärbung des Chromatins) gegengefärbt.

Anschließend erfolgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (s.o.) und nach Vorbehandlung mit Microclear für 10 Minuten das Eindecken mit Gurr.

3.5.3 Qualitätskontrolle

1. Auslasskontrollen:

Zur Überprüfung des Färbeergebnisses wurden folgende Auslasskontrollen durchgeführt:

- Auslasskontrolle des Primärantikörpers (monoklonaler rabbit-anti-human S100A6 Antikörper)
- Auslasskontrolle des Sekundärantikörpers (biotinylierter monoklonaler goat-anti-rabbit Antikörper)
- Auslasskontrolle ABC-Elite Kit (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex)
- Auslasskontrolle des Chromogens (DAB)
- Auslasskontrolle primärer, sekundärer Antikörper sowie ABC und DAB

➤ Alle durchgeführten Auslasskontrollen ergaben **negative** Färbeergebnisse.

2. Positivkontrollen:

Zur Überprüfung des Versuchsaufbaus wurden Positivkontrollen durchgeführt. Hierbei wurde ein monoklonaler mouse-anti-human Cytokeratin 18 Antikörper als Primärantikörper und ein biotinylierter monoklonaler horse-anti-mouse Antikörper als Sekundärantikörper verwendet.

Cytokeratin 18 ist ein 45 kDa großes, saures Polypeptid aus einer Familie von bislang 20 Cytokeratinen. Es gehört zu den Intermediärfilamenten und kommt typischerweise als Teil des Zytoskeletts in einfachen, unreifen Epithelzellen vor. Dementsprechend waren in den Kontrollpräparaten sowohl die Drüsenepithelien als auch die Tumorzellen angefärbt.

Die Kontrollen wurden standardmäßig bei 10% aller Gewebeproben eingesetzt.

➤ Alle durchgeführten Positivkontrollen ergaben **positive** Färbeergebnisse.

3.6 Auswertung der Präparate

Zur Auswertung der Präparate wurden diese mit dem Mikroskop (100- und 400-fache Vergrößerung) durchgemustert.

Vor Beginn der Auswertung wurden zunächst 50 Präparate gemustert und Referenzpräparate festgelegt. Dann wurden sämtliche Präparate in zwei unabhängigen Durchgängen jeweils einmal durchgemustert (Intraobservervariabilität).

Etwa jedes dritte Präparat (N=109, 31,7%) wurde von einem Zweitgutachter (Facharzt für Pathologie) nachgemustert (Interobservervariabilität).

a. Färbeintensität (staining intensity = SI)

Beurteilt wurde die Intensität der Anfärbung des Zytoplasmas der Tumorzellen, wobei quantitativ zwischen fehlender (0), schwacher (1), mässiger (2) und starker (3) Färbung unterschieden wurde.

Ebenso wurde die Intensität der Anfärbung der Zellkerne der Tumorzellen beurteilt, wobei hier nur zwischen fehlender (0), schwacher (1) und starker (2) Färbung unterschieden wurde.

Die Anfärbung von Tumorstroma und falls vorhanden unauffälliger Ductuli und Lobuli sowie eine begleitende Entzündungsreaktion wurden zwar beurteilt, gingen aber ebensowenig in die weitere statistische Auswertung mit ein wie der Intensitätsvergleich zwischen Tumorzellen und Tumorstroma.

b. Prozentsatz der positiven Zellen (PP)

Der Anteil der angefärbten Tumorzellen gegenüber den nicht angefärbten Tumorzellen wurde subjektiv abgeschätzt und in Prozentwerten festgehalten. Anschließend wurden diese Werte in Gruppen eingeteilt:

0	= keine	S100A6 -positiven Tumorzellen
1	= 1 – 20%	S100A6 -positive Tumorzellen
2	= 21 – 50%	S100A6 -positive Tumorzellen
3	= 51 – 80%	S100A6 -positive Tumorzellen
4	= 81 – 100%	S100A6 -positive Tumorzellen

c. Immunreaktiver Score (IRS)

In Anlehnung an die immunhistochemische Bestimmung der Östrogenrezeptordichte beim Mammakarzinom (Remmele et al.,1987) wurde der immunreaktive Score als Produkt aus Färbeintensität und Prozentsatz positiv gefärbter Zellen festgelegt ($IRS = SI \times PP$).

Folgende Scores waren demnach möglich: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12.

Der hypothetische Maximalwert war somit $3 \times 4 = 12$.

Der IRS für S100A6 entspricht also einem ordinalen Parameter.

3.7 Chemikalien

Antikörper für die immunhistochemische Anfärbung:

1. Primärer Antikörper:

Monoklonaler rabbit-anti-human S100A6 Antikörper
(Fa. DAKO, Code No. A 5115)

2. Sekundärer Antikörper:

Monoklonaler, biotinylierter goat-anti-rabbit Antikörper
(Fa. VECTOR, Catalog No. BA-1000)

3. Primärer Antikörper für die Positivkontrolle:

Monoklonaler mouse-anti-human Cytokeratin 18 Antikörper
(Fa. DAKO, Code No. M 7010)

Kits zur Markierung und Anfärbung der Immunkomplexe:

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex:

VECTASTAIN[®] Elite ABC Kit (Standard)
(Fa. VECTOR, Catalog No. PK-6100)

Chromogen:

DAB Substrate Kit
(Fa. VECTOR, Catalog No. SK-4100)

3.8 Photographische Techniken

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einer Sony DCC Kamera. Die Vergrößerung wurde hierbei mit einem Leica DMRB Mikroskop durchgeführt.

Für die weitere Verarbeitung wurde das Bilderfassungssystem Diskus verwendet.

3.9 Statistische Methoden

Die Patienten bezogenen Daten sowie die Auswertungsergebnisse wurden in einer Excel 97 Datei erfasst und zur weiteren Verarbeitung in das Statistikprogramm SPSS 9.1 (Statistical Package for the Social Sciences) übertragen. Sämtliche unten angeführten statistischen Verfahren wurden hiermit ausgeführt.

Nominaldatenvergleich:

Um Häufigkeitsunterschiede zwischen zwei Kollektiven aufzuzeigen, z.B. beim Vergleich des ein- und ausgeschlossenen Patientenkollektivs, wurden χ^2 -Methoden verwendet. Überprüft wurde die Nullhypothese, dass beide Kollektive sich nicht unterscheiden.

4-Felder- χ^2 -Test: Für den Vergleich der relativen Häufigkeiten von zwei alternativen Merkmalen wurde der 4-Felder- χ^2 -Test verwendet, also z.B. bei der Analyse ob ein- und ausgeschlossenes Patientenkollektiv sich bei der Verteilung von positivem und negativem Östrogenrezeptorstatus unterscheiden.

k x l - χ^2 -Test: Für den Vergleich von mehrfach gestuften Merkmalen wurde dem allgemeinen Ansatz entsprechend der k x l - χ^2 -Test (Mehr-Felder- χ^2 -Test) verwendet, also z.B. beim Vergleich des T- oder N-Stadium in den beiden Kollektiven.

Geprüft wurde auf dem 5%-Niveau ($p=0,05$). Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% wurden also als statistisch signifikant angesehen.

hen. Die Testung erfolgte zweiseitig, das heißt es wurde sowohl die 5. als auch die 95. Perzentile in die Berechnung mit einbezogen.

Intervalldatenvergleich:

t-Test für unabhängige Stichproben: Um Unterschiede der Intervalldaten zweier Kollektive aufzuzeigen wurden die Mittelwerte verglichen (Vergleich zweier Stichprobenmittelwerte aus unabhängigen Stichproben). Überprüft wird hierbei die Nullhypothese, dass beide Mittelwerte gleich sind.

Der t-Wert ist hierbei der Quotient aus der Differenz der Mittelwerte und dem Standardfehler dieser Differenz. Da die Summe der Stichprobenumfänge stets über $N=50$ lag, wurde für t eine Normalverteilung angenommen.

Eine Bestätigung der Hypothese, das heißt eine statistische Signifikanz, bestand bei zweiseitiger Betrachtungsweise wieder für $p < 0,05$.

Überlebenszeitanalyse:

Kaplan-Meier Überlebenskurven: In der „Survival function“ wird graphisch die Wahrscheinlichkeit $S(t)$ dargestellt mit der ein Patient aus einem Kollektiv einen bestimmten Zeitpunkt t überlebt.

Sehr oft kann die Überlebenszeit in Bezug auf die zu untersuchende Erkrankung nicht exakt bestimmt werden, da ein unvollständiges Follow-up vorliegt oder Patienten an einer anderen Erkrankung versterben. Diese Patienten gehen als „zensiert“ in die Überlebensschätzung mit ein.

Die Schätzung von $S(t)$ wird nach dem Verfahren von Kaplan-Meier in Intervallen durchgeführt und zwar so, dass jeder Todesfall am Ende eines Intervalls liegt. Alle Zensierungen, die innerhalb des Intervalls auftreten, zählen für die Bestimmung von $S(t)$ in diesem Intervall nicht mehr. Alle Zensierungen, die gleichzeitig mit dem echten Todesfall auftreten, zählen, als hätten sie das Intervall vollständig überlebt und werden ab dem nächsten Intervall nicht mehr mitberücksichtigt.

Die Kaplan-Meier Überlebenskurve als Annäherung an die Überlebensfunktion $S(t)$ ist dementsprechend eine Treppenkurve.

Vergleich der Kaplan-Meier Überlebenskurven:

Log-rank-Test: Um einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Kaplan-Meier Überlebenskurven aufzuzeigen wurde der Log-rank Test verwendet. Maßgebend ist hierbei die Differenz aus insgesamt beobachteten Ereignissen und erwarteten Ereignissen. Da hier beobachtete und erwartete Ereignisse für die Berechnung herangezogen werden, folgt auch dieses Verfahren in etwa einer χ^2 -Verteilung.

Der Log-rank Wert ist ein Quotient mit dem Quadrat der oben genannten Differenz als Dividend und der Varianz der Differenz als Divisor. Überprüft wird die Nullhypothese, dass beide Überlebenskurven sich nicht unterscheiden. Eine signifikanter Unterschied wurde für $p < 0,05$ angenommen.

Ermittlung der Inter- und Intraobservervariabilität:

Kappa-Statistik : Da es sich bei der Ermittlung des S100A6-IRS um eine subjektive Einschätzung des jeweiligen Auswerters handelt, wurde zur Überprüfung der Intra- und Interobservervariabilität die Kappa-Statistik (K) verwendet (Siegel, 1988). Diese ermittelt den Grad der Übereinstimmung über den Grad der zufälligen Übereinstimmung hinaus. Der Kappa-Koeffizient K ist hierbei das Verhältnis (Quotient) von Grad der Übereinstimmung zu maximaler Übereinstimmung, jeweils korrigiert um den Grad der zufälligen Übereinstimmung.

Die K-Werte können Werte von -1 bis +1 annehmen, wobei Werte von $K = 0,2 - 0,4$ eine schlechte, von $K = 0,4 - 0,6$ eine mässige, $K = 0,6 - 0,8$ eine gute und $K = 0,8 - 1$ eine sehr gute Übereinstimmung bedeuten.

4. Ergebnisse

4.1 Patienten

4.1.1 Vergleich des eingeschlossenen mit dem ausgeschlossenen Patientenkollektiv

Von den 343 Patienten die in die Studie eingegangen waren, konnten lediglich 266 ausgewertet werden (siehe Kapitel 2.1.2 Bestimmung des auswertbaren Patientenkollektivs).

Bei den 77 ausgeschlossenen Patienten lagen bei 59 Patienten keine verwertbaren Präparate zur Bestimmung des immunreaktiven Scores für S100A6 vor, bei 19 Patienten gab es keinerlei Angaben über den weiteren Krankheitsverlauf (bei einem Patienten lag weder ein Präparat noch ein Follow-up vor).

Um einen möglichen systemischen Fehler (Bias) durch den Ausschluss aufzuzeigen, wurde das in die Auswertung eingeschlossene Patientenkollektiv mit dem ausgeschlossenen Kollektiv verglichen.

Zum Vergleich der Nominaldaten wurde bei alternativen (2-fach gestuften) Merkmalen der 4-Felder- χ^2 -Test, bei mehrfach gestuften Merkmalen der $k \times l$ - χ^2 -Test durchgeführt.

Für die Intervalldaten wurde der t-Test zum Vergleich zweier Stichprobenmittelwerte aus unabhängigen Stichproben herangezogen.

Alle nachfolgend dargestellten Vergleiche der beiden Kollektive konnten keinen signifikanten Unterschied in der Zusammensetzung feststellen, sodass durch den Ausschluss des nicht verwertbaren Kollektivs kein Bias, das heißt eine Veränderung in der relativen Zusammensetzung des Kollektivs entstanden war. Im weiteren wurde das eingeschlossene Patientenkollektiv mit „in“ (included), das ausgeschlossene mit „ex“ (excluded) bezeichnet.

4.1.1.1 Vergleich der Nominaldaten

Zunächst wurde untersucht, ob sich die beiden Kollektive in der Verteilung des Tumorstadiums (T-, N-, M-Status, UICC-Stadium (siehe Anhang, S.133)), der Steroidrezeptoren oder des histologischen Typs unterscheiden.

1. Tumorgröße

Bei 338 Patienten (98,5%) war die Tumorgröße bekannt und konnte nach den TNM-Kriterien klassifiziert werden.

Tab. 4.1.1.1: $k \times l$ - χ^2 -Test zum Vergleich der Tumorgröße (T) des ex- u. included Kollektivs

		ex	In	Zeilensumme
PT1	Ist	27	69	96
	Soll	21,6	74,4	96,0
PT2	Ist	28	134	162
	Soll	36,4	125,6	162,0
PT3	Ist	10	26	36
	Soll	8,1	27,9	36,0
PT4	Ist	11	33	44
	Soll	9,9	34,1	44,0
Spaltensumme	Ist	76	262	338
	Soll	76,0	262,0	338,0

$$\chi^2 = 3,451, \text{ df } 3, \text{ p (zweiseitig) } = 0,327$$

2. Nodalstatus

Bei 337 Patienten (98,3%) war der Nodalstatus angegeben worden. Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl für N2 und N3 im ausgeschlossenen Kollektiv ist das Ergebnis nur eingeschränkt aussagekräftig.

Tab. 4.1.1.2: $k \times l$ - χ^2 -Test zum Vergleich des Nodalstatus (N) des ex- u. included Kollektivs

		ex	in	Zeilensumme
N0	Ist	36	112	148
	Soll	32,9	115,1	148,0
N1	Ist	35	132	167
	Soll	37,2	129,8	167,0
N2	Ist	1	13	14
	Soll	3,1	10,9	14,0
N3	Ist	3	5	8
	Soll	1,8	6,2	8,0
Spaltensumme	Ist	75	262	337
	Soll	75,0	262,0	337,0

$$\chi^2 = 3,415, \text{ df } 3, \text{ p (zweiseitig) } = 0,327$$

3. Metastasenstatus

Bei 332 Patienten (96,8%) konnte ein Metastasenstatus festgelegt werden. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs für M1 im ausgeschlossenen Kollektiv, wurde zusätzlich der Fisher-Yates-Test für exakte Wahrscheinlichkeiten angewendet.

Tab. 4.1.1.3: 4-Felder- χ^2 -Test z. Vergleich des M-Status (M) des ex- u. included Kollektivs

		ex	in	Zeilensumme
M0	Ist	70	247	317
	Soll	69,7	247,3	317,0
M1	Ist	3	12	15
	Soll	3,3	11,7	15,0
Spaltensumme	Ist	73	259	332
	Soll	73,0	259,0	332,0

$\chi^2 = 0,036$, df 1, **p (zweiseitig) = 0,849**, exakte Signifikanz n. Fisher 1,000.

4. UICC-Stadium

Bei 328 Patienten (95,6%) war nach der TNM-Klassifikation eine Einteilung in die von der UICC vorgeschlagenen Stadien vorgenommen worden (siehe Anhang S.133).

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs im höchsten Stadium (lediglich 3 Patienten im ausgeschlossenen Kollektiv entsprachen Stadium 4), erfolgte eine Zusammenfassung der Stadien 1 und 2 sowie 3 und 4.

Tab. 4.1.1.4: 4-Felder- χ^2 -Test z. Vergleich der UICC-Stadien des ex- u. included Kollektivs

		ex	in	Zeilensumme
1+2	Ist	55	186	241
	Soll	53,6	187,4	241,0
3+4	Ist	18	69	87
	Soll	19,4	67,6	87,0
Spaltensumme	Ist	73	255	328
	Soll	73,0	255,0	328,0

$\chi^2 = 0,168$, df 1, **p (zweiseitig) = 0,682**

5. Östrogenrezeptorstatus

Bei 325 Patienten (94,8%) lag ein Östrogenrezeptorstatus vor.

Tab. 4.1.1.5: 4-Felder- χ^2 -Test z. Vergleich d. E2-Rezeptorstatus d. ex- u. included Kollektivs

		ex	in	Zeilensumme
ER+	Ist	43	158	201
	Soll	44,5	156,5	201,0
ER-	Ist	29	95	124
	Soll	27,5	96,5	124,0
Spaltensumme	Ist	72	253	325
	Soll	72,0	253,0	325,0

$$\chi^2 = 0,177, \text{ df } 1, \text{ p (zweiseitig) } = 0,674$$

6. Progesteronrezeptorstatus

Bei 322 Patienten (93,9%) war der Progesteronrezeptorstatus bekannt.

Tab. 4.1.1.6: 4-Felder- χ^2 -Test zum Vergleich des P-Rezeptorstatus des ex- und included Patientenkollektivs

		ex	In	Zeilensumme
PR+	ist	37	150	187
	soll	40,7	146,3	187,0
PR-	ist	33	102	135
	soll	29,3	105,7	135,0
Spaltensumme	ist	70	252	322
	soll	70,0	252,0	322,0

$$\chi^2 = 1,000, \text{ df } 1, \text{ p (zweiseitig) } = 0,317$$

7. Menopausenstatus

Bei 247 Patienten (72%) konnte eine klare Zuordnung zum Menopausenstatus erfolgen.

Tab. 4.1.1.7: 4-Felder- χ^2 -Test zum Vergleich des Menopausenstatus des ex- und included Patientenkollektivs

		ex	In	Zeilensumme
Praemenopausal	Ist	19	54	73
	Soll	16,6	56,4	73,0
Postmenopausal	ist	37	137	174
	Soll	39,4	134,6	174,0
Spaltensumme	ist	56	191	247
	Soll	56,0	191,0	247,0

$$\chi^2 = 0,665, \text{ df } 1, \text{ p (zweiseitig) } = 0,415$$

8. Histologischer Typ

Bei 342 Patienten (99,7%) lag ein histologischer Befund mit Gewebstypisierung vor. Bei einem Patienten des ausgeschlossenen Kollektivs war der histologische Befund nicht mehr eruierbar.

Tab. 4.1.1.8: $k \times l$ - χ^2 -Test zum Vergleich des histologischen Typs des ex- und included Patientenkollektivs

		Ex	in	Zeilensumme
Duktal	Ist	63	212	275
	Soll	61,1	213,9	275,0
Lobulär	Ist	6	25	31
	Soll	6,9	24,1	31,0
Andere	Ist	7	29	36
	Soll	8,0	28,0	36,0
Spaltensumme	Ist	76	266	342
	Soll	76,0	266,0	342,0

$$\chi^2 = 0,383, \text{ df } 2, \text{ p (zweiseitig) } = 0,826$$

4.1.1.2 Vergleich der Intervalldaten

Hier wurde das Lebensalter der beiden Kollektive und die im Follow-up ermittelten Daten verglichen. Das mittlere Lebensalter wurde in Jahren, die Zeitspannen bis zum Auftreten des jeweiligen Ereignisses in Monaten angegeben.

Eine Gleichheit der Populationsvarianzen wurde nicht vorausgesetzt, d.h. t wurde mit den jeweiligen Varianzen für beide Kollektive berechnet.

P wurde für eine zweiseitige Betrachtungsweise angegeben.

Tab. 4.1.1.9: Vergleich der Intervalldaten des ex- und included Kollektivs

		N	Mittelwert	SD	T	p
Alter	In	266	55,34	13,25	-0,884	0,379
	Ex	77	56,85	13,13		
OS	In	266	75,04	44,48	0,747	0,457
	Ex	58	79,34	38,72		
DFS	In	105	33,78	32,52	0,358	0,723
	Ex	20	36,60	32,20		
Lokalrezidiv	In	51	39,33	35,52	-0,720	0,994
	Ex	12	38,50	36,27		
Fernmetastase	In	87	32,59	30,29	0,733	0,472
	Ex	16	39,06	32,85		

Alter: Arithmetisches Mittel der Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Jahren

OS: overall survival: Zeit bis zum Tod oder Censoring in Monaten

DFS: disease free survival: Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in Monaten

Lokalrezidiv: Zeit bis zum Auftreten eines Lokalrezidivs in Monaten

Fernmetastase: Zeit bis zum Auftreten einer Fernmetastase in Monaten

Ergebnis Kapitel 4.1.1:

Vergleich des ein- und ausgeschlossenen Patientenkollektivs:

Beim Vergleich der beiden Kollektive zeigte keiner der betrachteten Parameter einen statistisch signifikanten Unterschied.

Der Ausschluss der Patienten ohne verwertbare Messergebnisse führte also zu keiner Veränderung des Kollektivs in seiner relativen Zusammensetzung.

4.1.2 Klinische Daten und deren prognostische Bedeutung

Die erfassten klinischen Daten Lebensalter und Menopausenstatus wurden durch die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier auf ihre prognostische Wertigkeit überprüft.

Bezüglich des Lebensalters wurde nach Ermittlung des Mittelwertes in eine jüngere und eine ältere Subgruppe unterteilt. Bezüglich des Menopausenstatus wurden die prämenopausalen mit den postmenopausalen Patientinnen verglichen.

In jeder Subgruppe wurde die Anzahl der am Mammakarzinom verstorbenen Patientinnen ermittelt. Zur Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier und der mittleren Überlebenszeit in Monaten wurden die ausgeschiedenen („censored“) Patientinnen miteinbezogen.

Die Überprüfung auf signifikant unterschiedliche Überlebenswahrscheinlichkeiten erfolgte abschließend mit dem log-rank Test.

4.1.2.1 Lebensalter

Das mittlere Lebensalter der 266 ausgewerteten Patienten betrug zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 55,34 Jahre (Standardabweichung 13,25 Jahre).

Die jüngste Studienpatientin war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 26 Jahre alt, die älteste war 88 Jahre alt.

Nach Unterteilung in ein jüngeres (Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung kleiner als das durchschnittliche Lebensalter) und ein älteres (Lebensalter höher als der Mittelwert) Kollektiv wurde die Überlebenswahrscheinlichkeit berechnet.

Tab.: 4.1.2.1a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen auf das Lebensalter

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
< 55,5 J	133	42	91	135,29 (6,40)
> 55,5 J	133	43	90	120,95 (6,50)
Gesamt	266	85	181	

Tab.: 4.1.2.1b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom Lebensalter

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahr ÜLZ
< 55,5J	99,2	86,8	77,5	61,5
> 55,5 J	94,7	76,2	67,5	63,6

Signifikanzanalyse:

<55,5J ⇔ >55,5J: df: 1, log rank 0,94, **P-value 0,3323**

Der insgesamt geringeren Lebenserwartung des älteren Patientenkollektivs stand das in der Regel raschere Fortschreiten der Erkrankung im jüngeren Kollektiv entgegen. Beide Effekte hoben sich offensichtlich nahezu gegenseitig auf, so dass die Überlebenszeiten und –wahrscheinlichkeiten der beiden Kollektive nicht signifikant differierten, lediglich die Tendenz einer besseren Prognose für die jüngeren Patientinnen war erkennbar.

4.1.2.2 Menopausenstatus

Lediglich bei 191 Patientinnen (71,8%) konnte eine eindeutige Festlegung des Menopausenstatus erfolgen. 54 Patientinnen (28,3%) waren demnach zum Zeitpunkt der Diagnosestellung prämenopausal, 137 Patientinnen (71,7%) befanden sich bereits in der Postmenopause.

Tab. 4.1.2.2a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen auf den Menopausenstatus

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
PraeMP	54	21	33	128,51 (9,21)
PostMP	137	51	86	118,82 (6,54)
Gesamt	191	72	119	

PraeMP = Patientin befand sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in der Prämenopause
 PostMP = Patientin befand sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in der Postmenopause

Tab.: 4.1.2.2b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom Menopausenstatus

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahr ÜLZ
PraeMP	100,0	84,8	79,0	57,3
PostMP	94,9	74,5	64,8	58,5

Signifikanzanalyse:

praemenopausal ⇔ postmenopausal: df: 1, log rank 0,34, **P-value 0,5579**

Auch hier war lediglich die Tendenz zur besseren Prognose für die prämenopausalen Patientinnen erkennbar. Aufgrund der unter 3.1.2.1 Lebensalter beschriebenen, sich gegenseitig aufhebenden Effekte zeigte sich kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil für eines der beiden Kollektive.

4.1.3 Ergebnisse des Follow-up

4.1.3.1 Nominaldaten

Nachfolgend ist die Anzahl der eingetretenen Ereignisse, d.h. Lokalrezidive, Fernmetastasen, Rezidive allgemein und Todesfälle aufgelistet.

Da bei einigen Patientinnen lediglich die Angaben der Einwohnermeldebehörde vorlagen (Sterbedatum bzw. letzter Meldestatus), kam es in jeder Zeile zu einer bestimmten Anzahl unbekannter Fälle.

Für die weiteren Berechnungen wurden die Patientinnen, bei denen die Todesursache unbekannt war, unter die Gruppe der am Mammakarzinom verstorbenen subsummiert. Jene, die nicht am Mammakarzinom verstorben waren, gingen in die Gruppe der ausgeschiedenen („censored“) Patienten ein (s.a. Kapitel 3.2.2)

Tab.: 4.1.3.1: Follow-up Nominaldaten

		Anzahl	Prozentsatz
Lokalrezidiv	Ja	51	20,2
	Nein	201	79,8
	Unbekannt	14	
Fernmetastase im Verlauf	Ja	87	34,8
	Nein	163	65,2
	Unbekannt	16	
Rezidiv allgemein	Ja	105	42,0
	Nein	145	58,0
	Unbekannt	16	
Todesursache	Lebend	164	61,7
	Tod nicht durch Mammakarzinom	17	6,4
	Tod durch Mammakarzinom	77	28,9
	Todesursache unbekannt	8	3,0

4.1.3.2 Intervalldaten

Die Zeiträume der aufgeführten Intervalldaten sind in Monaten angegeben.

- **Variationsbreite** (range): Differenz zwischen maximal (Max) und minimal (Min) gemessenem Wert.
- **Exzess** (kurtosis): Maß für die Konzentration der gemessenen Einzelwerte um den Modalwert (Maximalwert in der graphischen Darstellung einer Verteilung). Der Exzess einer Normalverteilung beträgt 0. Negative Werte zeigen einen breitgipfligeren, positive Werte einen schmalgipfligeren Verlauf im Vergleich zur Normalverteilung an.
- **Schiefe** (skewness): Angabe über das Verteilungsmuster der gemessenen Werte. Eine „positive Schiefe“ zeigt eine linkssteile Verteilung an, d.h. der Modalwert (s.o.) liegt links vom Mittelwert, bei einer negativen Schiefe ist es umgekehrt.

Tab.: 4.1.3.2: Follow-up Intervalldaten (in Monaten)

	N	Mittelwert	SD	Variationsbreite (Min/Max)	Exzess	Schiefe
FM	87	32,59	30,29	140 (0/140)	2,97	1,66
LR	51	39,33	35,52	164 (4/168)	2,43	1,55
DFS	105	33,78	32,52	167 (0/167)	3,37	1,78
OS	266	75,04	44,48	185 (2/187)	-0,61	0,39

N: Anzahl der in die Untersuchung eingegangenen Patientinnen

SD: Standardabweichung

FM: Zeit bis zur Diagnosestellung einer eingetretenen Fernmetastasierung in Monaten

LR: Zeit bis zur Diagnosestellung eines Lokalrezidivs in Monaten

DFS: disease free survival: Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in Monaten

OS: overall survival: Zeit bis zum Tod oder Ausscheiden aus der Studie in Monaten

Das mittlere Follow-up der vorliegenden Studie betrug somit 6,25 Jahre (75,04 Monate).

Da bei einigen Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Fernmetastasierung vorlag, war der minimal gemessene Wert in den Zeilen FM und DFS 0.

Die durchgehend „positiven Schiefen“ zeigen eine linkssteile Verteilung an, d.h. das Maximum der neu aufgetretenen Rezidive pro Zeiteinheit lag wie zu erwarten vor dem Mittelwert.

Die positiven Exzesswerte zeigen eine relative Konzentration der gemessenen Zeitspannen um ein Maximum (Modalwert) von ungefähr 3 Jahren an.

Der negative Exzesswert bei der Betrachtung des overall-survival zeigt eine breite Streuung der Follow-up Intervalle um das mittlere Follow-up.

4.2 Prognostische Bedeutung der konventionellen Prognosefaktoren

Das ausgewertete Patientenkollektiv wurde bezüglich der erfassten konventionellen Prognosefaktoren durch die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Kaplan-Meier analysiert.

Die Wertigkeiten der Prognosefaktoren wurden hierzu zunächst in verschiedene Subgruppen (z.B. entsprechend der Stadieneinteilung der UICC) eingeteilt. Anschließend wurde die Anzahl der Ereignisse (hier: Tod durch Mammakarzinom) in der jeweiligen Subgruppe ermittelt. Unter Einbeziehung der ausgeschiedenen („censored“) Patienten wurde dann die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier und die mittlere Überlebenszeit in Monaten berechnet. Durch eine Signifikanzanalyse mit dem log-rank-Test wurde abschließend überprüft, ob in den einzelnen Subgruppen signifikant unterschiedliche Überlebenswahrscheinlichkeiten vorlagen.

4.2.1 Ergebnisse der klassischen Prognosefaktoren

Als klassische Prognosefaktoren wurden bei der Datenerhebung neben den das Tumorstadium bestimmenden Faktoren Tumorgröße (T), Nodalstatus (N) und Fernmetastasierung (M) (die Erfassung war nach den UICC-Kriterien der 5. Auflage von 1997 erfolgt) auch die morphologischen Kriterien Grading und histologischer Typ erfasst.

Zusätzlich wurde nach der TNM-Klassifikation eine Einteilung in die von der UICC vorgeschlagenen Stadiengruppierungen vorgenommen (siehe Anhang S.133).

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Prognosefaktoren-Analyse aufgelistet. Hierbei wird jeweils zunächst die Einteilung der Subgruppen angegeben, dann folgen tabellarisch die Absolutwerte mit Angabe des Mittelwertes der Überlebenszeit in Monaten und die Überlebenswahrscheinlichkeit für 1, 3, 5 und 10 Jahre.

4.2.1.1 Tumorgröße (T)

Bezüglich der histologischen Tumorgröße wurden zwei Subgruppenanalysen durchgeführt:

- ① Testung der Tumorstadien 1-4 gegeneinander
- ② Testung von Tumorstadium 1 gegen die T-Stadien 2-4

Die Einteilung in T-Stadien wurde nach der UICC-Nomenklatur von 1997 vorgenommen (siehe S. 133) :

- T1 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- T2 Tumor zwischen 2 cm und 5 cm in größter Ausdehnung
- T3 Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- T4 Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut

Wie oben beschrieben wurde zunächst die Anzahl der Todesfälle für die jeweiligen Tumorstadien ermittelt und dann unter Einbeziehung der ausgeschiedenen („censored“) Patienten die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier und die mittlere Überlebenszeit in Monaten berechnet.

Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem χ^2 -Test (log-rank Test).

Tab. 4.2.1.1a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezgl. der Tumorgröße

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
pT1	69	11	58	158,99 (6,93)
pT2	134	44	90	127,86 (7,12)
pT3	26	10	16	112,14 (13,97)
pT4	33	17	16	90,86 (12,82)
pT2-4	193	71	122	121,00 (5,99)
Gesamt	262	82	180	

Tab. 4.2.1.1b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit von der Tumorgröße

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
PT1	98,6	91,1	86,2	82,3
PT2	99,3	86,7	73,3	58,6
PT3	96,2	80,8	68,2	51,1
PT4	84,6	64,9	46,8	46,8

Signifikanzanalyse:

① pT1 ⇔ pT2 ⇔ pT3 ⇔ pT4: df: 3, log rank 21,27, **P-value 0,0001**

② pT1 ⇔ pT2-4: df: 1, log rank 12,11, **P-value 0,0005**

Beide Analysen ergaben hochsignifikante Unterschiede bezüglich des Überlebens (① p= 0,0001, ② p=0,0005), d.h. ein höheres T-Stadium geht mit einer deutlich schlechteren Überlebensprognose einher.

Die Tumorgöße wird also, wie in der Mehrzahl der internationalen Studien, auch im hier verwendeten Patientenkollektiv als exzellenter Prognosefaktor nachgewiesen.

4.2.1.2 Nodalstatus (N)

Die Einteilung in N-Stadien wurde wie oben nach der UICC-Nomenklatur von 1997 vorgenommen:

N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 Metastasen in beweglichen, ipsilateralen, axillären Lymphknoten

N2 Untereinander oder an andere Strukturen fixierte Lymphknotenmetastasen in ipsilateralen, axillären Lymphknoten

N3 Ipsilaterale Lymphknotenmetastasen entlang der A. mammaria int.

Da höhere N-Stadien nur sehr selten vorlagen (N2=13; N3 = 5), wurde lediglich eine Testung von negativem gegen positiven regionären Lymphknotenbefall durchgeführt.

Tab. 4.2.1.2a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezgl. des Nodalstatus

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
pN0	112	18	94	152,82 (5,54)
pN1	132	53	79	118,99 (7,06)
pN2	13	8	5	57,87 (12,31)
pN3	5	3	2	52,50 (10,18)
pN1-3	150	64	86	114,07 (6,72)
Gesamt	262	82	180	

Tab. 4.2.1.2b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom Nodalstatus

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahr ÜLZ
pN0	100,0	91,4	89,2	80,2
pN1	96,2	77,5	65,0	53,7
pN1-3	95,3	76,0	61,8	50,4

Signifikanzanalyse:

pN0 ⇔ pN1-3: df: 1, log rank 21,92, **P-value 0,0000**

Auch hier ergaben beide Analysen wie erwartet hochsignifikante Unterschiede für die Überlebensprognose ($p=0,0000$) Für die höheren N-Stadien ist allerdings aufgrund der geringen Fallzahl die Aussagekraft sicher sehr eingeschränkt zu betrachten.

Auch der Lymphknotenstatus N ist, wie in den internationalen Studien bereits vorbeschrieben, in unserem Kollektiv ein exzellenter Prognosefaktor.

4.2.1.3 Metastasenstatus (M)

Bezüglich des Metastasenstatus wurde die adjuvante Situation (M0) gegen die palliative Situation (M1) getestet.

Tab. 4.2.1.3a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen auf den Metastasenstatus

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
M0	247	71	176	137,19 (4,91)
M1	12	11	1	30,33 (5,68)
Gesamt	259	82	177	

Tab. 4.2.1.3b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom Metastasenstatus

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahr ÜLZ
M0	98,4	85,7	76,5	65,6
M1	75,0	25,0	8,3	8,3

Signifikanzanalyse:

M0 ⇔ M1: df: 1, log rank 61,32, **P-value 0,0000**

Trotz der nur geringen Fallzahl für die M1-Situation, wird die adjuvante von der palliativen Situation durch die enorme Diskrepanz der Prognosen, in unserem Kollektiv signifikant unterschieden.

Da in der palliativen Situation überhaupt kein kurativer Therapieansatz mehr besteht, ist der M-Status der Prognosefaktor mit der höchsten Relevanz.

4.2.1.4 Grading (G)

Der Differenzierungsgrad wurde in gut (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3) eingeteilt.

Da lediglich 10 Tumore gut differenziert waren, wurde diese Gruppe zur Signifikanztestung mit den mäßig differenzierten zusammengefasst.

Tab. 4.2.1.4a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen auf das Grading

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
G1	10	1	9	128,20 (13,09)
G2	168	51	117	136,53 (5,81)
G3	83	31	52	109,44 (8,11)
G1+2	178	52	126	138,13 (5,64)
Gesamt	261	83	178	

Tab.: 4.2.1.4b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom Grading

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahr ÜLZ
G1+2	98,9	82,9	73,5	66,5
G3	92,7	78,8	70,1	51,8

Signifikanzanalyse:

G1+2 ⇔ G3: df: 1, log rank 3,47, **P-value 0,0623**

Das Grading zeigt sich in diesem Kollektiv als minderwertiger Prognosefaktor, wenngleich bei $p=0,0623$ eine deutliche Tendenz festzustellen ist, wie auch der Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeiten in der obigen Tabelle zeigt.

4.2.1.5 Histologischer Typ

Aufgrund der geringen Fallzahlen für histologische Sonderformen wurden der histologische Typ lediglich in die 3 Subgruppen duktal, lobulär und „andere“ untergliedert.

Tab. 4.2.1.5a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen auf den histologischen Typ

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
Duktal	212	70	142	130,74 (5,42)
Lobulär	25	8	17	110,70 (12,67)
Andere	29	7	22	129,67 (12,60)
Gesamt	266	85	181	

Tab. 4.2.1.5b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom histologische Typ

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahr ÜLZ
duktal	97,2	80,4	71,1	62,7
lobulär	100,0	83,5	73,6	55,2
andere	100,0	88,9	84,4	62,7

Signifikanzanalyse:

duktal ⇔ lobulär ⇔ andere: df: 2, log rank 0,55, **P-value 0,7607**

Der histologische Typ ist in diesem Kollektiv kein Prognosefaktor. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten zeigen keine Tendenz.

In internationalen Studien sind morphologische Kriterien als für die Prognose relevant nachgewiesen. Allerdings gilt die hohe prognostische Bedeutung vor allem für definierte Sonderformen, wie z.B. tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome, die alle eine signifikant bessere Prognose als die duktales Karzinome aufzeigen. Diese Sonderformen wurden in unserem Kollektiv nicht gesondert registriert und aufgearbeitet.

4.2.1.6 Stadieneinteilung nach UICC (I-IV)

Die von der UICC festgelegte Stadieneinteilung (siehe Anhang) ermöglicht eine Aufteilung in Gruppen, die in bezug auf die Überlebensrate möglichst homogen sind und somit eine relativ sichere Abschätzung der Prognose ermöglichen sollen (Wittekind et al., 1997).

Wiederum wurden zwei Subgruppenanalysen durchgeführt:

- ① Testung der Stadien I-IV gegeneinander
- ② Testung der Stadien I+II gegen III + IV

Tab. 4.2.1.6a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen auf das UICC-Stadium

	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
I	43	5	38	161,80 (7,21)
II	143	39	104	139,55 (6,48)
III	57	24	33	106,09 (9,61)
IV	12	11	1	30,33 (5,68)
I+II	186	44	142	146,76 (5,29)
III+IV	69	35	34	93,24 (8,82)
Gesamt	255	79	176	

Tab. 4.2.1.6b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom UICC-Stadium

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahr ÜLZ
I	97,6	95,1	92,5	85,6
II	99,3	90,5	78,3	67,1
III	96,5	82,1	61,8	49,5
IV	75,0	16,7	8,3	8,3
I+II	99,5	89,3	81,6	71,5
III+IV	92,7	65,7	51,9	41,5

Signifikanzanalyse:

- ① I ⇔ II ⇔ III ⇔ IV: df: 3, log rank 77,74, **P-value 0,0000**
- ② I+II ⇔ III+IV: df: 1, log rank 25,17, **P-value 0,0000**

Die sehr gute prognostische Wertigkeit der Stadieneinteilung wird auch im vorliegenden Kollektiv bestätigt. Beide Analysen zeigen eine hohe Signifikanz ($p=0,0000$).

4.2.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Prognosefaktoren

Als molekularbiologische Prognosefaktoren wurden die Steroidrezeptoren für Östrogen und Progesteron und der membranständige c-erb-B2-Rezeptor (HER-2/neu) erfasst.

Wie in Kapitel 3.2.1 wurde zunächst die Anzahl der Todesfälle für die Subgruppen ermittelt und dann unter Einbeziehung der ausgeschiedenen („censored“) Patienten die Überlebenswahrscheinlichkeit nach Kaplan-Meier und die mittlere Überlebenszeit in Monaten berechnet.

Die Signifikanzanalyse erfolgte wiederum mit dem χ^2 -Test (log-rank Test).

4.2.2.1 Steroidrezeptoren

Die Abschätzung der Rezeptordichte für den Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor erfolgt immunhistochemisch. Aus dem Produkt der Färbeintensität und dem Anteil der positiv gefärbten Zellen wird ein Immunreaktiver Score (IRS) ermittelt. Werte von 0 – 2 werden als Rezeptor negativ (-), Werte von 3 – 12 als Rezeptor positiv bewertet (Remmele et al, 1987).

Zur Analyse wurden mehrere Subgruppen gebildet:

1. Zunächst wurden die positiven bzw. negativen Einzelwerte beurteilt.
2. Zur Beurteilung der Rezeptorkombinationen wurden weitere Subgruppen gebildet:
 - I. Beide Rezeptoren positiv (ER+/PR+)
 - II. Lediglich ein Rezeptor positiv bewertet (ER+/PR- o. ER-/PR+)
 - III. Mindestens ein Rezeptor positiv (ER+/PR+ o. ER+/PR- o. ER-/PR+)
 - IV. Beide Rezeptoren negativ (ER- /PR-)

Tab. 4.2.2.1a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen die Steroidrezeptoren

	Patientenzahl	Tod durch Mammakarzinom	Censored	Mittelwert (SD)
ER+	158	48	110	137,33 (5,94)
ER-	95	33	62	111,32 (7,32)
PR+	150	47	103	135,61 (6,14)
PR-	102	34	68	116,66 (7,09)
I	133	42	91	135,79 (6,50)
II	41	11	30	129,76 (10,18)
III	174	53	121	137,01 (5,67)
IV	78	28	50	109,43 (8,23)

Tab. 4.2.2.1b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit von der Steroidrezeptorstatus

	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
ER+	96,8	85,0	76,3	65,2
PR+	96,7	83,4	75,1	64,3
ER-	97,9	75,1	66,6	55,8
PR-	98,0	78,3	69,2	58,3
I	96,2	84,5	75,1	64,7
II	100,0	82,5	79,7	65,1
III	97,1	84,0	76,2	64,9
IV	97,4	75,3	64,6	54,8

Signifikanzanalyse:

- ① ER pos. ⇔ ER. neg.: df 1; Log rank 2,97, **P-value 0,850**
- ② PR pos. ⇔ PR neg.: df 1; Log rank 1,23, **P-value 0,2681**
- ③ I ⇔ II ⇔ IV: df 2; Log rank 3,58, **P-value 0,3107**
- ④ III ⇔ IV: df 1; Log rank 3,48, **P-value 0,623**

Keine der verschiedenen Subgruppen zeigte einen signifikanten Überlebensvorteil.

Wie erwartet zeigte sich auch hier die geringe prognostische Bedeutung der Steroidrezeptoren, die viel mehr eine Relevanz als prädiktiver Faktor für eine effektive Therapie besitzen.

4.2.2.2 c-erb-B2 Rezeptor

Auch die Rezeptordichte des membranständigen c-erb-B2 Rezeptors (Synonym: HER-2/neu) wird immunhistochemisch bestimmt. Der immunreaktive Score (IRS) wird hier wie folgt ermittelt:

- 0: Unvollständige Membranfärbung bei <10% der Tumorzellen
- 1: Schwache, unvollständige Membranfärbung bei >10% der Tumorzellen
- 2: Schwache, jedoch komplette Membranfärbung bei >10% der Tumorzellen
- 3: Starke, komplette Membranfärbung bei >10% der Tumorzellen

Eine seit neuem auch über die weitere Therapie entscheidende, sogenannte c-erb-B2 Überexpression liegt ab einem IRS von 2 vor, deshalb wurden die Werte 2 und 3 (entsprechend einer Überexpression auf Proteinebene) sowie 0 und 1 (keine Überexpression) nochmals zu Subgruppen zusammengefasst.

Tab. 4.2.2.2a: Univariate Subgruppenanalyse der follow-up Daten bezogen auf den c-erb-B2 Rezeptor

IRS	Patientenzahl	Tod durch Mammakarzinom	Censored	Mittelwert (SD)
0	76	21	55	130,22 (8,76)
1	69	23	46	126,06 (9,23)
2	23	8	15	89,33 (10,83)
3	18	11	7	92,58 (17,42)
0+1	146	44	102	130,45 (6,52)
2+3	41	19	22	106,66 (12,84)

Tab. 4.2.2.2b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom IRS des c-erb-B2 Rezeptors

IRS	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
0	98,7	79,1	72,7	70,8
1	95,6	86,8	80,0	57,1
2	95,7	77,4	54,2	54,2
3	94,4	72,2	47,4	33,9
0+1	97,3	83,0	75,8	65,1
2+3	95,1	75,1	52,3	43,1

Signifikanzanalyse:

① c-erb-B2 0 ⇔ 1 ⇔ 2 ⇔ 3: Df 3 ; Log rank 5,54 , **P-value 0,2363**

② c-erb-B2 0+1 ⇔ 2+3: Df 1; Log rank 3,96, **P-value 0,4679**

Die prognostische Wertigkeit des c-erb-B2 IRS fiel also wie erwartet gering aus. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Überlebensnachteil einer Subgruppe, wobei die Assoziation mit einer ungünstigen Prognose bei einer Überexpression des c-erb-B2 Rezeptors auch eher bei einer multivariaten Analyse bei nodal-positiven Patienten zu erwarten wäre (Slamon et al. 1989).

4.3 Protein S100A6: Auswertungsergebnisse

4.3.1 Deskriptive Ergebnisse

1. Drüsenepithel:

Das zweischichtige Epithel der ruhenden Brust ist von den Sinus lactiferi bis zu den Lobuli morphologisch gleich aufgebaut. Es besteht aus einer inneren kubischen, epithelialen Zellschicht und einer äußeren myoepithelialen Zellschicht. Eine Basalmembran trennt die Milchgänge von dem sie umgebenden Bindegewebe (Carter, 1984) (s. Abb.1, S.128).

Nach der immunhistochemischen Färbung von S100A6 sind die beiden Zellschichten klar voneinander abgrenzbar.

Die äußere myoepitheliale Zellschicht ist wesentlich kräftiger gefärbt. Deren Zellkerne sind häufig deutlich dunkler als das sie umgebende Zytoplasma. Insgesamt ist sowohl die Anfärbung des Zytoplasmas, als auch des Kerns sehr unruhig und man erkennt eine Vielzahl kleinster Vakuolen.

Im Gegensatz zur äußeren Zellschicht ist die Färbung des Zytoplasmas der inneren eher homogen und schwach. Der Zellkern ist hier durch die Hämalaun-Gegenfärbung blau.

In den großen Milchgängen ist die innere Zellschicht dominant, die Zellen sind zylinderförmig und etwa doppelt so groß wie die äußeren Zellen. Der basal liegende und über die Hälfte des Zellvolumens einnehmende Kern ist aufgelockert. Das Myoepithel ist schmal und bei den sehr großen Gängen zum Teil sogar lückenhaft.

In den terminalen Gangsegmenten sind beide Zellschichten gleich stark ausgeprägt (s. Abb.2 S.128). Die äußere Schicht nimmt eine kubischere Form an. Die Zellkerne liegen eher mittig im Gegensatz zur basalen Lage in der inneren Schicht.

In den Acini ist die Schichtung nicht mehr eindeutig erkennbar (s. Abb.3, S.129). Hier ist auch das Zytoplasma der inneren Zellschicht deutlich mit S100A6 angefärbt. Teilweise sind sogar die Kerne dieser Zellen gebräunt, allerdings liegen kontrastreich immer wieder blaue, nicht gefärbte Kerne dazwischen.

2. Stroma:

Wie von Kuznicki vorbeschrieben (s. 2.1.6) sind die Fibroblasten und Fibrozyten sowie die Endothelzellen der vereinzelt Kapillaren des Bindegewebsstromas nach Färbung gegen S100A6 sehr stark gebräunt. Der Zellkern erscheint dunkler als das Zytoplasma (s. Abb.1 u. 2, S.128).

Die Kollagenfasern der Interzellularsubstanz hingegen sind nicht gefärbt.

3. Tumorzellen:

Die Tumorzellen sind sehr inhomogen gefärbt. In den am extremsten sich unterscheidenden Färbungsmustern findet man im einen Präparat keine Färbung des Zytoplasmas und die Kerne sind durch die Hämalaun-Gegenfärbung blassblau (s. Abb.7, S.131), im anderen ist sowohl das Zytoplasma als auch der Zellkern der Tumorzellen stark gefärbt (s. Abb.4, S.129). Innerhalb dieser Gegensätze sind Zwischenformen möglich (s. Abb.5 u. 6, S.130).

Unterschiedliche Färbungen finden sich aber auch in ein und demselben Präparat. Verschiedene Zellpopulationen eines Tumors enthalten viel, andere wenig S100A6, so dass stark, mäßig und nicht gefärbte Tumorzellen nebeneinander liegend in einem Präparat vorkommen können (Abb.9, S.132).

Die Färbung der Kerne scheint in etwa mit der des Zytoplasmas zu korrelieren. In Zellen mit ungefärbtem Plasma ist auch der Kern stets ungefärbt. Mit zunehmender Stärke der Plasmafärbung nimmt auch die des Kerns zu. Bei einigen Präparaten ist jedoch trotz deutlicher Plasmafärbung der Kern nicht gefärbt (Abb.10, S.132). Eine stärkere Färbung des Kerns im Vergleich zum Plasma findet sich aber niemals.

Eine unterschiedliche Färbung der einzelnen histologischen Subtypen ist nicht erkennbar und scheint somit nicht mit dem S100A6 Gehalt der Tumoren korrelieren.

4.3.2 Nominale Ergebnisse

4.3.2.1 Zytoplasmafärbung

Nachfolgend werden die Auswertungsergebnisse, der in die Studie eingegangenen Patienten (N=266, s. Kapitel 2.1.2) dargestellt.

Sämtliche Präparate wurden durch den Doktoranden zweimal unabhängig voneinander ausgewertet. Die Auswertung der Präparate erfolgte nach Färbeintensität (SI) und Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen (PP) (s. Kapitel 2.6).

Die SI ist in vier Graden (0 = fehlend, 1 = schwache, 2 = mäßige, 3 = starke Färbung) bestimmbar. Der vorherrschende Intensitätsgrad maßgebend ist.

Der PP wird subjektiv abgeschätzt und in fünf Gruppen (0 = 0%, 1 = 1-20%, 2 = 21-50%, 3 = 51-80%, 4 = 81-100%) eingeteilt.

Durch Multiplikation der beiden Werte wird ein Immunreaktiver Score (IRS) ermittelt, der den Grad des S100A6-Gehaltes im Tumorgewebe des jeweiligen Präparates widerspiegeln soll (s. Kapitel 2.6.).

Tab. 4.3.2.1: Ergebnisse der Auswertung 1

SI (Färbeintensität)	PP (Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen)					Zeilensumme
	0 (0%)	1 (1-20%)	2 (21-50%)	3 (51-80%)	4 (81-100%)	
0 (fehlend)	63					63 (24%)
1 (schwach)		19	22	21	4	66 (25%)
2 (mäßig)		13	31	22	21	87 (33%)
3 (stark)		7	12	12	19	50 (19%)
Spaltensumme	63 (24%)	39 (15%)	65 (24%)	55 (21%)	44 (17%)	266 (100%)

Tab. 4.3.2.2: Ergebnisse der Auswertung 2

SI (Färbeintensität)	PP (Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen)					Zeilensumme
	0 (0%)	1 (1-20%)	2 (21-50%)	3 (51-80%)	4 (81-100%)	
0 (fehlend)	54					54 (20%)
1 (schwach)		24	32	17	6	79 (30%)
2 (mäßig)		12	26	31	26	95 (36%)
3 (stark)		4	11	8	15	38 (14%)
Spaltensumme	54 (20%)	40 (15%)	69 (26%)	56 (21%)	47 (18%)	266 (100%)

Aus dem gesamten Patientenkollektiv (N=343) wurden 108 Präparate zur Zweitbegutachtung durch den Experten ausgewählt. 77 dieser Präparate und die zugehörigen Patienten waren im Studienkollektiv enthalten (15 Präparate ohne Tumorzellen, 12 Präparate abgeschwommen, 2 Präparate ohne eindeutigen Nachweis von Karzinomzellen, 2 Patienten ohne Follow-up, vgl. auch Kapitel 3.1.2).

Der relativ hohe Anteil von 29 nicht auswertbaren Präparaten in dieser Gruppe erklärt sich dadurch, dass nahezu alle unklaren Präparate vor Ausschluß aus der Studie zur Begutachtung dem Experten vorgelegt wurden.

Insgesamt wurden also 28,9% der Präparate aus dem Studienkollektiv (N=266) in einer dritten Auswertungsreihe zur Bestimmung der Interobservervariabilität beurteilt.

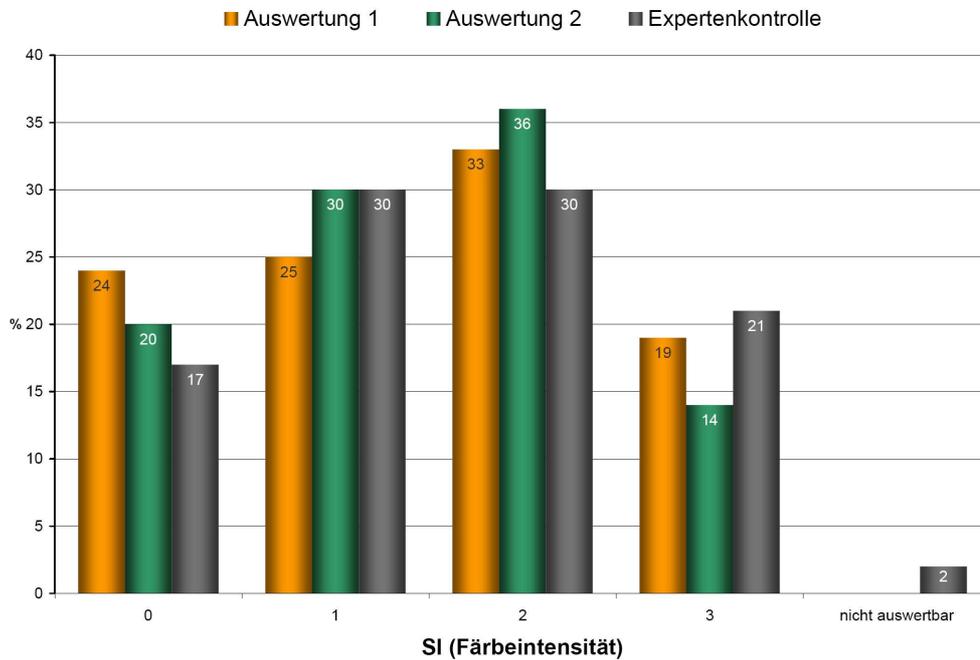
Zwei Präparate, die durch den Doktoranden ausgewertet worden waren, wurden durch den Experten wegen zu weniger Karzinomzellen für nicht auswertbar erachtet (s.u.).

Tab. 4.3.2.3: Ergebnisse der Expertenauswertung

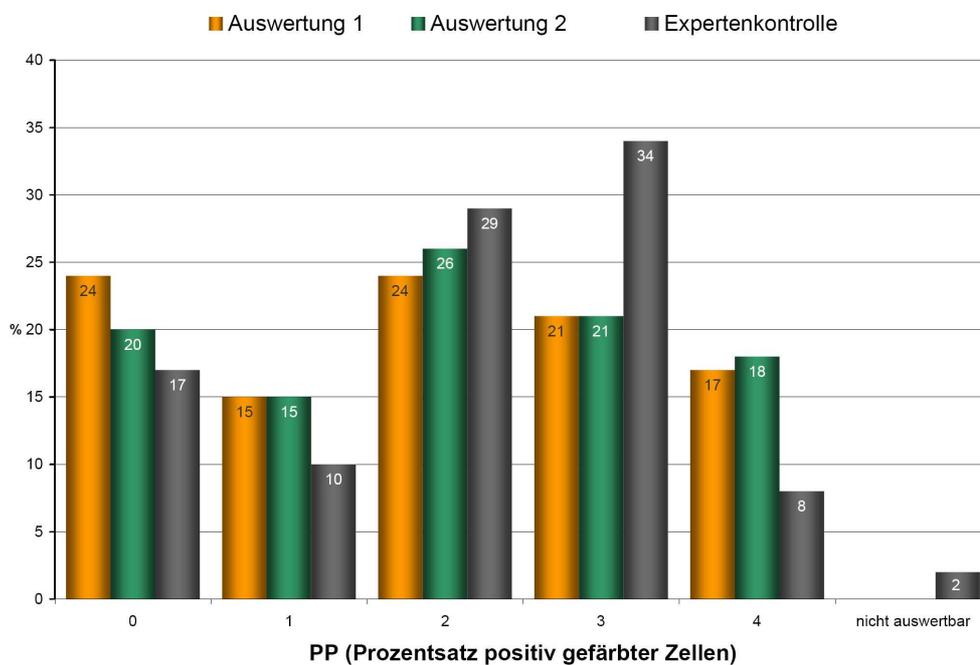
SI (Färbeintensität)	PP (Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen)					Nicht aus- wertbar	Zeilensumme
	0 (0%)	1 (1-20%)	2 (21-50%)	3 (51-80%)	4 (81-100%)		
0 (fehlend)	13						13 (17%)
1 (schwach)		3	9	10	1		23 (30%)
2 (mäßig)		4	9	9	1		23 (30%)
3 (stark)		1	4	7	4		16 (21%)
Nicht auswertbar						2	2 (3%)
Spaltensumme	13 (17%)	8 (10%)	22 (29%)	26 (34%)	6 (8%)	2 (3%)	77 (100%) (100%)

In den folgenden Diagrammen werden die prozentualen Anteile der Auswertungsergebnisse gegenübergestellt.

Diagr. 4.3.2.1: Vergleich der prozentualen Auswertungsergebnisse für SI



Diagr. 4.3.2.2: Vergleich der prozentualen Auswertungsergebnisse für PP



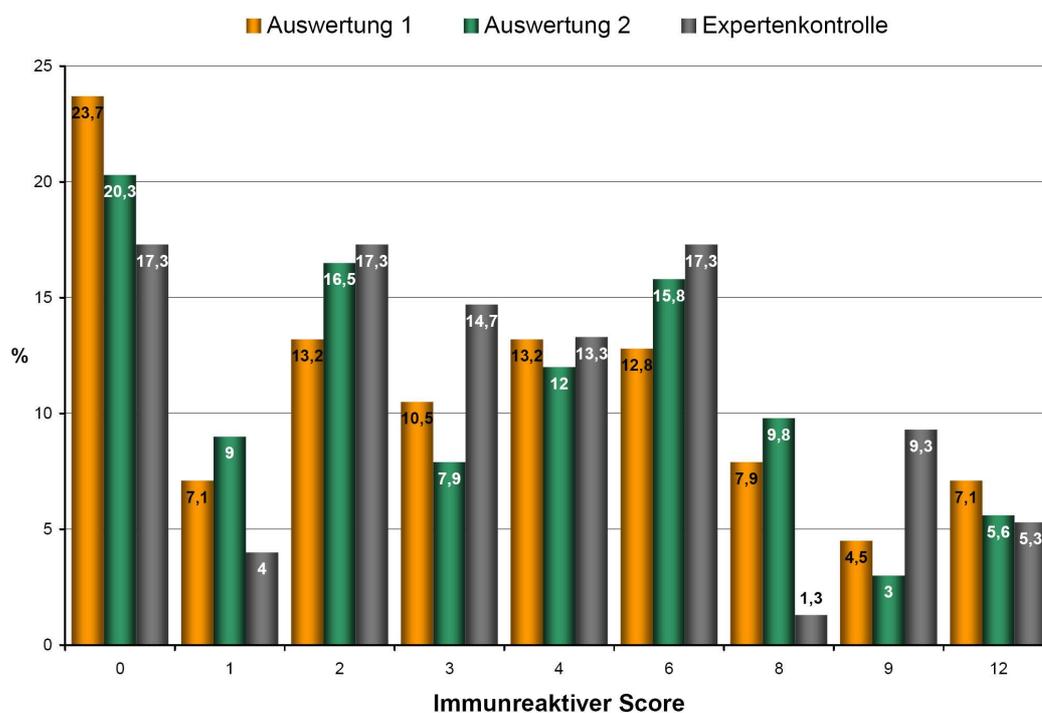
Aus den oben dargestellten Ergebnissen wurde durch Multiplikation von SI und PP der Immunreaktive Score (IRS) ermittelt.

Tab.4.3.2.4: Ergebnisse der IRS-Ermittlung für S100A6

IRS	Auswertung 1		Auswertung 2		Expertenkontrolle	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
0	63	23,7	54	20,3	13	17,3
1	19	7,1	24	9,0	3	4,0
2	35	13,2	44	16,5	13	17,3
3	28	10,5	21	7,9	11	14,7
4	35	13,2	32	12,0	10	13,3
6	34	12,8	42	15,8	13	17,3
8	21	7,9	26	9,8	1	1,3
9	12	4,5	8	3,0	7	9,3
12	19	7,1	15	5,6	4	5,3
Summe	266	100,0	266	99,9	75	100,0

Um die Ergebnisse der verschiedenen Auswertungsreihen besser miteinander vergleichen zu können, werden in der folgenden Grafik die Prozentsätze für die einzelnen IRS-Scores nebeneinander abgebildet.

Diagr. 4.3.2.3: Prozentuale IRS-Verteilung



4.3.2.2 Kernfärbung

Im Rahmen der zweiten Auswertung durch den Doktoranden wurden weitere Parameter beurteilt, von denen jedoch lediglich die Färbeintensität des Zellkerns in die Studie weiter einging.

Die Auswertungsergebnisse sind unten aufgeführt. SI-Zellkern und SI-Zytoplasma werden gegenübergestellt.

Tab. 4.3.2.5: SI der S100A6-Zellkernanfärbung im Verhältnis zum SI Zytoplasma

SI Zellkern	SI Zytoplasma				Zeilensumme
	0	1	2	3	
0 (fehlend)	54	71	40	9	174 (65%)
1 (schwach)	0	8	51	21	80 (30%)
2 (stark)	0	0	4	8	12 (5%)
Spaltensumme	54 (20%)	79 (30%)	95 (36%)	38 (14%)	266 (100%)

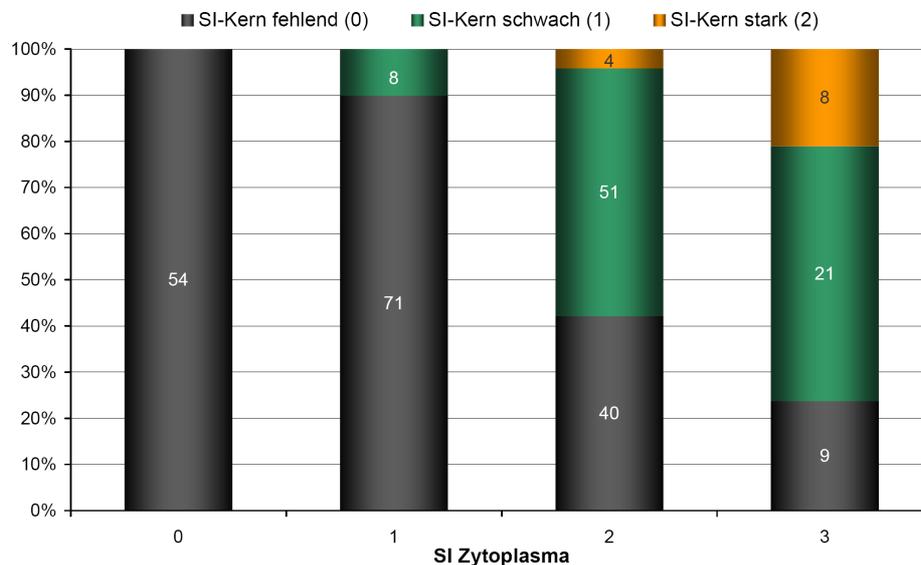
Die Auswertung erfolgte nur einmalig durch den Doktoranden

Es zeigt sich deutlich, dass im allgemeinen mit zunehmender Zytoplasmafärbung auch die SI der Zellkerne zunimmt. Gleichwohl gab es 9 Präparate bei denen trotz starker Zytoplasmafärbung die Zellkerne nicht angefärbt waren, umgekehrt war die Kernfärbung aber nie deutlich stärker als die Plasmafärbung.

Im folgenden Diagramm werden die SI-Verhältnisse nochmals dargestellt.

Zur Verdeutlichung der Tendenz, dass eine starke Färbung des Kerns hauptsächlich in Verbindung mit einer starken Färbung des Plasmas auftritt, werden die Prozentwerte verglichen.

Diagr. 4.3.2.4: Verhältnis SI-Zellkern zu SI-Zytoplasma



Da, wie unter 2.1.5 beschrieben, S100A6 nur im Zytoplasma vorkommen soll, verwundert zunächst die teilweise deutliche Anfärbung der Zellkerne. Wie oben bereits beschrieben ist jedoch auffallend, dass erstens der Kern niemals stärker gefärbt ist, als das Zytoplasma und zweitens mit zunehmender Stärke der Zytoplasmafärbung oft auch die Kernfärbung zunimmt.

Zwei sich überlagernde Gründe könnten hierfür verantwortlich sein:

1. Da es sich bei einer Zelle um ein dreidimensionales Gebilde handelt, nimmt natürlich auch die Färbung des vom Betrachter aus gesehen über und unter dem Kern liegenden Zytoplasmas zu, so dass mit zunehmender Stärke der Plasmafärbung auch der Kern stärker gefärbt erscheint. Dies erklärt jedoch nicht, warum bei 9 Präparaten das Plasma sehr stark und der Kern nahezu gar nicht gefärbt erscheint.

2. Bei Tumorzellen kommt es mit zunehmender S100A6 Konzentration zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Interaktion mit Strukturen der Kernmembran. Es ist deshalb anzunehmen, daß es nicht zu einer Färbung des Nukleoplasmas sondern vielmehr zu einer Färbung der Kernhülle (siehe auch 1.1.5: Stradal et al., 1999) kommt.

Da im Regelfall die Färbung von Plasma und Kern korreliert, erscheint eine isolierte Auswertung der Kernfärbung nicht sinnvoll.

4.3.3 Ermittlung des Schwellenwertes für den S100A6-Status

Das Patientenkollektiv wurde durch die verschiedenen IRS-Scores in 8 Gruppen unterteilt. Um nun eine möglichst präzise Unterschiedshypothese formulieren zu können, ob ein niedriger oder ein hoher S100A6-Gehalt im Tumor eine Bedeutung für den Krankheitsverlauf oder die Überlebensdauer hat, wurden diese 8 Gruppen in folgende zwei Kategorien zusammengefasst:

- ❶ S100A6 im Tumor enthalten, das heisst „Status“ positiv oder
- ❷ S100A6 nicht im Tumor enthalten, dem entsprechend „Status“ negativ.

In Analogie zum ebenfalls immunhistochemisch ermittelten Hormonrezeptorstatus bei Mammakarzinomen wurde für die vorliegende Studie ein Schwellenwert (Cut-off) ermittelt, der die Aussage über einen positiven oder negativen „S100A6-Status“ festlegt.

Hierzu wurden für beide Auswertungsreihen und für alle möglichen Schwellenwerte Überlebenskurven nach Kaplan-Meier errechnet. Die ermittelten Signifikanz- und Log-rank Werte wurden verglichen und der allgemeingültige Schwellenwert für den Cut-off für den höchsten Log-rank definiert.

Tab. 4.3.3.1: Cut-off Ermittlung zur Festlegung des Schwellenwertes für den S100A6-Status

Cut off	Auswertung 1		Auswertung 2	
	Log Rank	Signifikanz	Log Rank	Signifikanz
1 (0 / 1-12)	2,64	0,104	1,29	0,257
2 (0-1 / 2-12)	2,55	0,110	3,26	0,071
3 (0-2 / 3-12)	2,57	0,109	3,12	0,078
4 (0-3 / 4-12)	1,67	0,196	2,95	0,086
6 (0-4 / 6-12)	0,53	0,468	0,36	0,548
8 (0-6 / 8-12)	0,41	0,524	0,01	0,908
9 (0-8/ 9-12)	0,23	0,628	0,27	0,605

Werden die ermittelten Werte für den S100A6-IRS in die zwei Kategorien negativ und positiv eingeteilt, ergibt sich für den Cut-off 2 in Auswertung 2 der deutlichste Unterschied in den Verläufen der beiden Überlebenskurven.

Für die weiteren Betrachtungen wurde also festgelegt, einen IRS von 0 oder 1 als S100A6 „negativ“, einen IRS von 2 bis 12 als „positiv“ zu bewerten.

In der für die weiteren Berechnungen herangezogenen Auswertungsreihe 2 wurden also insgesamt 78 Patientinnen (29,3 %) als "S100A6 negativ", 188 Patientinnen (70,7 %) als "S100A6 positiv" eingestuft.

4.3.4 Intra- und Interobservervariabilität

4.3.4.1 Intraobservervariabilität

Um die Reproduzierbarkeit der Auswertungsergebnisse des Doktoranden zu überprüfen, wurden die Ergebnisse der beiden Auswertungsreihen einander gegenübergestellt.

Da es sich bei der Ermittlung des S100A6-IRS um eine subjektive Einschätzung des jeweiligen Auswerters handelt, wurde die Kappa-Statistik (K) verwendet. Der Kappa-Koeffizient ist hierbei das Verhältnis vom Grad der Übereinstimmung zur maximalen Übereinstimmung, jeweils korrigiert um den Grad der zufälligen Übereinstimmung (s. Kap. 3.9).

Werden die 9 unterschiedlichen IRS verglichen, ist der Grad der Übereinstimmung mäßig: $K = 0,552$ (SD 0,034, $p < 0,001$).

Nach Ermittlung des Schwellenwertes und Einteilung der Auswertungsergebnisse in die Kategorien „S100A6 positiv“ (IRS 0 - 1) und „S100A6 negativ“ (IRS 2 – 12) ist der Grad der Übereinstimmung natürlich wesentlich höher und mit $K = 0,873$ (SD 0,033, $p < 0,001$) sehr gut.

Von den ausgewerteten und in die Studie eingegangenen 266 Präparaten wurden nur 14 Präparate in unterschiedliche Kategorien eingeteilt, das entspricht einer Übereinstimmung in 94,74% der Fälle.

4.3.4.2 Interobservervariabilität

Um die Reproduzierbarkeit verschiedener Auswerter zu überprüfen, wurden die in der dritten Auswertungsreihe vom Experten (Facharzt für Pathologie) erhobenen Ergebnisse mit den entsprechenden, durch den Doktoranden ermittelten Ergebnissen verglichen.

In die statistische Berechnung gingen alle 108 durch den Experten ausgewerteten Präparate aus dem Gesamtkollektiv (N=344) ein, da sich die Anzahl der „nicht auswertbaren“ Präparate unterschied (s. Kap. 4.3.1).

Der Vergleich der unterschiedlichen IRS (9 unterschiedliche Scores + 1 Score für die Gruppe „nicht auswertbar“) der Expertenreihe mit Auswertung 1 ergibt mit einem Kappa-Wert von $K = 0,631$ (SD 0,050, $p < 0,001$) eine gute Übereinstimmung. Der Vergleich Expertenreihe mit Auswertung 2 ergibt mit $K = 0,600$ (SD 0,050, $p < 0,001$) ebenfalls eine gute Übereinstimmung.

Wird wiederum in die zwei Kategorien „S100A6 positiv“ und „S100A6 negativ“ eingeteilt, so ergeben sich auch hier mit $K = 0,862$ (SD 0,067, $p < 0,001$) für Auswertung 1 und $K = 0,856$ (SD 0,070, $p < 0,001$) für Auswertung 2 sehr gute Übereinstimmungen zwischen den Auswertungsreihen des Doktoranden und des Experten. Von 75 ausgewerteten Präparaten wurden lediglich 4 unterschiedlich bewertet und in die andere Kategorie eingestuft (zwei Präparate wurden zusätzlich vom Experten für nicht auswertbar erachtet und gingen nicht in die Berechnung mit ein).

Intra- und Interobservervariabilität sind also bei dem in der Dissertation verwendeten Verfahren der immunhistochemischen Bestimmung des S100A6-Status sehr gering. Die Ergebnisse sind somit sehr gut reproduzierbar und das Verfahren ohne Probleme auf andere Patientenkollektive und Auswerter übertragbar.

4.4 Korrelation des S100A6-Status mit Tumormerkmalen

In diesem Kapitel wurde untersucht, ob das Vorkommen von S100A6 mit speziellen Merkmalen des Tumors, wie z.B. dessen Größe oder Hormonrezeptorstatus in Zusammenhang steht.

Hierzu wurde der $k \times l$ - χ^2 -Test verwendet.

1. Tumorgröße

Tab. 4.4.1: $k \times l$ - χ^2 -Test z. Vergleich der Tumorgröße (T) bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
pT1	ist	17	52	69
	soll	20,5	48,5	69,0
pT2	ist	36	96	132
	soll	39,2	92,8	132,0
pT3	ist	10	15	25
	soll	7,4	17,6	25,0
pT4	ist	14	19	33
	soll	9,8	23,2	33,0
Spaltensumme	ist	77	182	259
	soll	77,0	182,0	259,0

$$\chi^2 = 5,0463, \mathbf{p \text{ (zweiseitig) = 0,168}}$$

2. Nodalstatus

Tab. 4.4.2: $k \times l$ - χ^2 -Test z. Vergleich des Nodalstatus (N) bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
N0	ist	28	82	110
	soll	32,3	77,7	110,0
N1	ist	43	88	131
	soll	38,4	92,6	131,0
N2	ist	5	8	13
	soll	3,8	9,2	13,0
N3	ist	0	5	5
	soll	1,5	3,5	5,0
Spaltensumme	ist	75	183	259
	soll	75,0	183,0	259,0

$$\chi^2 = 4,166, \text{ df } 3, \mathbf{p \text{ (zweiseitig) = 0,244}}$$

3. Metastasenstatus

Tab. 4.4.3: 4-Felder- χ^2 -Test zum Vergleich des Metastasenstatus (M) bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
M0	ist	72	173	245
	soll	71,8	173,2	245,0
M1	ist	3	8	11
	soll	3,2	7,8	11,0
Spaltensumme	ist	75	181	256
	soll	75,0	181,0	256,0

$\chi^2 = 0,023$, df 1, **p (zweiseitig) = 0,880**, exakte Signifikanz n. Fisher 1,000.

4. UICC-Stadium

Tab. 4.4.4: 4-Felder- χ^2 -Test zum Vergleich der UICC-Stadien bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
1+2	ist	49	136	185
	soll	54,3	130,7	185,0
3+4	ist	25	42	67
	soll	19,7	47,3	67,0
Spaltensumme	ist	74	178	252
	soll	74,0	178,0	252,0

$\chi^2 = 2,780$, df 1, **p (zweiseitig) = 0,095**

5. Östrogenrezeptorstatus

Tab. 4.4.5: 4-Felder- χ^2 -Test z. Vergleich des E2-Rezeptorstatus bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
ER+	ist	52	106	158
	soll	43,6	114,4	158,0
ER-	ist	17	75	92
	soll	25,4	66,6	92,0
Spaltensumme	ist	69	181	250
	soll	69,0	181,0	250,0

$\chi^2 = 6,061$, df 1, **p (zweiseitig) = 0,014**

6. Progesteronrezeptorstatus

Tab. 4.4.6: 4-Felder- χ^2 -Test z. Vergleich des Progesteronrezeptorstatus bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
PR+	ist	49	100	149
	soll	41,3	107,7	149,0
PR-	ist	20	80	100
	soll	27,7	72,3	100,0
Spaltensumme	ist	69	180	249
	soll	69,0	180,0	249,0

$$\chi^2 = 4,960, \text{ df } 1, \text{ p (zweiseitig) } = \mathbf{0,026}$$

7. Histologischer Typ

Tab. 4.4.7: k x l - χ^2 -Test z. Vergleich des histologischen Typs bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
Duktal	Ist	60	152	212
	Soll	62,1	149,9	212,0
Lobulär	Ist	12	11	23
	Soll	6,7	16,3	23,0
Andere	Ist	5	23	28
	Soll	8,2	19,8	28,0
Spaltensumme	Ist	76	186	263
	Soll	76,0	186,0	263,0

$$\chi^2 = 7,684, \text{ df } 2, \text{ p (zweiseitig) } = \mathbf{0,021}$$

8. Menopausenstatus

Tab. 4.4.8: 4-Felder- χ^2 -Test z. Vergleich des Menopausenstatus bezüglich des S100A6-Status

S100A6 Status		negativ (IRS 0-1)	positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
Praemenopausal	Ist	13	39	52
	Soll	17,1	34,9	52,0
Postmenopausal	ist	49	88	137
	Soll	44,9	92,1	137,0
Spaltensumme	ist	62	127	189
	Soll	62,0	127,0	189,0

$$\chi^2 = 1,982, \text{ df } 1, \text{ p (zweiseitig) } = \mathbf{0,159}$$

Zusammenfassende Bewertung:

Der S100A6-Status steht nicht in Zusammenhang mit UICC-Stadium, Tumorgröße, Nodal- oder Metastasenstatus.

Der S100A6-Status ist also auch umgekehrt unabhängig vom jeweiligen Stadium der Tumorerkrankung.

S100A6 steht ebenso nicht in Zusammenhang mit dem Menopausenstatus.

Eine signifikante Korrelation besteht jedoch zur Ausprägung des Östrogen- und des Progesteron- Rezeptorstatus sowie zur Histopathologie.

Östrogenrezeptor positive Patienten sind überzufällig häufig S100A6 negativ, Östrogenrezeptor negative Patienten häufig S100A6 positiv.

Für den Progesteronrezeptor ist diese Verteilung gleich: Wiederum ist der hohe Hormonrezeptorgehalt mit einem negativen S100A6-Status verbunden und umgekehrt.

Ebenso sind, entgegen dem subjektiven Eindruck (s. 4.3.1), vermehrt lobuläre Karzinome S100A6 negativ, wobei jedoch die Gesamtzahl der lobulären Karzinome im Studienkollektiv mit 23 relativ klein ist. Die duktaalen Karzinome zeigen dagegen kein auffälliges Verteilungsmuster.

4.5 S100A6 als Prognosefaktor

Die Bestimmung von Prognosefaktoren hat das Ziel, den Krankheitsverlauf für den individuellen Patienten prospektiv möglichst zuverlässig abschätzen zu können. Sie sind entscheidend für die Festlegung des weiteren therapeutischen Vorgehens. Ein Prognosefaktor erlaubt eine Vorhersage über das rezidivfreie und das Gesamtüberleben, ohne weitere Merkmale des Krankheitsbildes in die Betrachtung mit einzubeziehen.

4.5.1 Gesamtüberleben (Overall survival)

Um festzustellen, ob der S100A6-Gehalt im Tumor eine Auswirkung auf das Überleben eines Patienten hat, wurden die Überlebensdaten der S100A6-negativen (IRS 0–1) und S100A6-positiven Patienten (IRS 2-12) nach Kaplan-Meier analysiert.

Nach Ermittlung der Anzahl der Todesfälle für den jeweiligen S100A6-Status wurde unter Einbeziehung der ausgeschiedenen („censored“) Patienten eine Überlebenskurve erstellt und die mittlere Überlebenszeit in Monaten berechnet. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem log-rank Test.

Tab. 4.5.1a: Univariate Analyse der follow-up Daten bezogen auf den S100A6-Status

S100A6 Status	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
negativ (IRS 0-1)	78	32	46	121,90 (8,89)
positiv (IRS 2-12)	188	53	135	135,49 (5,62)
Gesamt	266	85	181	

Signifikanzanalyse:

S100A6: negativ ⇔ positiv: df: 1, **log rank 3,26, p = 0,0709**

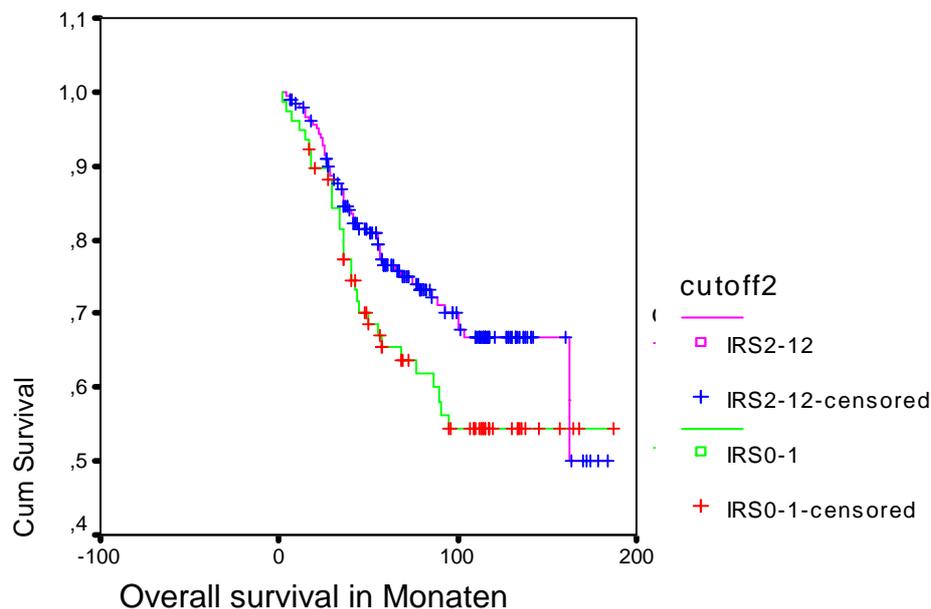
Tab. 4.5.1b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6-Status

S100A6-Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
negativ	94,8	81,5	65,5	54,4
positiv	97,8	87,0	76,6	66,7

Das overall survival der S100A6 negativen Patienten unterschied sich nicht signifikant von dem der S100A6 positiven. S100A6 ist hier somit kein Prognosefaktor.

Bei den S100A6 positiven Patienten zeigt sich bei den 5- und 10-Jahres Überlebensraten lediglich eine Tendenz zum besseren Überleben. Diesen Eindruck widerlegen die Kaplan-Meier Kurven: Nach etwa 160 Monaten treffen sich die beiden Kurven wieder, danach erscheint die Prognose für die „positiven“ Patienten sogar schlechter. Dieser Schnittpunkt könnte bedeuten, dass zeitabhängige Faktoren, wie z.B. Therapiemodalitäten, das Überleben beeinflussen.

Abb. 4.5.1: KM-Kurve für das OS in Abhängigkeit vom S100A6-Status



Die Berechnungen wurden analog nach Ausschluß der 12 primär metastasierenden Patienten (N=254) durchgeführt. Es ergab sich kein Unterschied zum oben dargestellten Studienkollektiv: Log rank 3,23, $p = 0,0724$.

4.5.2 Rezidivfreies Überleben (Disease free survival)

Nachfolgend wurde untersucht, ob der S100A6-Status einen prognostischen Wert für das krankheitsfreie Überleben hat.

In die Auswertung gingen 247 Patienten aus dem Studienkollektiv ein, da bei 12 Patienten primär ein metastasierter Zustand vorlag und bei 7 Patienten der M-Status unklar war.

Die statistische Auswertung wurde analog zum overall survival durchgeführt.

Tab. 4.5.2a: Univariate Analyse der follow-up Daten bezogen auf den S100A6-Status

S100A6 Status	Patientenzahl	Rezidiv	Censored	Mittelwert (SD) des DFS in Monaten
negativ (IRS 0-1)	71	32	39	100,20 (8,85)
positiv (IRS 2-12)	176	71	105	112,01 (5,98)
Gesamt	247	103	144	

Signifikanzanalyse:

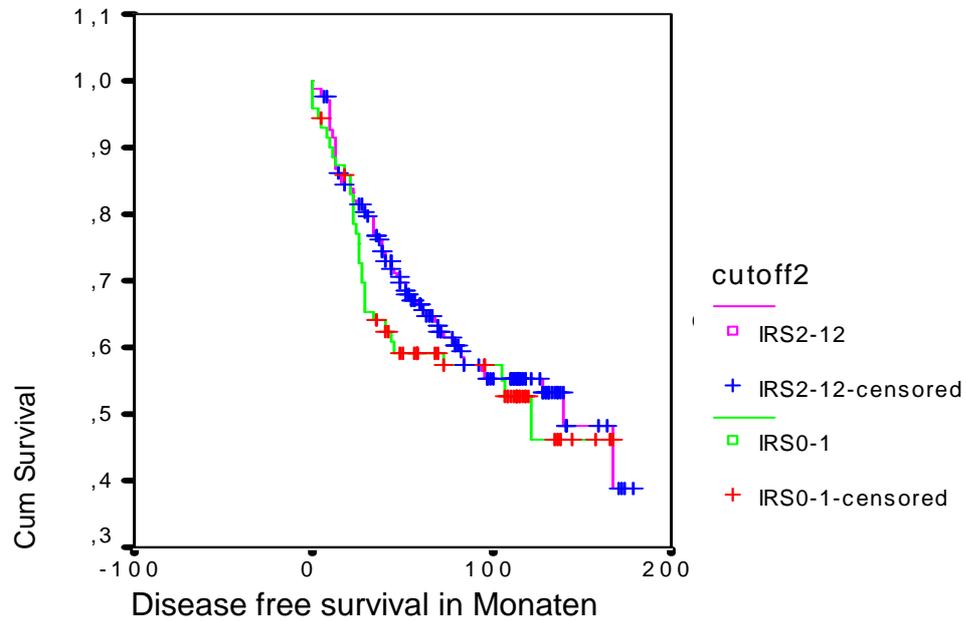
S100A6: negativ ⇔ positiv: df: 1, **log rank 0,71, p = 0,3993**

Tab. 4.5.2b: Wahrscheinlichkeit für das DFS in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6-Status

	1 Jahr DFS	3 Jahre DFS	5 Jahre DFS	10 Jahre DFS
negativ	88,7	64,0	59,3	52,6
positiv	91,4	76,8	66,4	55,4

S100A6 hat also auch keine prognostische Bedeutung für das krankheitsfreie Überleben. Sowohl die Mittelwerte als auch die 5 – und 10-Jahres Überlebensraten zeigen keine großen Unterschiede. Verdeutlicht wird das durch die Kaplan-Meier Überlebenskurven, die kaum differieren.

Abb. 4.5.2: KM-Kurven für das DFS in Abhängigkeit vom S100A6-Status



Zusammenfassend gilt festzuhalten, dass für S100A6 positive und S100A6 negative Patienten sowohl für das overall survival als auch für das disease free survival in den Kaplan-Meier Kurven keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden können.

Der S100A6-Status alleine lässt demnach keine Vorhersage über den weiteren Krankheitsverlauf zu und ist somit kein allgemeiner Prognosefaktor.

4.6. S100A6 als Prognosefaktor für Subgruppen

Nachdem im vorangehenden Kapitel gezeigt wurde, dass S100A6 keinen allgemeinen Prognosefaktor darstellt, wurde nun untersucht, ob bestimmte „vorselektionierte“ Subgruppen einen vom S100A6-Status abhängigen unterschiedlichen Krankheitsverlauf haben. Als Vorlage dienten hierbei die Untersuchungen zu den neuen tumorbiologisch begründeten Prognosefaktoren uPA und PAI 1, die in der Subgruppe der nodal negativen Patienten eine signifikante Unterscheidung zwischen "low risk" und "high risk" erlauben.

Zur Bildung der Subgruppen wurden die „klassischen“ Prognosefaktoren UICC-Stadium, Tumorgröße, Nodalstatus und Grading verwendet.

Der Steroidhormonrezeptor-Status, der ebenfalls zu den sogenannten „klassischen“ Prognosefaktoren zählt, ging nicht in diese Analyse mit ein, da er selbst nur ein Prognosefaktor für Subgruppen ist (Östrogenrezeptorstatus bei nodal-negativen Patientinnen, Progesteronrezeptorstatus bei nodal-positiven Patientinnen) und eher einen wichtigen prädiktiven Faktor darstellt.

Auch die Tumormorphologie wurde nicht zur Einteilung von Subgruppen verwendet, da nur duktales und lobuläres Karzinom genau spezifiziert worden waren, welche sich in ihrer Prognose nicht signifikant unterscheiden.

Die Analysen erfolgten auch hier univariat.

4.6.1 UICC-Stadium

Tab. 4.6.1a: Analyse der follow-up Daten bezogen auf das UICC-Stadium für den S100A6-Status

UICC-Stadium	S100A6 Status	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
I + II	negativ (IRS 0-1)	49	15	34	139,67 (10,13)
	positiv (IRS 2-12)	136	27	109	149,67 (5,85)
III + IV	negativ (IRS 0-1)	25	14	11	84,95 (13,77)
	positiv (IRS 2-12)	42	20	22	99,27 (11,52)
	Gesamt	249	76	173	

Signifikanzanalyse:

UICC I+II:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 1,73, p = 0,1885
UICC III+IV:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 0,32, p = 0,5729
UICC I:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 2,36, p = 0,1245
UICC II:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 0,50, p = 0,4807
UICC III:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 0,47, p = 0,4920
UICC IV:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 2,63, p = 0,1050

Da die Einteilung der UICC in die verschiedenen Stadien bereits auf der Überlebensprognose basiert (siehe auch Kapitel 4.2.1.6), konnte, wie zu erwarten, in Abhängigkeit vom S100A6-Status keine weitere Differenzierung der Überlebenswahrscheinlichkeit aufgezeigt werden.

Tab. 4.6.1b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6-Status

UICC-Stadium	S100A6 Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
I + II	negativ	98,0	89,8	77,0	65,8
	positiv	100	93,7	84,6	74,8
III + IV	negativ	92,0	70,1	45,3	34,0
	positiv	92,9	71,4	56,0	48,0

4.6.2 Tumorgroße

Tab. 4.6.2a: Analyse der follow-up Daten bezogen auf die Tumorgroße für den S100A6-Status

Tumor-Stadium	S100A6 Status	Patienten-zahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
1	negativ (IRS 0-1)	17	4	13	113,09 (11,35)
	positiv (IRS 2-12)	52	6	46	165,66 (7,03)
2 – 4	negativ (IRS 0-1)	60	27	33	113,41 (10,21)
	positiv (IRS 2-12)	130	42	88	119,48 (6,08)
	Gesamt	259	79	180	

Signifikanzanalyse:

T 1:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 1,35, p = 0,2452
T 2-4:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 1,69, p = 0,1935
T 2:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 0,11, p = 0,7366
T 3:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 1,55, p = 0,2129
T 4:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 0,75, p = 0,3871

Auch bezüglich der Tumorgroße kann durch den S100A6-Status keine weitere signifikante Differenzierung der Überlebenswahrscheinlichkeit aufgezeigt werden. Es zeigt sich lediglich erneut die Tendenz einer schlechteren Prognose für S100A6 negativen Patienten im allgemeinen.

Tab. 4.6.2b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6-Status

Tumor-Stadium	S100A6 Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
1	negativ	94,1	88,2	81,5	74,0
	positiv	100	93,8	89,2	86,4
2 – 4	negativ	95,0	79,4	60,7	48,3
	positiv	96,9	85,5	72,5	59,9

4.6.3 Nodalstatus

Tab. 4.6.3a: Analyse der follow-up Daten bezogen auf die Nodalstatus für den S100A6-Status

Nodal Status	S100A6 Status	Patienten-zahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
0	negativ (IRS 0-1)	28	8	20	130,31 (10,38)
	positiv (IRS 2-12)	82	9	73	160,19 (5,77)
1 – 3	negativ (IRS 0-1)	48	22	26	110,26 (11,71)
	positiv (IRS 2-12)	101	40	61	116,04 (8,02)
	Gesamt	259	79	180	

Signifikanzanalyse:

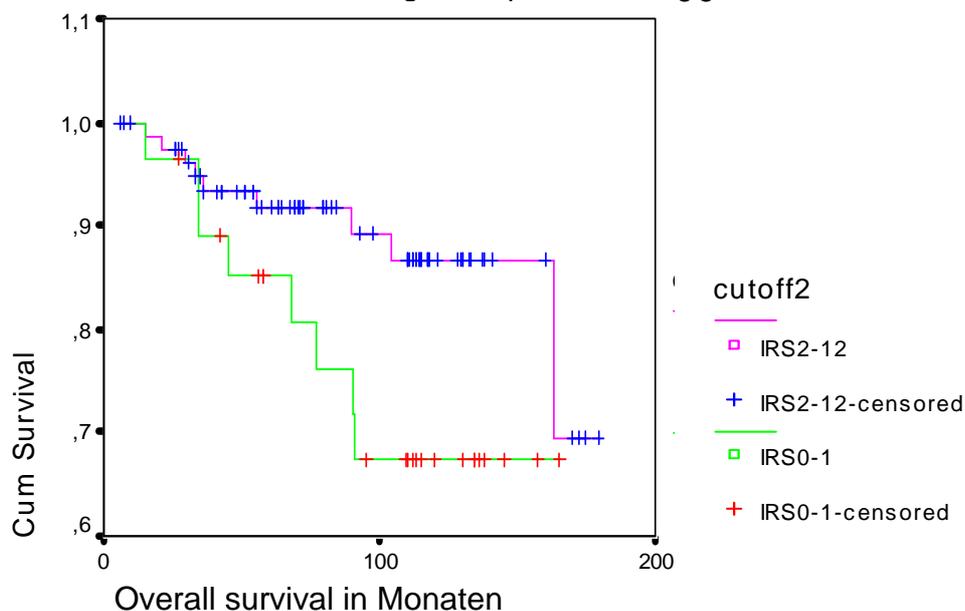
N 0:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 3,51, p = 0,0609
N 1-3:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 0,68, p = 0,4094
N 1:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 1,68, p = 0,1945
N 2:	S100A6 negativ ⇔ positiv:	df: 1, log rank 0,92, p = 0,3381

Für die Gruppe der nodal negativen Patienten stellt der S100A6-Status zwar keine signifikante Differenzierung dar, es lässt sich jedoch eine deutlich schlechtere Tendenz für die S100A6-„negativen“ Patienten erkennen. Auffallend ist zudem, dass in der Gruppe der nodal positiven Patienten diese Tendenz weitaus geringer ausgeprägt ist.

Tab. 4.6.3b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6-Status

Nodal Status	S100A6 Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
0	negativ	100	89,0	85,1	67,2
	positiv	100	94,7	91,7	86,7
1 – 3	negativ	93,8	78,7	54,6	47,8
	positiv	95,7	82,6	66,5	52,7

Abb. 4.6.3: KM-Kurven für das OS bei negativem pN0 in Abhängigkeit vom S100A6-Status



4.6.4 Grading

Das histologische Grading ist ein besserer Prognosefaktor für das rezidivfreie Überleben als für das Gesamtüberleben. Die Subgruppenanalyse erfolgte deshalb hier bezogen auf das krankheitsfreie Überleben (DFS).

Da lediglich 10 Patientinnen im Studienkollektiv mit G1 eingestuft worden waren, wurden die Gruppen G1 und G2 zusammengefasst.

Tab. 4.6.4a: Analyse der follow-up Daten bezogen auf das Grading für den S100A6-Status

Grading	S100A6 Status	Patienten- zahl	Rezidiv	Censored	Mittelwert (SD) des DFS in Monaten
1 – 2	negativ (IRS 0-1)	52	22	30	105,76 (10,10)
	positiv (IRS 2-12)	110	43	67	117,38 (7,15)
3	negativ (IRS 0-1)	17	9	8	80,06 (17,44)
	positiv (IRS 2-12)	63	27	36	92,42 (10,18)
	Gesamt	242	101	141	

Signifikanzanalyse:

G 1-2: S100A6 negativ ⇔ positiv: df: 1, **log rank 0,33, p = 0,5636**

G3: S100A6 negativ ⇔ positiv: df: 1, **log rank 0,71, p = 0,3989**

Eine Differenzierung der Prognose der durch das Grading eingeteilten Subgruppen ist damit durch die Bestimmung des S100A6-Status wie zu erwarten nicht möglich.

Tab. 4.6.4b: Wahrscheinlichkeit für das rezidivfreie Überleben in Prozent abhängig vom S100A6-Status

Grading	S100A6 Status	1 Jahr DFS	3 Jahre DFS	5 Jahre DFS	10 Jahre DFS
1 – 2	negativ	94,2	68,7	64,4	56,1
	positiv	94,5	80,5	68,2	58,1
3	negativ	70,6	51,3	44,9	44,9
	positiv	87,1	70,7	63,2	47,3

4.7 S100A6 als prädiktiver Faktor

In diesem Kapitel sollte untersucht werden, ob S100A6 einen prädiktiven Faktor darstellt, das heißt, die Wahrscheinlichkeit für das Ansprechen einer adjuvanten oder palliativen Therapie voraussagen kann.

Stehen mehrere Therapieoptionen zur Verfügung, sind vor allem in der adjuvanten Therapie prädiktive Faktoren, wie zum Beispiel der Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom, wichtig, da im Einzelfall das Ansprechen der Therapie nicht objektiv überprüft werden kann.

Um signifikante Unterschiede in der Prognose aufzeigen zu können, wurden jene Patienten, die eine Radiotherapie, Hormontherapie (Tamoxifen) oder Chemotherapie (CMF, Anthrazyklinschemata) erhalten hatten, in Subgruppen zusammengefasst und die Überlebenskurven in Abhängigkeit vom S100A6-Status berechnet. Eine hohe Überlebenswahrscheinlichkeit wurde als Hinweis auf ein besseres Therapieansprechen gewertet.

Die Gruppeneinteilung für eine bestimmte Therapieform war jeweils binär (ja oder nein) und es wurde zwischen adjuvanter und palliativer Therapie nicht unterschieden.

Ebenso wurden die verschiedenen Therapieregime bei anthrazyklinhaltigen Therapien (AC, NC, FAC) sowie CMF-haltigen Therapien (4xCMF, 6xCMF) zusammengefasst. Eine Sonderstellung nimmt die adjuvante Chemotherapie nach dem Bonadonna-Schema ein (Bonadonna bedeutet hier 4xA gefolgt von 6xCMF), nach welchem insgesamt 15 Patienten behandelt wurden. Da hierbei sowohl ein Anthrazyklin als auch CMF verabreicht wurde, wurden diese Patienten in beide Subgruppen mit aufgenommen.

4.7.1 Radiotherapie

Insgesamt 129 Patienten aus dem Studienkollektiv hatten primär eine Radiotherapie erhalten. Eine Differenzierung, z.B. nach palliativer oder adjuvanter Situation oder nach Bestrahlungsindikation oder –feld, war im Follow-up nicht erfolgt. Es wurde also lediglich zwischen Radiotherapie „ja“ oder „nein“ unterschieden. Eine Nachbestrahlung nach brusterhaltender Therapie senkt das Risiko eines Lokalrezidivs um etwa 80 %, bringt aber keinen Überlebensvorteil (NSABP B06, Fisher et al., 1995). Die Berechnungen erfolgten deshalb für das krankheitsfreie Überleben (DFS) und nicht für das Gesamtüberleben.

Patienten, die an einer Fernmetastase aber nicht an einem Lokalrezidiv erkrankten, gingen bis zur Diagnosestellung als lokal rezidivfrei in die Berechnungen mit ein und wurden dann ausgeschlossen (censored), da dann durch weitere palliative Therapiemaßnahmen das Auftreten eines Lokalrezidivs mitbeeinflusst wurde.

Tab. 4.7.1a: Analyse der follow-up Daten für das Auftreten eines Lokalrezidivs (LR) abhängig vom S100A6-Status bezogen auf eine adjuvante Radiotherapie

Radiatio	S100A6 Status	Patientenzahl	Lokalrezidiv	Censored	Mittelwert (SD) bis zum LR in Monaten
ja	negativ (IRS 0-1)	32	8	24	120,97 (13,95)
	positiv (IRS 2-12)	97	28	69	117,97 (7,75)
	Gesamt	129	36	93	

Signifikanzanalyse:

Radiotherapie: S100A6 neg. ⇔ pos.: **log rank 0,01, p = 0,9180**

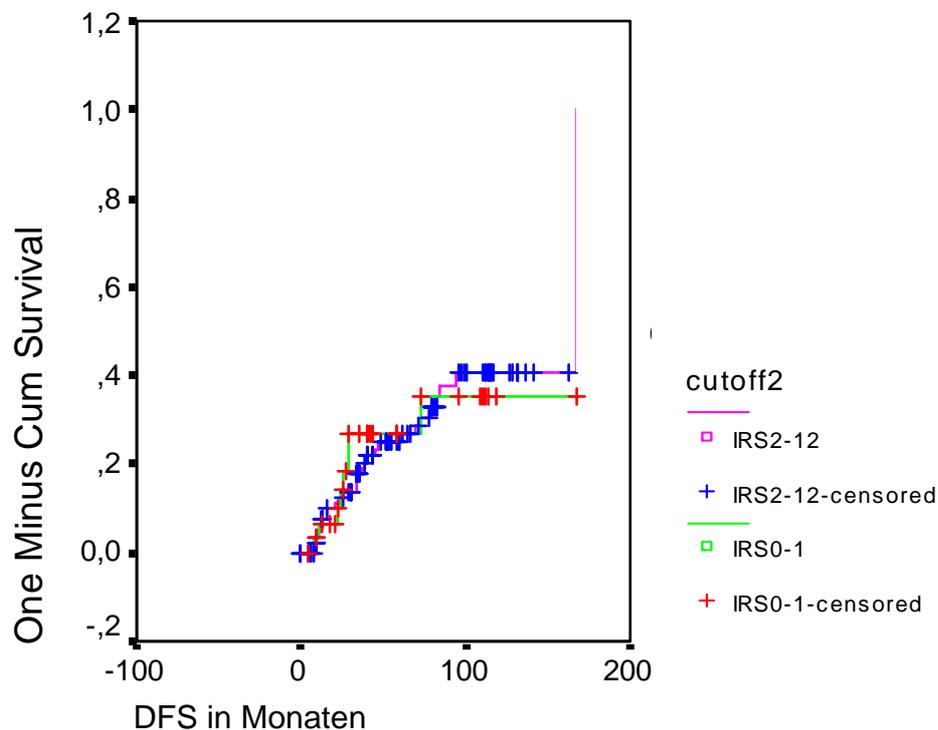
Es zeigt sich kein Unterschied für das Auftreten eines Lokalrezidivs zwischen den beiden Subgruppen. Der S100A6-Status sagt demnach über das Ansprechen oder die Wirksamkeit einer Strahlentherapie nichts aus.

In der unten stehenden Tabelle wird die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Lokalrezidivs nochmals in der Zeittafel und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Bemerkenswert ist, dass fast 40% der bestrahlten Patienten nach 10 Jahren an einem Lokalrezidiv erkrankt waren.

Tab. 4.7.1b: Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Lokalrezidivs in Prozent für Patienten mit adjuvanter Radiotherapie in Abhängigkeit vom S100A6-Status

Radiatio	S100A6 Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
Ja	negativ	6,6	26,9	26,9	35,0
	positiv	5,5	17,7	24,8	40,5

Abb. 4.7.1: Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Lokalrezidivs nach KM für Patienten mit einer primären Strahlenbehandlung abhängig vom S100A6 –Status



4.7.2 Antiöstrogentherapie mit Tamoxifen

80 Patienten aus dem Studienkollektiv erhielten adjuvant (74) oder palliativ (6) eine Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen (TAM).

Zur Entscheidung über eine Hormontherapie wird bereits der Hormonrezeptorstatus für Östrogen und Progesteron als „prädiktiver Faktor“ herangezogen. Es wurde also untersucht, ob der S100A6-Status in dieser bereits „vorselektionierten“ Subgruppe eine zusätzliche Information erbringen kann.

Da eine Hormontherapie einen Überlebensvorteil bringt, erfolgten die Berechnungen hier für das overall survival. Die Signifikanzanalyse wurde zur Vervollständigung auch für die Gruppe der Patienten, die kein Tamoxifen erhielten, durchgeführt.

Tab. 4.7.2a: Analyse des OS für den S100A6-Status bezogen auf eine Tamoxifentherapie

TAM	S100A6 Status	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
ja	negativ (IRS 0-1)	31	12	19	126,10 (13,84)
	positiv (IRS 2-12)	49	15	34	108,66 (7,32)
	Gesamt	80	27	53	

Signifikanzanalyse:

TAM-Therapie: S100A6 neg. ⇔ pos.: df: 1, **log rank 0,46, p = 0,4988**

(Keine TAM-Therapie: S100A6 neg. ⇔ pos.: df: 1, **log rank 3,59, p = 0,0582**)

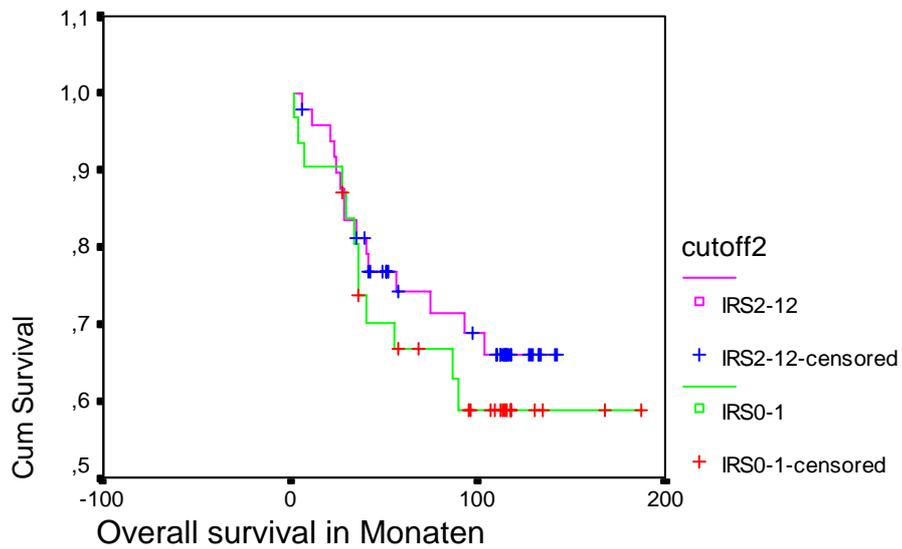
Wie zu erwarten zeigen die Überlebenskurven keinen signifikanten Unterschied. Der S100A6-Status hat also in der Subgruppe der Hormonrezeptor-positiven Patienten, denn nur diese erhalten eine Therapie mit Tamoxifen, keinen Vorhersagewert über das Ansprechen einer Antiöstrogentherapie.

Die unten aufgeführten Überlebensraten sind mit denen des Overall-survival für das Gesamtkollektiv nahezu identisch.

Tab. 4.7.2b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent für Patienten mit Tamoxifentherapie in Abhängigkeit vom S100A6-Status

TAM	S100A6 Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
ja	Negativ	90,3	80,4	66,7	58,8
	Positiv	95,9	81,3	74,2	65,9

Abb. 4.7.2: KM-Überlebenskurve für Patienten mit TAM-Therapie abhängig vom S100A6-Status



4.7.3 CMF-Polychemotherapie

78 Patienten des Studienkollektivs erhielten im Rahmen der Primärtherapie eine Polychemotherapie die CMF enthielt.

Die Regime 4xCMF (Cyclophosphamid (500mg/m²), Methotrexat (40 mg/m²) und Fluorouracil (600 mg/m²)) und 6xCMF wurden 62 mal adjuvant und 1 mal palliativ, das Bonadonna-Schema (4xAdriamycin 120 mg/m² gefolgt von 6xCMF 600/40/600 mg/m²) 15 mal adjuvant verwendet.

Überraschend zeigte sich ein deutlicher Unterschied der beiden KM-Überlebenskurven, sodass hier auch ausführlich die Subgruppe der Patienten **ohne** CMF-Chemotherapie zum Vergleich dargestellt wurde.

Da eventuell die Wahl des Chemotherapie-Schemas von kurativer bzw. adjuvanter oder palliativer Situation abhängig gewesen sein könnte, gingen die primär metastasierten Patienten nicht in die Auswertung mit ein. Die Analyse für OS und DFS erfolgte also nur für die adjuvant behandelten Patienten.

1. Analyse für das overall survival

Tab. 4.7.3.1a: Analyse des overall survival für den S100A6-Status bezogen auf eine adjuvante oder palliative CMF-Chemotherapie

CMF	S100A6 Status	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
ja	Negativ (IRS 0-1)	16	8	8	73,32 (8,76)
	Positiv (IRS 2-12)	61	15	46	107,26 (6,77)
nein	Negativ (IRS 0-1)	49	14	35	141,33 (10,28)
	Positiv (IRS 2-12)	95	23	72	144,54 (7,07)
	Gesamt	221	60	161	

Signifikanzanalyse:

CMF-CHT: S100A6 neg. ⇔ pos.: df: 1, **log rank 4,85, p = 0,0277**

Keine CMF-CHT: S100A6 neg. ⇔ pos.: df: 1, **log rank 0,18, p = 0,6708**

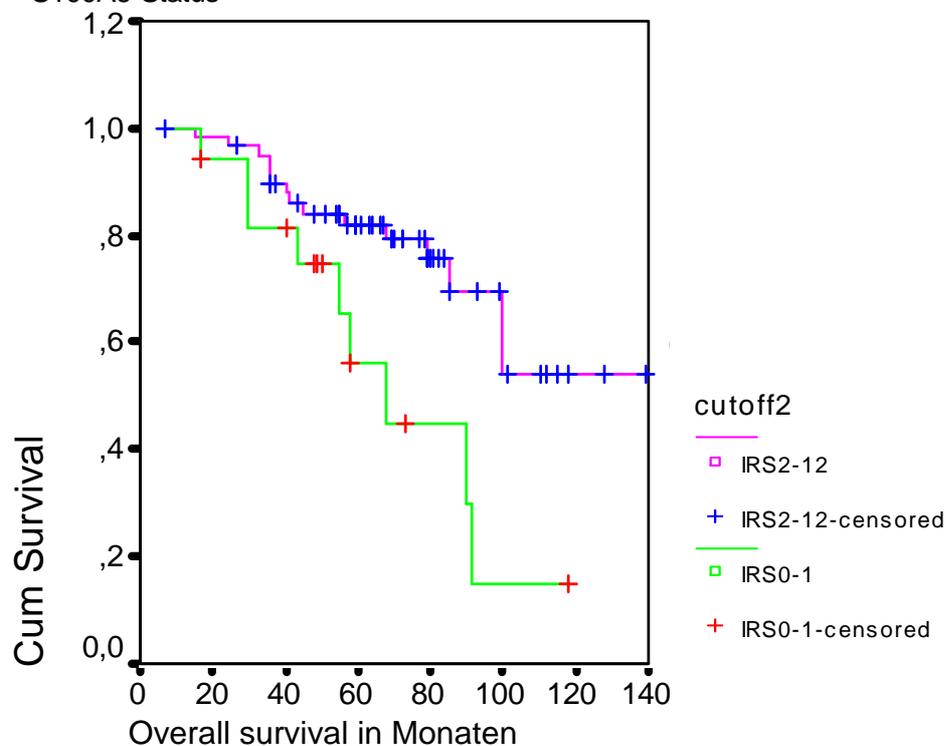
Die Überlebenskurve der S100A6 negativen Patienten ist signifikant viel schlechter als die der S100A6 positiven Patienten (s.u.). Bei den 5- und 10-Jahre Überlebensraten wird der extreme Unterschied noch deutlicher.

In sichtbarem Gegensatz dazu stehen die praktisch identischen Verlaufskurven für die komplementäre Subgruppe ohne CMF-Chemotherapie. Die Überlebensraten sind hier zudem nicht von denen des Gesamtkollektivs zu unterscheiden.

Tab. 4.7.3.1b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6-Status

CMF	S100A6 Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
ja	Negativ	100	87,1	59,9	16,0
	Positiv	100	94,9	82,1	54,2
nein	Negativ	95,9	89,7	75,9	68,1
	Positiv	97,9	87,9	78,7	71,0

Abb.4.7.3.1: Overall survival für Patienten **mit** CMF-Chemotherapie in Abhängigkeit vom S100A6-Status



2. Analyse für das disease free survival

Sollte der S100A6-Status tatsächlich ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer CMF-Chemotherapie sein, müsste der Unterschied für die Zeit bis zum Wiederauftreten eines Rezidives noch deutlicher sein.

Tab. 4.7.3.2a: Analyse des disease free survival für den S100A6-Status bezogen auf eine CMF-Chemotherapie

CMF	S100A6 Status	Patienten- zahl	Rezidiv	Censored	Mittelwert (SD) des DFS in Monaten
ja	negativ (IRS 0-1)	16	10	6	40,30 (6,20)
	positiv (IRS 2-12)	61	23	38	90,35 (7,76)
nein	negativ (IRS 0-1)	46	18	28	110,87 (10,64)
	positiv (IRS 2-12)	91	35	56	113,70 (7,27)
	Gesamt	214	86	128	

Signifikanzanalyse:

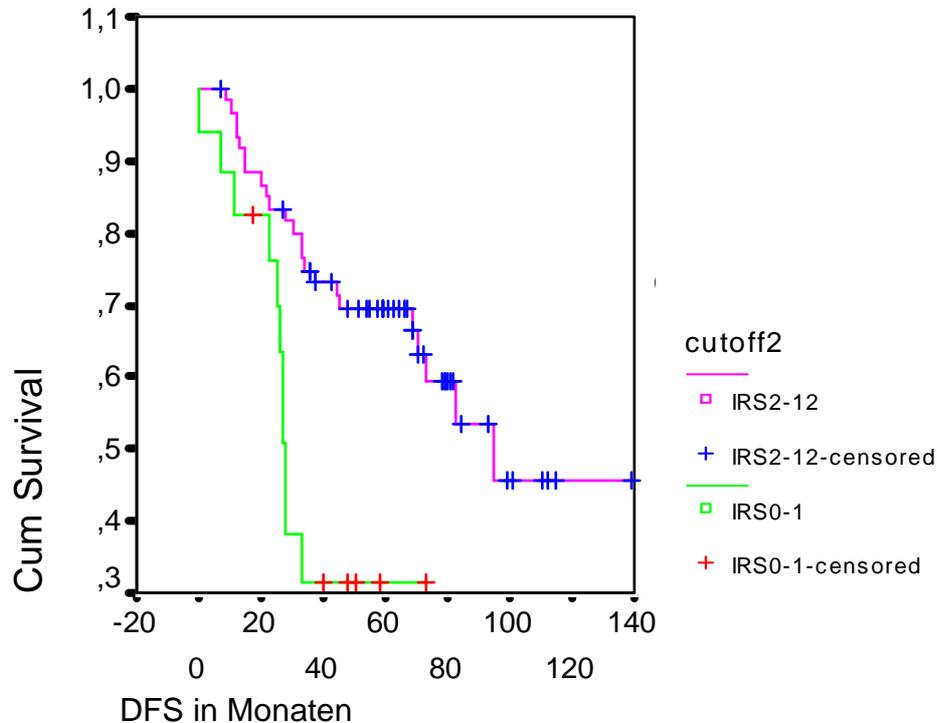
CMF-CHT: S100A6 neg. ⇔ pos.: df: 1, **log rank 7,15, p = 0,0075**

Wie erwartet, zeigte sich hier ein noch deutlicherer Unterschied der Verlaufskurven. Der mittlere Zeitdauer bis zum Auftreten eines Rezidivs ist in der S100A6 negativen Gruppe nicht einmal halb so lange wie in der S100A6 positiven Gruppe!

Tab. 4.7.3.2b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6 -Status

CMF	S100A6 Status	1 Jahr DFS	3 Jahre DFS	5 Jahre DFS	10 Jahre DFS
ja	negativ	87,5	33,6	-	-
	positiv	93,3	74,8	69,3	45,7
nein	negativ	89,0	73,4	68,8	60,4
	positiv	92,3	82,0	66,9	59,5

Abb. 4.7.3.2: Disease free survival (DFS) für Patienten **mit** CMF-Polychemotherapie in Abhängigkeit vom S100A6 -Status



Die beiden Kaplan-Meier Kurven für das OS und das DFS zeigen einen dramatisch viel schlechteren Verlauf für die S100A6 negative Gruppe. Allerdings ist diese Subgruppe mit 17 Patienten relativ klein.

Sowohl für die S100A6 positiven Patienten als auch für die komplementäre Subgruppe ohne CMF-Polychemotherapie unterscheidet sich der Verlauf praktisch nicht von dem des gesamten Studienkollektivs.

Der S100A6-Status scheint demnach ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer CMF-Polychemotherapie zu sein.

4.7.4 Anthrazyklinhaltige Chemotherapie

Für diese Gruppe wird im Moment die Her-2/neu Überexpression als prädiktiver Faktor für das verbesserte Ansprechen einer Chemotherapie diskutiert.

Insgesamt wurden im Rahmen der Primärtherapie 68 Patienten des Studienkollektivs mit einem anthrazyklinhaltigen Chemotherapieregime (hier: Doxorubicin [DXR]) behandelt.

Das Regime FAC (Cyclophosphamid 500 mg/m² / Doxorubicin 50 mg/m² / 5-Fluorouracil 500 mg/m²) wurde einmalig adjuvant verwendet. AC (Doxorubicin 40 mg/m² / Cyclophosphamid 600 mg/m²) wurde 27 mal adjuvant und 2 mal palliativ und das oben bereits erwähnte Bonadonna-Schema (4xAdriamycin 120 mg/m² gefolgt von 6xCMF 600/40/600 mg/m²) (siehe auch 4.7.3) 15 mal adjuvant verwendet.

Ebenso wurden in diese Gruppe jeweils ein adjuvant und ein palliativ nach einem NC-Schema (Mitoxantron 12 mg/m² / Cyclophosphamid 600 mg/m²) behandelte Patient miteinbezogen. Mitoxantron ist ein Anthracendion und den Anthrazyklinen sehr ähnlich.

Tab. 4.7.4a: Analyse der follow-up Daten für den S100A6-Status bezogen auf eine anthrazyklinhaltige Chemotherapie

DXR	S100A6 Status	Patientenzahl	Tod durch Mamma-Karzinom	Censored	Mittelwert (SD) der ÜLZ in Monaten
ja	negativ (IRS 0-1)	10	6	4	70,66 (10,19)
	positiv (IRS 2-12)	37	15	22	107,30 (14,10)
nein	negativ (IRS 0-1)	59	21	38	129,70 (9,94)
	positiv (IRS 2-12)	129	33	96	113,20 (4,33)
	Gesamt	235	75	160	

Signifikanzanalyse:

DXR-Therapie: S100A6 neg. ⇔ pos.: df: 1, **log rank 0,64, p = 0,4241**

Keine DXR-Therapie: S100A6 neg. ⇔ pos.: df: 1, **log rank 1,63, p = 0,2013**

Es zeigt sich kein Unterschied in der Prognose für die S100A6 positiven und negativen Patienten. S100A6 ist kein prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer anthrazyklinhaltigen Chemotherapie (zumindest für Doxorubicin).

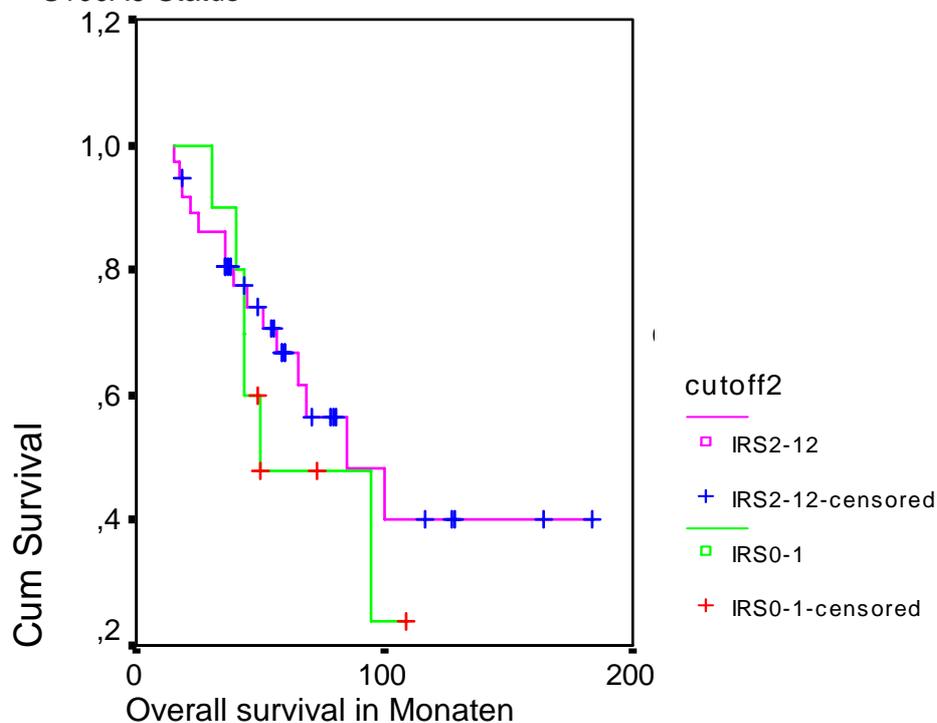
Der deutliche Unterschied der mittleren Überlebensraten zwischen den untersuchten Subgruppen und der komplementären Subgruppe (Patienten **ohne** anthrazyklinhaltige Chemotherapie) weist auf den vorrangigen Einsatz dieser Chemotherapieregime bei Patienten mit schlechter Prognose hin.

Dies zeigen auch die 5- und 10 Jahres Überlebensraten für diese Subgruppe (s.u.), die deutlich schlechter sind als die des Gesamtkollektivs.

Tab. 4.7.4b: Überlebenswahrscheinlichkeit in Prozent in Abhängigkeit vom S100A6-Status

DXR	S100A6 Status	1 Jahr ÜLZ	3 Jahre ÜLZ	5 Jahre ÜLZ	10 Jahre ÜLZ
ja	negativ	100	90,0	48,0	24,0
	positiv	100	86,3	66,6	40,3

Abb. 4.7.4: KM-Überlebenskurve für Patienten mit DXR-Therapie abhängig vom S100A6-Status



4.8 S100A6 und Metastasenlokalisierung

Um herauszufinden, ob S100A6 im Rahmen der Metastasenlokalisierung eine Rolle spielt, wurden die Patienten im Kollektiv, bei denen im follow up Fernmetastasen eruiert worden waren nochmals genauer untersucht.

Viscerale Metastasen waren in 45 Fällen als Rezidivlokalisierung angegeben worden, ossäre Filiae in 32 Fällen, cerebrale Filiae in 2 Fällen. In den übrigen Fällen war die Lokalisation nicht in diese Gruppen einteilbar oder keine Lokalisation angegeben.

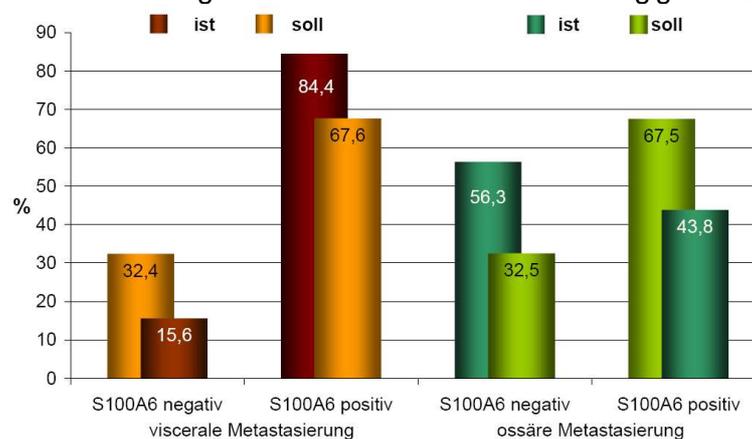
Tab. 4.8. 4-Felder- χ^2 -Test:: Vergleich der Metastasenlokalisierung in Abhängigkeit vom S100A6-Status

Metastasen-Lokalisation		S100A6 negativ (IRS 0-1)	S100A6 positiv (IRS 2-12)	Zeilensumme
Visceral	ist	7	38	45
	soll	14,6	30,4	45,0
Ossär	ist	18	14	32
	soll	10,4	21,6	32,0
Spaltensumme	ist	25	52	77
	soll	25,0	52,0	77,0

$$\chi^2 = 14,125, \text{ df } 1, \text{ p (zweiseitig) } < 0,001$$

Es zeigt sich eine signifikante Häufung der visceralen Metastasen bei den S100A6 positiven Tumoren bzw. eine Häufung der ossären Metastasen bei den S100A6 negativen Tumoren.

Abb. 4.8: Prozentuale Verteilung der Metastasenlokalisierung abhängig vom S100A6-Status



5. Diskussion

5.1 Protein S100A6: Zusammenfassende Erkenntnisse

S100A6 ist ein homodimeres Protein aus der Gruppe der S100-Proteine, das nahezu ausschließlich im Zytoplasma von Epithelzellen, Fibroblasten und Neuroglia vorkommt und vier Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen binden kann. Signal vermittelte Änderungen der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration durch erhöhten Einstrom aus dem Extrazellularraum oder Freisetzung aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern führen durch dessen Bindung an S100A6 zu einer Konformationsänderung und Freilegung von hydrophoben Oberflächenregionen, die eine Interaktion mit Effektorproteinen ermöglicht.

Bisher hauptsächlich in vitro identifizierte Effektorproteine sind die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Annexine (I, II, VI, XI), Caldesmon und Ca-cyBP.

S100A6 kann so verschiedene biologische Funktionen ausüben: Es spielt eine Rolle im Rahmen der Proliferation und Differenzierung, der Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Homöostase, bei der Drüsensekretion, beeinflusst die Wirkung von Insulin, ADH und Prolaktin und kann ähnlich wie Calmodulin die Interaktion kontraktiler Filamente steuern.

Wie bei einigen anderen S100 Proteinen (A2, A3, A4, A7), konnte auch bei S100A6 ein Zusammenhang mit der Progression bei verschiedenen malignen Tumoren nachgewiesen werden. So zeigt z.B. der Expressionsgrad der S100A6-mRNA in einer Metastase beim Melanom eine direkte Korrelation mit dem overall- und dem disease-free-survival. Beim Kolonkarzinom konnte eine Zunahme der S100A6 positiven Zellen entsprechend der Adenom-Karzinom-Sequenz nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich hier eine statistisch signifikante Zunahme der S100A6-Konzentration im Bereich der „Tumor-Invasionsfront“.

Die lediglich im Ansatz durchgeführten Untersuchungen beim Mammakarzinom konnten bislang keinen Zusammenhang zwischen der Ausprägung von S100A6 und der malignen Entartung im Mammagewebe aufzeigen.

5.2 Meßmethodik und Auswertung

In der vorliegenden Studie wurde zum Nachweis von S100A6 das ABC-Verfahren eingesetzt. Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis von bestimmten Proteinen ist eine häufig angewandte und bei relativ geringem technischen Aufwand gut reproduzierbare Methode.

Da für die Herstellung des primären Antikörpers reine, durch E. coli produzierte, rekombinante humane S100A6-Monomere als Immunogen verwendet werden, ist deren Sensitivität und Spezifität sehr hoch. Kreuzreaktionen mit anderen S100 Proteinen wurden nicht beobachtet.

Sehr vorteilhaft ist, dass nach Beendigung der Färbung und Einbettung der Präparate, eine Zeit unabhängige und jederzeit ohne weiteren technischen Aufwand wiederholbare Auswertung möglich ist.

Durch Festlegung von Referenzpräparaten ist die Abschätzung der Färbeintensität rasch und sicher erlernbar. Die Bestimmung des prozentualen Anteils der positiv gefärbten Zellen ist nicht durch Referenzpräparate festlegbar, jedoch zeigt sich nach Unterteilung in 4 Gruppen eine gute Übereinstimmung in den drei erfolgten Auswertungen (siehe 4.3.2).

Die hohe Übereinstimmung zwischen Experten und Doktorand weist darauf hin, dass Spezialkenntnisse keine notwendige Voraussetzung für die korrekte Auswertung sind. Die geringe Intra- und Interobservervariabilität zeigt eine sehr hohe Zuverlässigkeit bei Einteilung in die Kategorien S100A6 positiv oder negativ (siehe 4.3.4).

Die Repräsentativität eines beliebigen Schnittes zur Bestimmung des S100A6-Status wird generell durch die Inhomogenität der positiven und negativen Zellen im Tumor in Frage gestellt, gleichartige Probleme liegen z.B. auch bei der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus vor.

Zusätzlich muss aber auch die von Stulik beim Kolonkarzinom beschriebene Zunahme der S100A6-Konzentration im Bereich der „Invasionsfront“ berücksichtigt werden (Stulik et al.,2000) (s. 1.1.7). Da die Funktion von S100A6 im Rahmen der malignen Progression beim Mammakarzinom noch nicht klar ist und solche Beobachtungen hier bisher auch noch nicht dokumentiert waren, erfolgte in der vorliegenden Untersuchung die Auswahl der Schnittstufe nach dem Zufallsprinzip. Auf den Präparaten, auf denen Tumorrandbereich zu sehen war, war allerdings keine auffällige Konzentrationsverteilung bemerkt worden, auch ist eine erneute Zunahme von „ursprünglichen“ Gewebeformationen im Tumorzentrum beim Mammakarzinom im Gegensatz zum Kolonkarzinom nicht beschrieben.

5.3 Repräsentativität des vorliegenden Patientenkollektivs

Die Ergebnisse bezüglich der konventionellen Prognosefaktoren im untersuchten Patientenkollektiv befinden sich weitestgehend im Einklang mit der Mehrzahl der publizierten Studien (siehe 3.1.2 und 3.2).

UICC-Stadium, Tumorgröße, Lymphknoten- und Metastasenstatus stellten sich als hochsignifikant univariate, unabhängige Prognosefaktoren dar.

Das histologische Grading wird in der Regel als schwächerer Prognosefaktor als die oben genannten betrachtet (Henson et al.,1991;Harvey et al.,1992). Wichtigster Einwand gegen das Grading ist die erhebliche Interobserver-Variabilität bei dessen Bestimmung. Im vorliegenden Patientenkollektiv war das histologische Grading kein signifikanter Prognosefaktor, gleichwohl zeigte sich

eine deutliche Tendenz zum schlechteren Überleben bei entdifferenzierten Tumoren.

Der histologische Subtyp, bei begrenzter Einteilung (duktal, lobulär, andere), der Steroid- sowie der c-erb-B2-Rezeptorstatus zeigten sich auch im Studienkollektiv als schwache, nicht signifikante Prognosefaktoren.

Keine Korrelation zur Prognose ließ sich bezüglich des Menopausenstatus und des Lebensalters feststellen. Allerdings wurde beim Lebensalter zur Signifikanztestung das mittlere Lebensalter von 55,5 Jahren verwendet, während in multivariaten Analysen der Erkrankungsbeginn vor dem 35. Lebensjahr als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert worden ist.

Bewertet man also die Repräsentativität eines Kollektives nach der Signifikanz der bekannten Prognosefaktoren, kann das Studienkollektiv als repräsentativ für ein übliches Mammakarzinomkollektiv bewertet werden.

5.4 S100A6 in Abhängigkeit von Prognoseparametern

In Kapitel 3.3.5 wurde nachgewiesen, dass in Bezug auf die klassischen Prognosefaktoren Tumorgöße, Nodal- und Metastasenstatus, sowie histopathologisches Grading der S100A6-Status keine signifikanten Verteilungsunterschiede aufweist, d.h. S100A6 positive und negative Patienten in jedem Tumorstadium nahezu gleichverteilt vorkommen.

Hieraus kann umgekehrt der Schluss gezogen werden, dass der S100A6-Status auch unabhängig vom jeweiligen Stadium der Tumorerkrankung ist, sich also durch das Fortschreiten der Erkrankung nicht ändert oder verändert wird.

Bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zur Steroidrezeptordichte, die bei zunehmender Entdifferenzierung abnimmt, der S100A6-Gehalt hiervon unbeeinflusst zu sein scheint.

Eine signifikant auffällige Verteilung von S100A6 fand sich in Bezug auf die Steroidrezeptoren und den histologischen Subtyp.

Östrogenrezeptor negative Patienten sind genauso wie Progesteronrezeptor negative Patienten überzufällig häufig S100A6 positiv.

Eine Erklärung für diese Verteilung könnte die unterschiedliche Herkunft der Tumorzellen sein:

Bereits bei der mikroskopischen Betrachtung der normalen Drüsengänge fällt eine deutlich stärkere Anfärbung der äußeren, myoepithelialen Zellschicht auf (s. S.70). S100 wird, wie auch CD10 und das Actin des glatten Muskels, als Marker zur Identifizierung dieser basalen Zellschicht in histologischen Schnitten verwendet. Normale Zellen aus dieser Schicht sind aber überwiegend Östrogenrezeptor negativ (Kesse-Adu et al., 2004).

Dies könnte bedeuten, dass auch S100A6 positive Tumoren häufiger ihren Ursprung in der basalen, myoepithelialen Zellschicht haben. Kesse-Adu et al. konnten nachweisen, dass 29% der Östrogenrezeptor negativen Mammakarzinome eine myoepithelialer Differenzierung aufwiesen, während dies im Vergleich dazu lediglich 2,5% bei Östrogerezeptor positiven Tumoren waren. Dies gab zu der Vermutung Anlaß, dass etwa 29% der Östrogenrezeptor negativen Mammakarzinome von der basalen Zellschicht abstammen könnten (Kesse-Adu et al., 2004). Tumoren des basalen Phänotyps waren auch bei Abd El-Rehim typischerweise in den meisten Fällen Östrogenrezeptor negativ. Er kam zu dem Ergebnis, dass das Mammakarzinom in speziell differenzierte Subklassen unterteilt werden kann, welche sowohl biologisch als auch klinisch relevant sind (Abd El-Rehim et al., 2004).

Ebenso sind signifikant vermehrt lobuläre Karzinome S100A6 negativ (die Gesamtzahl der lobulären Karzinome im Studienkollektiv mit 23 ist jedoch relativ klein). Da lobuläre Karzinome häufiger Östrogenrezeptor positiv sind als duktales Karzinome (Reiner et al., 1988), deckt sich dieses Erkenntnis mit der im vorausgegangenen Abschnitt.

5.5 S100A6 als Prognosefaktor

Aufgrund der heterogenen Eigenschaften der Mammakarzinom-Erkrankung haben Prognosefaktoren eine entscheidende klinische Bedeutung für die Erstellung eines individuellen Risikoprofils und die Festlegung des weiteren therapeutischen Vorgehens. In den Kapiteln 3.3.6 und 3.3.7 wurde deshalb untersucht, ob S100A6 eine prognostische Aussage für das Auftreten eines Rezidives zulässt.

Im Gegensatz zum Melanom und Kolonkarzinom (s.1.1.7) konnte in unserer Studie für das Mammakarzinom sowohl im Gesamtkollektiv, als auch in den verschiedenen Subgruppen keine signifikante prognostische Relevanz für S100A6 nachgewiesen werden. Grundsätzlich zeigt sich jedoch in allen Untersuchungen eine schlechtere Tendenz für die S100A6 **negative** Gruppe, was beim Vergleich mit den Untersuchungen zu anderen Malignomen überrascht.

Ähnlich der Untersuchungen zu uPA und PAI-1 zeigte sich die deutlichste Tendenz für eine unterschiedliche Prognose der S100A6 negativen und positiven Patienten in der N0-Untergruppe. Auch hier haben S100A6 positive Patienten die Tendenz zur besseren Prognose, die vermehrte Expression von S100A6 hätte also anders als bei uPA / PAI-1 und anders als beim Melanom und Kolonkarzinom eher einen protektiven Charakter.

Sollte S100A6 ein Marker für den Ursprung eines Tumores aus der basalen Zellschicht sein, decken sich diese Ergebnisse nicht mit der Arbeit von Abd El-Rahim, bei dem die Tumoren des basalen Phänotyps (und damit dementsprechend mehrheitlich S100A6 positive Tumoren) eine Gruppe mit schlechter Prognose darstellen (Abd El-Rehim et al., 2004). Allerdings konnten bei Tumoren aus der inneren, luminalen Zellschicht, die dann überwiegend eine Gruppe von S100A6 negativen Tumoren darstellen würden, wiederum Subgruppen mit ganz unterschiedlichen Prognosen und Therapieverhalten identifiziert werden,

sodass eine Bestimmung der Prognose allein nach dem S100A6-Status nicht sinnvoll erscheint (Sørli et al., 2003).

5.6 S100A6 als prädiktiver Faktor

Die einzigen Evidenz-basierten prädiktiven Faktoren, die nach heutigem Kenntnisstand zur Erstellung von Therapiekonzepten eingesetzt werden können, sind der Steroidhormonrezeptorstatus für eine Hormontherapie und der Her-2/neu-Status für eine Herceptin-Therapie. Alle anderen Prognosefaktoren lassen nur ungenügende Vorhersagen über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens einer Therapie zu. Gerade aber in der adjuvanten Situation, in der die Effektivität einer Therapie nicht überprüft werden kann, wären prädiktive Faktoren wünschenswert. In Kapitel 4.7. wurde deshalb untersucht, ob der S100A6-Status einen Einfluss auf das Ansprechen verschiedener Therapien hat, wobei ein signifikant differentes Rezidiv-freies- oder Gesamtüberleben als Ausdruck für ein besseres Ansprechen auf eine Therapie gewertet wurde.

4.6.1 Ergebnisse

Wird die Zeitdauer bis zum Auftreten eines Lokalrezidives als Maß für den Wirkungsgrad einer Radiotherapie betrachtet, hat der S100A6-Status darauf keinen Einfluß.

Auch beim Ansprechen auf eine Tamoxifen- oder Anthrazyklintherapie spielt der S100A6-Status offensichtlich keine Rolle. Für die Analysen wurden hier wegen der systemischen Wirkung der Medikamente das disease free survival und das overall survival verwendet. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben für S100A6-positive oder –negative Patienten.

Überraschend deutlich fiel jedoch der Unterschied in der Prognose bei den Patienten aus, die eine CMF-Chemotherapie erhalten hatten. S100A6-negative

Frauen hatten ein extrem viel schlechteres Rezidiv-freies- und Gesamtüberleben als S100A6 positive.

Dies würde dementsprechend bedeuten, dass S100A6-negative Karzinome besonders resistent gegenüber eine CMF-Chemotherapie sind oder S100A6-positive Tumorzellen sehr empfindlich auf eine CMF-Chemotherapie reagieren. Der Wirkungsgrad einer CMF-Chemotherapie könnte somit S100A6 vermittelt zu sein.

Die Wirkungsweisen der beteiligten Medikamente stellen sich in Kürze wie folgt dar (Sauer, 1995):

Cyclophosphamid ist eine inerte Substanz und muß zunächst in das hauptsächlich Alkylans Phosphoramid-Mustard metabolisiert werden. Alkylierung bedeutet die Bildung kovalenter Bindungen mit DNS (sog. intra- und interstrand crosslinks) und Proteinen. Cyclophosphamid wirkt hierdurch zytotoxisch und zytostatisch (s.u.).

Methotrexat ist als Folsäureantagonist ein sogenannter Antimetabolit. Die zelluläre Aufnahme erfolgt durch aktiven Membrantransport. Methotrexat hemmt spezifisch die Dihydrofolat-Reduktase und damit die Umwandlung von Folsäure in Tetrahydrofolat. Da Tetrahydrofolat essentiell für die Synthese der Purinbasen ist, wird deren de-novo-Synthese gehemmt.

5-Fluorouracil ist als Pyrimidin-Antagonist ebenfalls ein Antimetabolit. Es wird durch Phosphorylasen und Kinasen zu 5-Fluorodeoxyuridin-Monophosphat und –Triphosphat sowie 5-Fluorouridin-Triphosphat aktiviert. Hierdurch kommt es zu einer Hemmung der Thymidilat-Synthase, die Uridin-Monophosphat in Thymidinmonophosphat verwandelt (mit Tetrahydrofolat als Coenzym (s.o.)). 5-Fluorouracil wird auch als „falsche“ Base in RNS und DNS eingebaut und induziert so Apoptose.

McGuire hat die notwendigen Grundlagen für die Entwicklung tumorbiologisch begründeter prognostischer und prädiktiver Faktoren aufgezeigt (McGuire,

1991). Grundvoraussetzung hierfür ist die Erstellung eines biologischen Modells.

Da Cyclophosphamid gemeinhin als das „Hauptagens“ im Rahmen der CMF-Polychemotherapie gilt, wird nachfolgend versucht, dessen Metabolisierung und Wirkungsmechanismus möglichst genau darzustellen um so erste Hypothesen für ein biologisches Modell entwickeln zu können.

4.6.2 Bioaktivierung und biologische Wirkung von Cyclophosphamid (CP)

1. Bioaktivierung (und Abbau)

Cyclophosphamid (CP) wird, wie oben bereits erwähnt, als inaktive „Prodrug“ verabreicht und erst im menschlichen Organismus zum eigentlich alkylierenden Agens, dem Phosphoramid-Mustard (PM), verstoffwechselt:

CP wird hierbei zunächst in den Lebermikrosomen durch Enzyme des Cytochrom P 450 Systems (CYP2A6, 2B6, 2C, 3A4) in 4-Hydroxycyclophosphamid (4-OH-CP) hydroxyliert. Dieses wiederum steht durch Tautomerisierung mit Aldophosphamid im Gleichgewicht. Katalysiert durch verschiedene Basen wird Aldophosphamid in Phosphoramid Mustard, dem eigentlich wirksamen, alkylierenden Agens und das urotoxische Acrolein verwandelt (Busse et al., 1998).

Die Lokalisation des zweiten Schrittes im Verlauf der Bioaktivierung von CP ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Einige Autoren halten PM mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von 15 Stunden für den wichtigen zirkulierenden Metaboliten, was bedeuten würde, dass die weiteren Stoffwechselschritte zwischen 4-OH-CP und PM nicht in der Tumorzelle selbst stattfinden. Obwohl PM bei physiologischem pH meist in ionisiertem Zustand vorliegt, könnte es bei genügend langer Expositionszeit noch adäquat in die Zelle penetrieren um so einen zytotoxischen Effekt zu erreichen (Kenneth et al., 1994).

Andere Autoren halten 4-OH-CP, trotz seiner kurzen Halbwertszeit von weit weniger als einer Stunde, für die Transportform des zytotoxischen Metaboliten von der Leber in den Tumor. Bei in vitro Versuchen zeigten gleiche verabreichte Mengen von 4-OH-CP gegenüber PM bei W256 Karzinosarkom-Zellen von

Ratten und P388-Zellen der Maus eine 10fach höhere zytotoxische Wirkung (Domeyer et al., 1980). Im Plasma wurde zwar aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten nach Verabreichung von CP kaum 4-OH-CP und um ein Vielfaches mehr PM gefunden, es zeigte sich allerdings auch in vivo, dass CP eine effektivere Wirkung gegen L 1210-Leukämie-Zellen hatte als gleiche Mengen PM, sodass das im Plasma gefundene PM zumindest nicht für alle Antitumoreffekte des CP verantwortlich gemacht werden darf (Colvin et al., 1976).

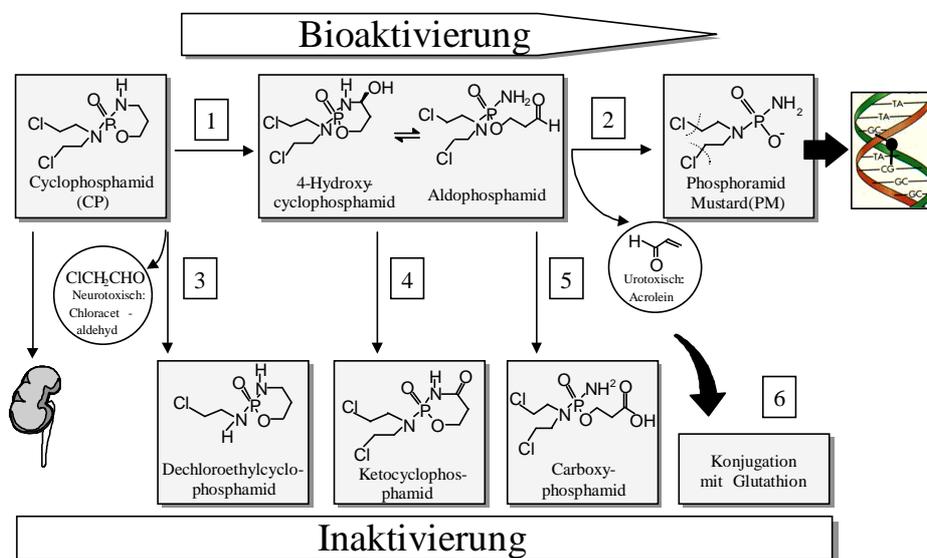


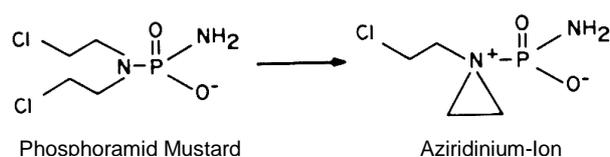
Abbildung: Metabolisierung und Ausscheidung von Cyclophosphamid. Beteiligte Enzyme: (1) Cytochrom P450 CYP2A6, CYP2B6; CYP2C-Subfamilie, CYP3A4; (2) nicht-enzymatisch, katalysiert durch verschiedene Basen, Albumin und die 3'-5' Exonuklease; (3) CYP3A4; (4) Aldehyd Oxidase; (5) Aldehyde Dehydrogenase (ALDH); (6) Konjugation von Aldophosphamid und Phosphoramid Mustard mit Glutathion durch die Glutathion S-transferase.

Das direkt in der Tumorzelle aus 4-OH-CP gebildete PM ist demnach der eigentlich wirksame Teil des PM. Die Menge des wirksamen PM wäre so auch direkt vom Milieu in der Tumorzellen und deren spezifischen Enzymen abhängig.

Der wichtige und limitierende Schritt hierbei ist die Umwandlung von 4-OH-CP in Aldophosphamid durch Tautomerisierung (Tautomerie: Reversibler Übergang einer konstitutionsisomeren Form in eine andere). Aldophosphamid existiert nur transient und wird durch Basen katalysiert in PM verwandelt. Aldophosphamid ist hierbei praktisch nicht nachweisbar, was wohl bedeutet, dass dieser Schritt

limitierend ist und sämtliches Aldophosphamid sofort nach seiner Entstehung entweder in PM umgewandelt oder zu Carboxyphosphamid abgebaut wird. Für die Tautomerisierung wird ein „bifunktionaler Katalysator“ gebraucht. Also ein Molekül, das fähig ist, synchron einem anderen Molekül ein Proton zu entziehen und an einer anderen Stelle eines zu übertragen. Ein solcher Katalysator kann ein komplexes Enzym oder auch eine einfache polybasische anorganische Säure sein (Phosphat, Bicarbonat, Glucose-6-Phosphat). Der pH hat auf diese Reaktion nur insofern Einfluß, als er den Ionisationszustand des bifunktionalen Katalysators bedingt (zunehmender pH erhöht die Umwandlungsrate). Manche Zellen könnten demnach sehr sensitiv auf CP reagieren, weil durch eine relativ größere bifunktionale katalytische Aktivität mehr 4-OH-CP zu PM umgesetzt wird (Low et al., 1982).

Die alkylierende Wirkung von PM entsteht über ein Intermediärprodukt, einem Aziridin: Bei physiologischem pH dissoziiert die Hydroxylgruppe des PM und führt dadurch zu einer negativen Ladung, welche über das Molekül verteilt wird. Unter dieser Bedingung wird das tertiäre (mustard) Nitrogen nukleophil genug, um ein Aziridinium-Ion zu bilden und dadurch alkylierend zu wirken (Colvin et al., 1976).



Die Alkylierung erfolgt nach Abspaltung der Chloratome von den Chloräthyl-Gruppen. Es entstehen kovalente Bindungen mit DNS bevorzugt an der N⁷-Position des Guanins (intra- und interstrand crosslinks) und Proteinen.

Auf dem gesamten Weg der Bioaktivierung findet gleichzeitig auf jeder Ebene auch die Inaktivierung eines Teils des CP statt: Ein Teil wird unverändert renal ausgeschieden oder durch CYP3A4 in das neurotoxische Chloroacetaldehyd oder in Dechloroethyl-CP verwandelt. Die Aldehydoxidase verwandelt 4-OH-CP

in Keto-CP, die Aldehyddehydrogenase verwandelt Aldophosphamid in Carboxyphosphamid. Beide Substanzen sind zytotoxisch inaktive Metaboliten und werden, genauso wie das unveränderte CP, innerhalb von 24 Stunden nahezu komplett renal ausgeschieden (Busse et al., 1998).

Manche Tumorzellen könnten demnach auch besonders unempfindlich auf CP reagieren, weil durch eine höhere Aktivität an NAD-abhängigen Aldehyddehydrogenasen, Aldehyd-Oxidasen oder Alkohol-Dehydrogenasen CP vermehrt in seine inaktiven Metabolite abgebaut wird (Low et al., 1982). Andererseits sind unterschiedliche Phänotypen in der Verstoffwechslung von CP bekannt: Sogenannte „low carboxylators“ haben eine verminderte Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase, damit eine verminderte Ausscheidung des Metaboliten Carboxycyclophosphamid und dafür eine vermehrte Bildung von PM (Sauer, 1995).

2. Biologische Wirkung

Phosphoramid-Mustard induziert über kovalente Bindungen mit der DNS sowohl Einzelstrang Guanin N⁷ Addukte (intrastrand crosslinks), als auch Zwischenstrang N⁷-N⁷ Verbindungen (interstrand crosslinks) zwischen den beiden Guaninresten in GNC – GNC Sequenzen. Obwohl die Interstrand crosslinks (ICL) nur einen kleinen Teil der Addukte ausmachen, gibt es eindeutige Hinweise darauf, dass gerade die ICLs die kritischen zytotoxischen Addukte sind. Der genaue Reparaturmechanismus von ICLs, bei dem das Nukleotid-Excisions-Reparatursystem (NER) eine wichtige Rolle spielt, ist immer noch unklar (Cai et al., 2001).

Durch die „interstrand crosslinks“ werden vermehrt Doppelstrangbrüche (DSB = double strand break) induziert. Allerdings geschieht das hauptsächlich in sich teilenden Zellen. In den stationären Phasen des Zellzyklus (z.B. G1) werden nur wenige DSBs produziert (DeSilva et al., 2000).

Nach einer Behandlung mit PM alleine, kommt es zu einer Akkumulation der Zellen in der späten S-Phase (Cai et al., 2001). Bei 9L-Gliosarkomzellen konnte nachgewiesen werden, dass dieser Arrest in der S-Phase um so früher erfolgt,

je höher die schädigende Wirkung des Agens ist. Das scheint darauf hinzuweisen, dass das Ausmaß der DNA-Schädigung eine direkte Auswirkung auf die Fähigkeit der Zelle hat, die S-Phase komplett zu durchschreiten (Schwartz et al., 2001).

Andererseits reagieren Zellpopulationen, die sich vermehrt in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, sensitiver auf PM als Populationen in der späten S- bzw. G2-Phase, ohne dass ein signifikanter Unterschied im durch PM verursachten DNA-Schaden (ICLs oder DNA-Protein-Cross links) festgestellt werden kann (Murray et al., 1986). Der Zeitpunkt der Schädigung im Zellzyklus spielt also ebenfalls eine Rolle.

Während man früher von einer eher unspezifischen Wirkung der Zytostatika auf schnell proliferierende Zellen ausging, wird deren Wirkung heute eher in der Induktion des natürlichen Zelltodes, der Apoptose, gesehen. Die einzelnen zytostatischen Effekte werden den verschiedenen erforderlichen Schritten einer komplexen Signaltransduktionskaskade zugeordnet, die zur Apoptose führt (Busse et al., 1998).

Auch CP entfaltet seine zytotoxische Wirkung durch die Auslösung der Apoptose. Gleichzeitig hat es aber auch eine zytostatische Wirkungskomponente, die zwar zu einem vorübergehenden Arrest im Zellzyklus aber nicht zu einem Zelluntergang führt.

Offensichtlich gibt es einen Schwellenwert für das Ausmaß des DNA-Schadens, der überschritten werden muss, um die Apoptose auszulösen. Ist er überschritten, kommt es über bislang noch nicht exakt identifizierte Mediatoren (z.B. Verlust von Glutathion, NAD(P)H₂, oder ADP / ATP, supraphysiologische cytosolische Ca²⁺-Konzentrationen etc.) zur Induktion der mitochondrialen, Caspase-9 abhängigen Apoptose (Schwartz et al., 2001):

Durch eine zunehmende Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran kommt es zur Auflösung des inneren Membranpotentials, einer Zunahme des Matrixvolumens und einer mechanischen Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran. Hierdurch wird Cytochrom c (ein Hilfssubstrat der Atmungskette) freige-

setzt, das sich normalerweise im intermembranösen Raum befindet (Susin et al., 1999).

Im Zytoplasma assoziiert Cytochrom c bei Säugern mit dem Protein APAF-1 („**AP**opotosis **Act**vating **F**actor-1“). Hierdurch wird die Konformation von APAF-1 verändert und eine Domäne aktiviert, die auch in verschiedenen Caspasen vorkommt : CARD („**CA**spase **R**ecruiting **D**omain“). Diese aktiviert die Procaspase-9 und setzt die Caspase-Kaskade in gang (Wagener, 1999).

Caspase-9 aktiviert Caspase-3 und diese wiederum den „DNS – Fragmentierungs -Faktor“, eine Caspase-aktivierte-DNase (CAD), die für die Fragmentierung der DNS verantwortlich ist (Susin et al., 1999).

Die Apoptose ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet: Eine blasige Veränderung der Plasma- und Kernmembran (engl.: „blebbing“), Schrumpfung der Zelle sowie Fragmentierung und Kondensierung des Chromatins. Der physiologische Zelltod mündet in sog. Apoptose-Körper, die von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert werden. Biochemisch lässt sich eine Aktivierung von Proteinasen und endogenen Nukleasen nachweisen (Wagener, 1999).

Schwartz wies in einer Studie nach, dass CP bei 9L-Gliosarkomzellen die mitochondriale, Caspase-9 abhängige Apoptose induziert. Hierbei wurden interessante Aspekte über die Wirkung von CP aufgezeigt:

BCL-2, ein beim „**B-Cell-Lymphoma**“entdecktes Onkogen, das ein Protein kodiert, welches an der zytoplasmatischen Seite der Membranen von Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und Zellkern lokalisiert ist, kann die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien blockieren und damit die Aktivierung der „Initiatorcaspase“, Caspase-9, behindern. BCL-2 kann dadurch alle zytotoxischen Effekte von CP, aber nicht die zytostatische Aktivität verhindern.

BCL-2 exprimierende Zellen, die einen durch CP ausgelösten Arrest in der S-Phase durchmachen, entwickeln sich trotz vorhandener Crosslinks in die G2/M-Phase weiter. Die DNA-Replikation scheint also durch die Crosslinks alleine

nicht entscheidend behindert. Das Zellwachstum wird so zwar reduziert, die Lebensfähigkeit der Zelle bleibt jedoch erhalten.

Die BCL-2 abhängige zytostatische Antwort auf die durch CP induzierte DNA-Schädigung könnte Zellen erlauben, den medikamentös induzierten Zelltod zu umgehen. Wird die Apoptose verhindert, bleibt offensichtlich genug Zeit DNA-Schäden zu reparieren. Wenn diese Zellen dann wieder mit der Zellteilung beginnen, könnte dies zu einer Selektion von nun chemoresistenten Zellen führen. Bei Neuroblastomen, Prostatakarzinom und verschiedenen Leukämien konnte bereits eine Korrelation zwischen BCL-2 Expression und Prognose nachgewiesen werden.

Die BCL-2 Expression und die damit verbundene Fähigkeit, die Aktivierung der Caspase 9 zu blockieren, scheint demnach ein signifikanter Indikator für die Chemoresistenz gegen CP zu sein (Schwartz et al., 2001).

4.6.4 Hypothesenbildung

In den nachfolgend aufgestellten Hypothesen wird versucht zwischen den bisherigen Erkenntnissen über Protein S100A6 und der oben dargestellten Pharmakologie von Cyclophosphamid Verbindungen aufzuzeigen um so erste Ansätze für ein biologisches Modell entwickeln zu können, welches die spezifisch bessere Wirkung einer Cyclophosphamidtherapie (CMF-Chemotherapie) bei positivem S100A6-Status erklären kann.

1. Unspezifischer Einfluss auf die Cyclophosphamid-Wirkung

Für Cyclophosphamid wurde eine erhöhte Aktivität bei niedrigem pH nachgewiesen. Die klassischen Arbeiten von Warburg in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts zeigten, dass Glukose in Krebszellen auch in Gegenwart von Sauerstoff intensiv zu Laktat abgebaut wird (Vaupel et al., 2002).

Wahrscheinlich liegt bei niedrigem extrazellulären pH im Tumorgewebe weniger Phosphoramid Mustard ionisiert vor und kann so leichter die Zellmembran passieren (s.o.). Ein positiver Einfluß von S100A6 auf die Enzymaktivität der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), einem Schlüsselenzym der Glykolyse, könnte eine verstärkte Bildung von NADH_2 zur Folge haben. Bei gleichzeitig bestehender Tumorhypoxie würde dies zu einer Zunahme des während der anaeroben Glykolyse aus Pyruvat gebildeten Laktats führen und das hierbei entstehende relativ saure Milieu auch eine entsprechende Wirkung auf Pharmakokinetik von Cyclophosphamid und seiner Metabolite entfalten.

2. Einfluss auf die Metabolisierung von CP

Möglicherweise könnte die GAPDH als Aldehyd-Dehydrogenase am Abbau von Aldophosphamid in das inaktive Carboxyphosphamid beteiligt sein. Eine Behinderung der Enzymaktivität durch S100A6 in S100A6-positiven Tumoren könnte zu einem verlangsamten Abbau führen und dementsprechend mehr Aldophosphamid in das toxische Phosphoramid Mustard verstoffwechselt werden,

was die Zytotoxizität erhöhen und damit das Ansprechen auf die Therapie verbessern würde.

3. Einfluss auf die Reparaturmechanismen der von Cyclophosphamid verursachten DNA-Schäden

Während der DNS-Replikation wird die Doppelstrang-DNS geöffnet um eine Einzelstrang-Schablone für die Replikationsenzyme, wie z.B. der DNA-Polymerase, bereitzustellen. Diese ssDNS-Zwischenformen werden in vivo durch Einzelstrang-spezifische DNS-bindende Proteine (**s**ingle-**s**trand-**s**pecific DNA-**b**inding proteins, SSB-proteins) umhüllt. GAPDH wurde als ein solches SSB-Protein identifiziert. GAPDH inhibiert durch die Bindung an ssDNS den DNA-Polymerase- α -Primase Komplex (Grosse et al., 1986).

GAPDH könnte als SSB-Protein und Inhibitor des DNA-Polymerase- α -Primase – Komplex die Reparatur der durch PM verursachten DNS-Schädigungen behindern. S100A6 als Bindungspartner der GAPDH könnte die Inhibition dieser vor allem in der G1-Phase durchgeführten Reparaturen (S100A6 wird vor allem in der G1-Phase exprimiert) zusätzlich verstärken. Persistierende DNS-Schäden könnten so zur Überschreitung des Schwellenwertes führen (s.o.), ab dem die Apoptose ausgelöst wird. Dadurch würde ein hoher S100A6-Gehalt in der Zelle zu einer besseren Wirkung des PM führen.

Auch die Annexine I und II, die potentielle Bindungspartner von S100A6 darstellen, könnten an der Reparatur der von PM verursachten DNA-Schäden beteiligt sein.

Annexin I und S100A6 bilden ein Heterotetramer im Bereich der inneren Kernmembran und entwickeln nach Anlagerung von Doppelstrang-DNS Helicase-Aktivität.

Interessant ist die Funktion von Annexin II als Teil eines „primer recognition proteins“ (PRP), das die Aktivität der DNA-Polymerase α stimuliert. Das PRP der Plazenta besteht aus zwei Untereinheiten, PRP1 (Annexin II) und PRP2 (3-

Phosphoglycerat-Kinase) (Jindal, et al. 1990). Bemerkenswert ist außerdem, dass im Rahmen der Glykolyse die über die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (s.o.) gebildete 1,3-Diphosphoglycerinsäure das direkte Substrat der Phosphoglycerat-Kinase (PRP2) ist, welche diese in 3-Phosphoglycerinsäure umwandelt.

S100A6 könnte also sowohl über die GAPDH, als auch über die Annexine I und II auf DNA-Reparaturmechanismen Einfluß nehmen, bzw. diese behindern und damit den verstärkten Eintritt in die Apoptose bewirken.

4. Einfluss auf die Induktion der Apoptose

Eine supraphysiologische Ca^{++} -Konzentration gilt als proapoptotische Faktor im Rahmen der Übertragung des Apoptose-Signals vom „DNA-geschädigten“ Zellkern auf das Mitochondrium. S100A6 als Ca^{++} bindendes Protein könnte an dieser Signal-Übertragung beteiligt sein.

Eine Verbindung zwischen S100A6 und BCL-2 konnte bisher jedoch noch nicht aufgezeigt werden (siehe S.119). Desweiteren scheint BCL-2 auch die Wirkung anderer Zytostatika, wie zum Beispiel Adriamycin, zu beeinflussen (Piche et al., 1998), sodass eine Verbindung zu S100A6, das in unserer Studie ja nur eine Relevanz im Zusammenhang mit der CMF-Chemotherapie zeigt, schwer erklärbar ist.

Eine Verbindung von S100A6 zur Apoptose wurde bisher lediglich in Zusammenhang mit ALG-2 (apoptosis-linked-gene 2) nachgewiesen:

Das Penta-EF-Hand-Protein ALG-2, ein erst kürzlich identifizierter Ligand von Annexin 11, wird im Zellkern exprimiert (vgl. S.18). Die Bindungsstellen von ALG-2 und S100A6 an Annexin 11 sind am N-terminalen Ende lokalisiert. Das könnte bedeuten, dass, abhängig von der subzellulären Lokalisation und der verfügbaren Ca^{++} -Ionenkonzentration, S100A6 und ALG2 miteinander als Liganden von Annexin 11 konkurrieren und dessen Eigenschaften modulieren.

Bei Inhibierung der ALG-2 Expression werden Zellen vor der durch verschiedene Stimuli induzierten Apoptose bewahrt (Chatellard-Causse C et al., 2002).

ALG2 scheint eher eine Rolle in der Auslösung des durch Stress am endoplasmatischen Retikulum vermittelten Zelltodes zu spielen (Rao RV et al., 2004).

5. S100A6 als Marker für Tumoren, die aus der basalen, myoepithelialen Zellschicht stammen, als biologische und klinische Subklasse der Mammakarzinome

Auf S. 70 dieser Arbeit wurde bereits beschrieben, dass S100A6 in normalen Drüsengängen die myoepitheliale Zellschicht markiert. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass entsprechend der Abstammung der Tumorzellen von bestimmten Zellschichten unterschiedliche biologische und klinische Subklassen abgegrenzt werden können (s. S111) (Kesse-Adu et al., 2004, Abd El-Rehim et al., 2004 und Sørli et al., 2003).

Sollte ein besonders gutes Ansprechen einer CMF-Chemotherapie auf Mammakarzinome für jenen Subtyp nachgewiesen werden können, der aus der basalen, myoepithelialen Schicht stammt, könnte die Verbindung zu S100A6 auch lediglich in der Markierung einer besonders empfindlichen Subklasse bestehen, ohne dass ein direkter molekularbiologischer oder biochemischer Zusammenhang bestehen müsste.

Matthew Ellis vom Siteman Cancer Center in Washington stellte in einem Vortrag auf dem "Global breast cancer summit" 2004 in Montreux folgende Thesen auf: Bei Behandlung von 3 Subklassen der duktaalen Mammakarzinome sprechen die Luminal A Zellen gut auf eine endokrine Therapie und die myoepitheliale Zellschicht gut auf eine CMF-Chemotherapie an, während die Luminal B Zellen weitgehend Therapie resistent erscheinen.

5.7 S100A6 als Marker für den Metastasierungsort

In Kapitel 3.3.9 wurde gezeigt, dass S100A6 **negative** Tumoren überzufällig häufig ossär metastasieren.

Funke et al. zeigten in einer Studie, dass beim Mammakarzinom (im Gegensatz zum Magenkarzinom) im Knochenmark nachweisbare Mikrometastasen signifikant häufig E-Cadherin-positiv (71,2%, $p=0,008$) sind (Funke et al., 1996). Eine Verbindung zu S100A6 könnte in der Interaktion mit CacyBP und dessen Wirkung auf die β -Catenin Degradation bestehen. β -Catenin hat als Bindglied zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett Einfluss auf die E-Cadherin Expression und damit im Umkehrschluss möglicherweise auch auf die ossäre Metastasierung (s.a. 1.1.5).

Auch hier zeigt sich übrigens wieder das umgekehrt proportionale Verhältnis zum Östrogenrezeptor: Postmenopausale Frauen mit hormonrezeptor-**positiven** Tumoren neigen eher zur Ausbildung von Skelettmetastasen.

Eine Prädiktion der tumorspezifischen Metastasierungswahrscheinlichkeit könnte klinische Einsatzmöglichkeiten wie das gezielte postoperative Screening in der Tumornachsorge sowie die prophylaktische Bisphosphonattherapie bei einer wahrscheinlich erfolgenden Knochenmetastasierung bieten (Münstedt et al., 1997).

Die Untersuchung der physiologischen Bedeutung der Interaktion zwischen S100A6 und CacyBP sowie die Bestimmung des S100A6-Status in Metastasen und der Vergleich mit der Ausprägung in den zugehörigen Primärtumoren könnte die Evaluierung dieser Hypothese unterstützen.

5.8 Ausblick

Seit etwa 5 Jahren hat die anthrazyklinhaltige Chemotherapie das CMF-Schema als Standardtherapie beim Mammakarzinom endgültig verdrängt.

Die im September 2000 aktualisierte Metaanalyse der Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) zeigt einen Vorteil für anthrazyklinhaltige Chemotherapieschemata bezüglich der Reduktion des Rezidivrisikos und der Mortalität gegenüber CMF. Dieser Vorteil besteht für mindestens 10 Jahre und führt bei nodal-positiven Patientinnen zu einer absoluten Verbesserung der Rezidivrate und der Mortalität um 4%. Interessanterweise konnte der Vorteil der anthrazyklinhaltigen Chemotherapie nur dann nachgewiesen werden, wenn eine Kombination aus drei Zytostatika angewandt wurde (entweder CEF oder CAF) (EBCTCG, 2000).

Die NSABP B23 Studie verglich bei 2008 nodal-negativen Patientinnen vier Zyklen AC mit sechs Zyklen CMF. Nach 5 Jahren gab es keine Unterschiede bezüglich des krankheitsfreien (82,9% vs. 82,7%) oder Gesamtüberlebens (90,2% vs. 88,5%) (Fisher et al., 2000).

Die Vorteile für die gesamte Patientenpopulation sind also nur mäßig stark ausgeprägt, insbesondere bei Patientinnen mit einem durchschnittlichen Risiko. Diese Vorteile müssen zudem gegenüber einer erhöhten Kurz- und Langzeittoxizität abgewogen werden (Piccart et al., 2002).

Protein S100A6 könnte als prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer CMF-Chemotherapie in der Gruppe der S100A6-positiven Patientinnen den Vorteil der Anthrazykline aufheben. Eine Überprüfung der aufgestellten Hypothesen, die Erstellung eines schlüssigen biologischen Modells und eine prospektive Studie zur statistischen Evaluierung müssen folgen um die Wertigkeit der S100A6 Bestimmung im Rahmen der systemischen Therapie des Mammakarzinoms endgültig aufzeigen zu können.

1996 gab Richard Klausner, Direktor des „National Cancer Institute“ der USA im JNCI folgendes Statement zur Initiierung des „Cancer Genome Anatomy Projects“ ab: „Right now we lump patients together and treat them with the same drugs and then deal with their variable response to treatment. We are essentially treating different diseases with the same medicine“. Dies stimmt zweifelsohne, die Individualisierung von Chemotherapien ist jedoch realisierbar. (Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms, State of the art 2002, S. 324). Protein S100A6 könnte hierzu einen wichtigen Beitrag leisten.

6. Zusammenfassung (Abstract)

S100A6 ist ein Mitglied der Protein S100-Familie, die Ca^{++} -Ionen binden können. Seit bei verschiedenen malignen Tumoren (z.B. Melanom und Colonkarzinom) eine Überexpression dieses Proteins mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gesetzt werden konnte, ist S100A6 mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Die Bedeutung von S100A6 in Zusammenhang mit dem Mammakarzinom konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

In einer retrospektiven Studie wurde bei 266 Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt waren, immunhistochemisch die Expression von S100A6 analysiert. Aus dem Produkt aus Färbungsintensität (SI) und prozentualem Anteil gefärbter Zellen (PP) wurde eine immunreaktiver Score (IRS) ermittelt, der den S100A6-Gehalt im Tumor widerspiegelt. Anschließend wurde der IRS-Schwellenwert (Cut-off) ermittelt, unter dem sich die nach Kaplan-Meier berechneten Überlebenskurven am signifikantesten unterschieden. Ein IRS von 0 oder 1 wurde danach mit dem Status „S100A6 negativ“, ein IRS von 2 bis 12 mit dem Status „S100A6 positiv“ beurteilt.

Die Auswertung erfolgte in drei Auswertungsreihen. In der für die weiteren Berechnungen herangezogenen Auswertungsreihe 2 wurden 78 Patientinnen (29,3 %) als "S100A6 negativ", 188 Patientinnen (70,7 %) als "S100A6 positiv" bewertet.

Zur Bestimmung der Intraobservervariabilität wurden die zwei durch den Doktoranden ermittelten Auswertungsreihen verglichen, zur Bestimmung der Interobservervariabilität wurden die Auswertungsreihen des Doktoranden mit der Auswertungsreihe eines Experten (Facharzt für Pathologie) verglichen. Die sehr geringe Intra- und Interobservervariabilität zeigt, dass die Bestimmung des S100A6-Status einfach erlernbar und sicher reproduzierbar ist.

Im Ergebnis konnte keine Korrelation zwischen den klassischen Prognosefaktoren Tumorgroße, Nodal- und Metastasenstatus, sowie des histopathologischen Gradings nachgewiesen werden. Östrogen- und Progesteron-positive Tumoren sowie lobuläre Karzinome waren jedoch signifikant häufig S100A6 negativ.

Im Gegensatz zu anderen Karzinomen konnte in unserer Studie für das Mammakarzinom sowohl im Gesamtkollektiv, als auch in den verschiedenen Subgruppen keine signifikante prognostische Relevanz für S100A6 nachgewiesen werden. Es zeigte sich lediglich eine durchgehend schlechtere Tendenz für die S100A6 **negative** Gruppe.

Überraschend eindeutig zeigte sich eine Signifikanz für S100A6 als prädiktivem Faktor für das Ansprechen einer CMF-Chemotherapie ($p=0,011$). Patientinnen mit einem **negativen** S100A6-Status im Tumorgewebe hatten ein deutlich kürzeres Rezidiv-freies- und Gesamtüberleben als S100A6-positive Patientinnen. Radiotherapie, Tamoxifentherapie und anthrazyklinhaltige Chemotherapien zeigten demgegenüber bezüglich der Prognose keine Abhängigkeit vom S100A6-Status.

Ebenso konnte eine signifikant häufigere ossäre Filialisierung bei S100A6 **negativen** Tumoren festgestellt werden.

Ein schlüssiges biologisches Modell für die Funktion von S100A6 im Rahmen der CMF-Chemotherapie und der ossären Metastasierung konnte noch nicht aufgezeigt werden, jedoch wurden erste Hypothesen formuliert, deren weitere Untersuchung einen wichtigen Schritt zur Individualisierung der systemischen Therapie des Mammakarzinoms beitragen könnten.

Abb.1: Normaler Ductus lactiferus: Zweiseichtiges Epithel

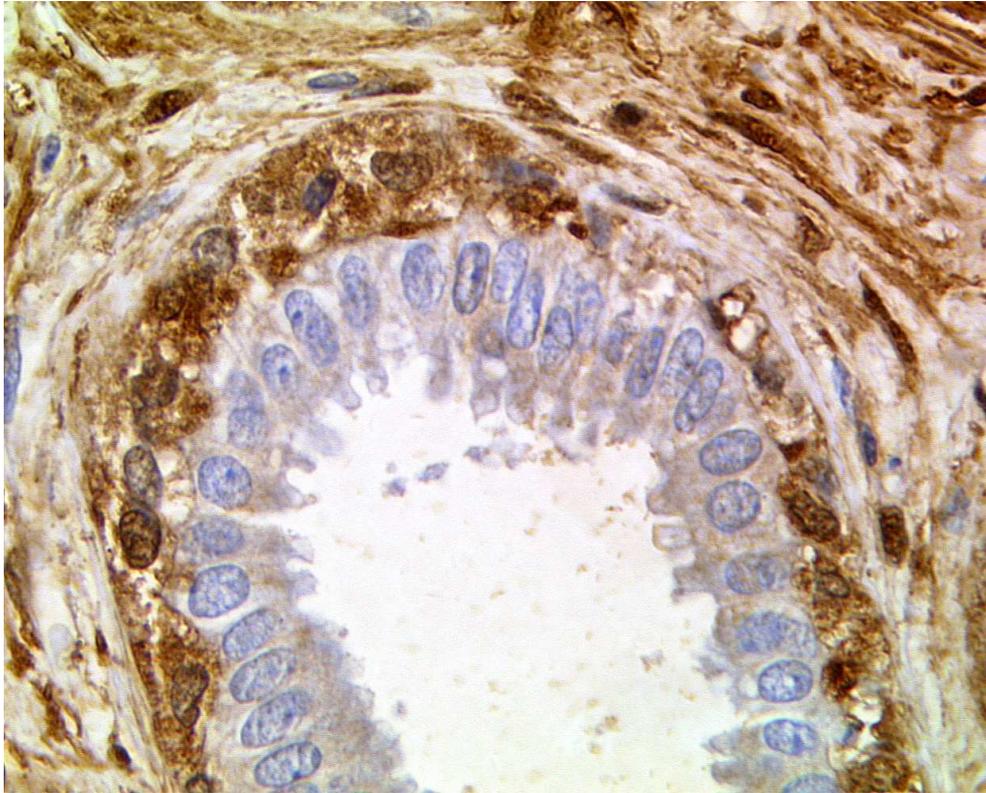


Abb.2: Normaler Ductus lactiferus: Zweiseichtiges Epithel

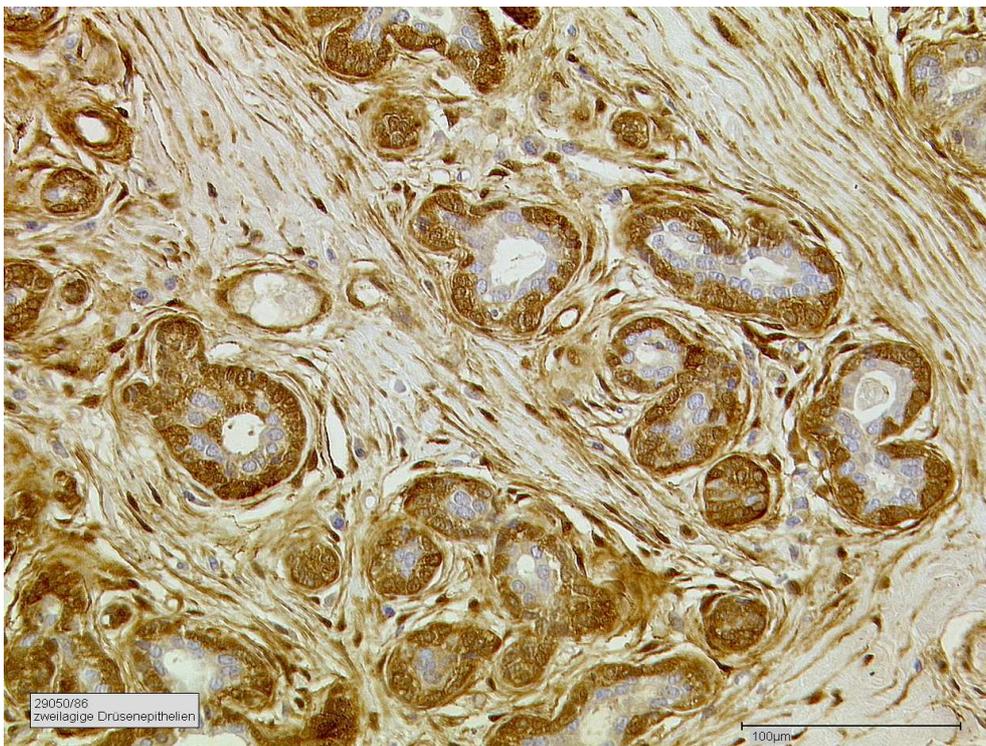


Abb.3: Normale Drüsenalveolen: Schichtung aufgehoben

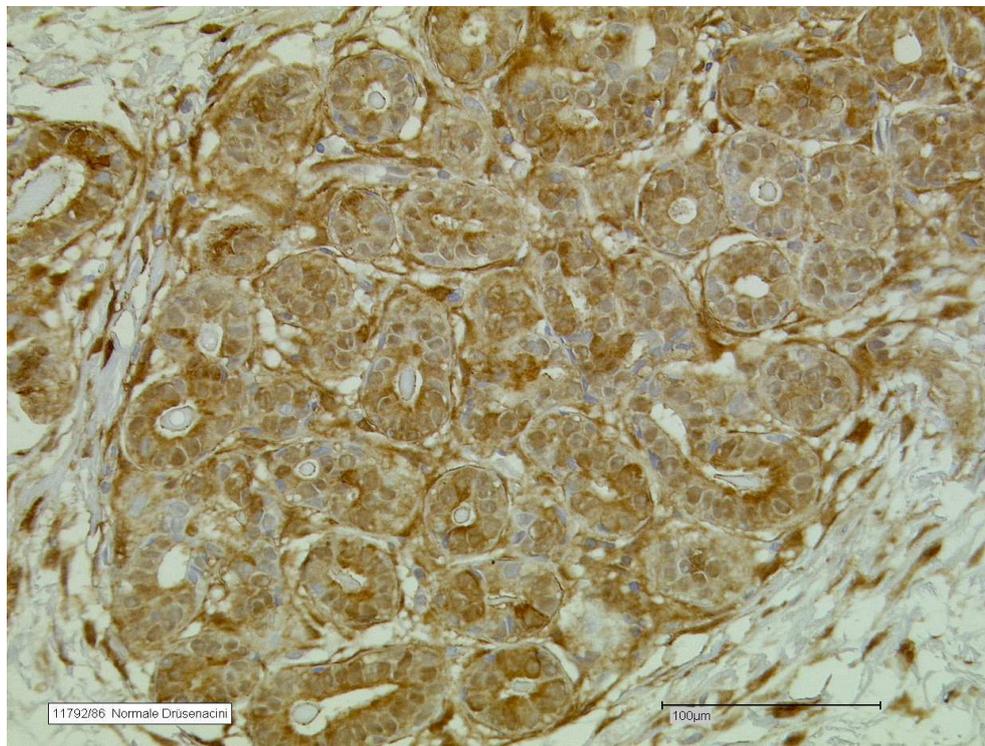


Abb.4: Mammakarzinom: S100A6 Färbintensität Grad 3

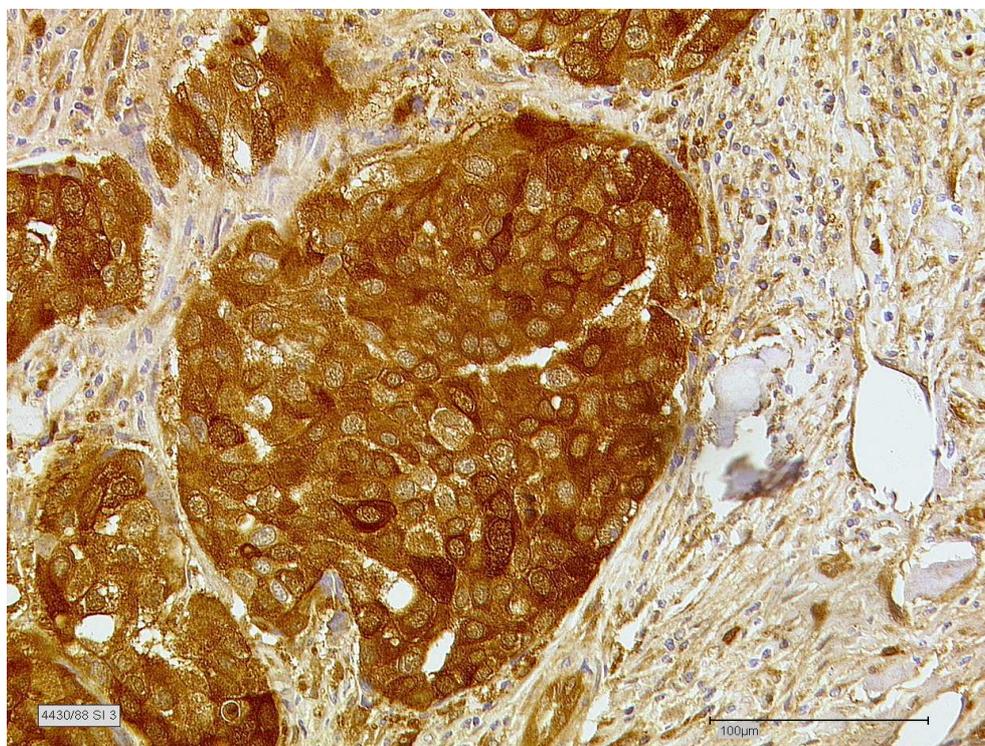


Abb.5: Mammakarzinom: S100A6 Färbeintensität Grad 2

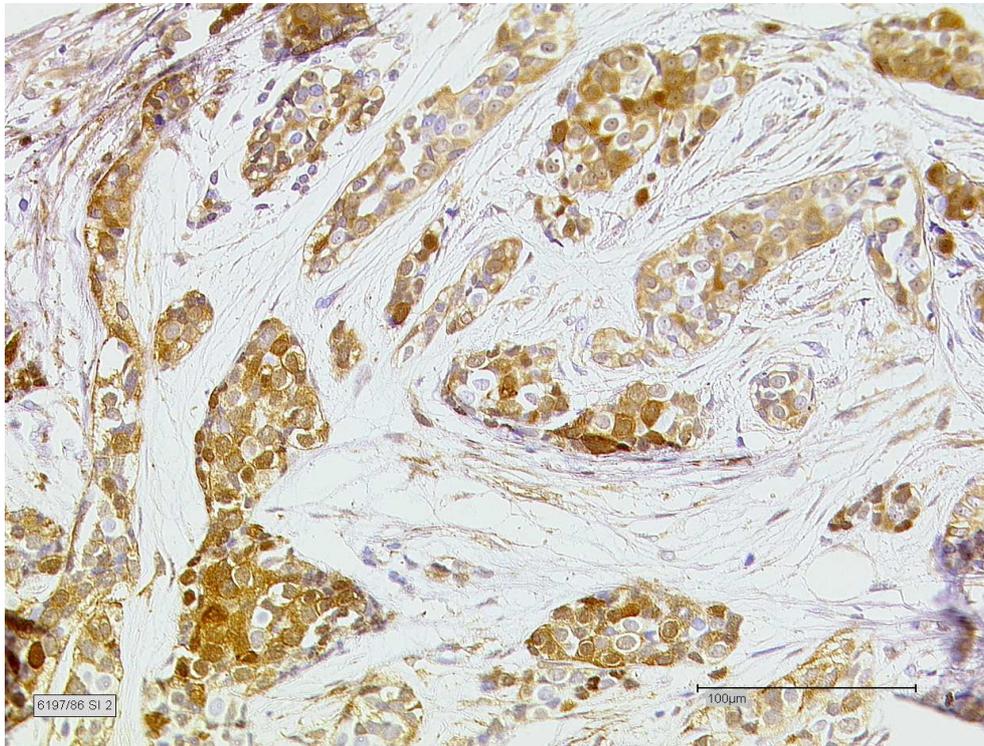


Abb.6: Mammakarzinom: S100A6 Färbeintensität Grad 1

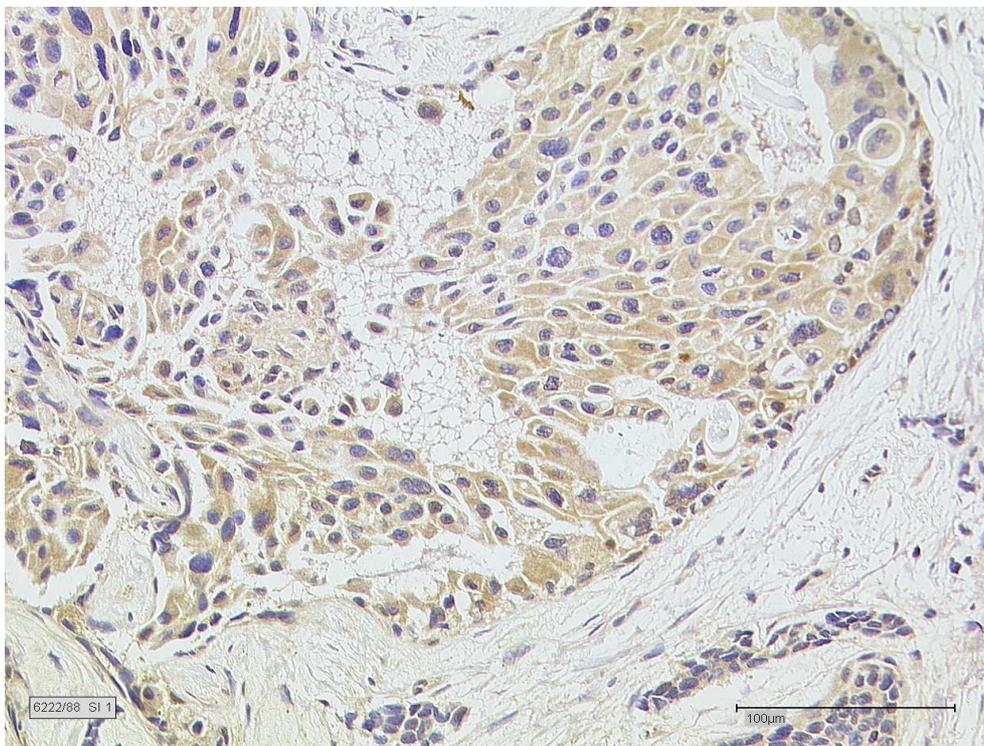


Abb.7: Mammakarzinom: Färbeintensität S100A6 Grad 0

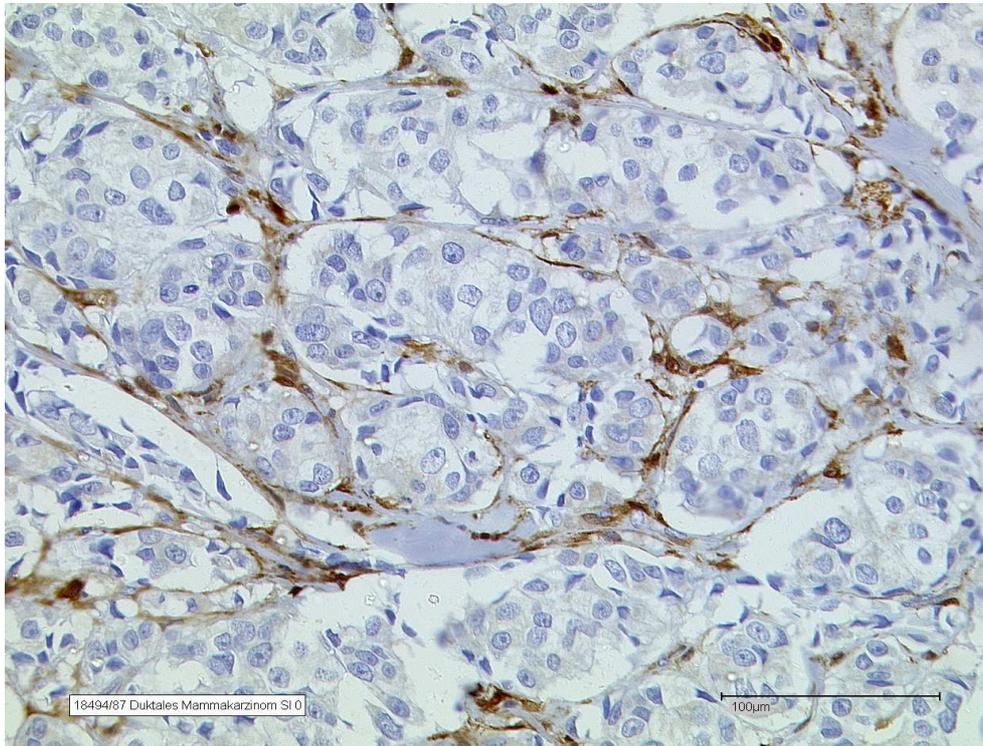


Abb.8: Duktales Mammakarzinom: Gleiches Präparat, zwei Tumorpopulationen

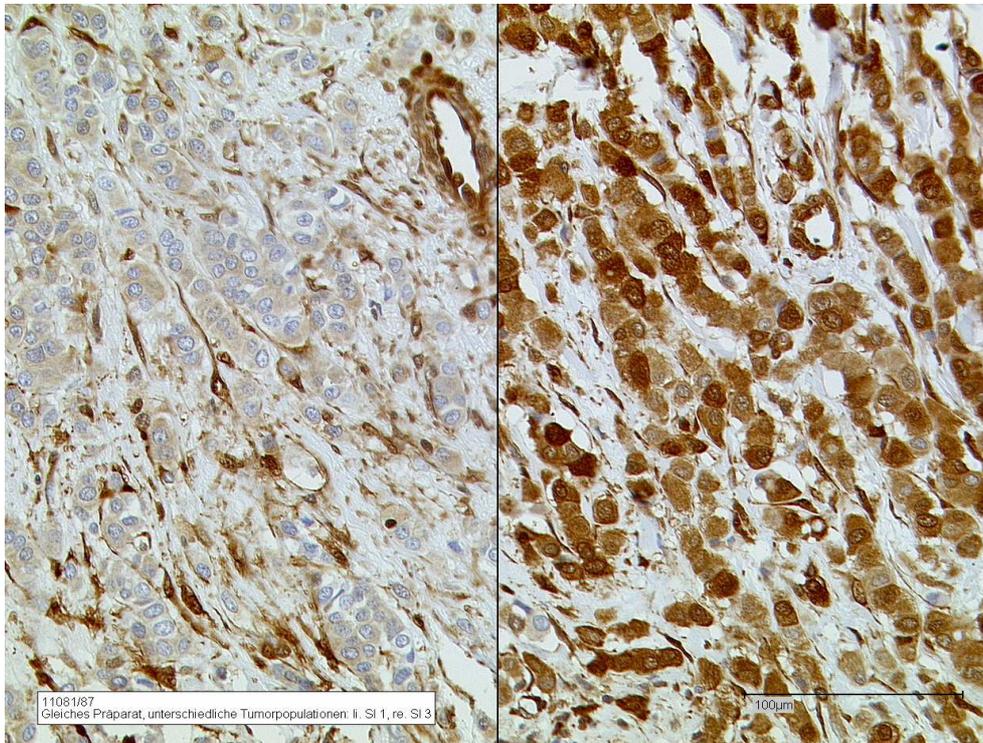


Abb.9: Verschiedene Färbeintensitäten nebeneinander (1:SI 1 / 2: SI 2 / 3: SI 3)

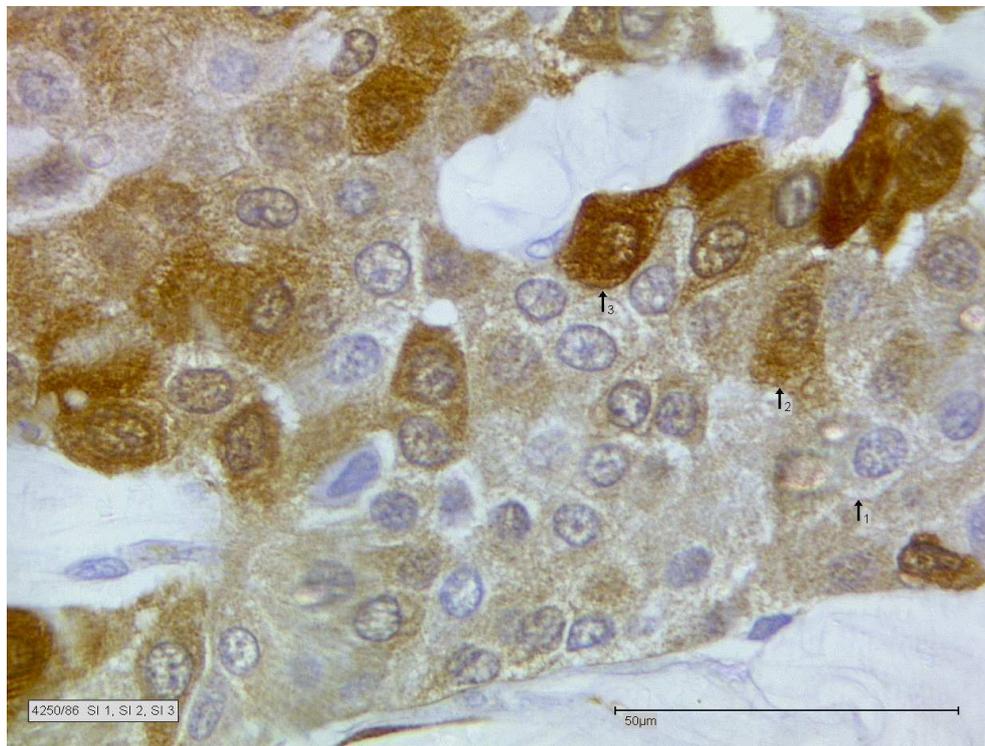
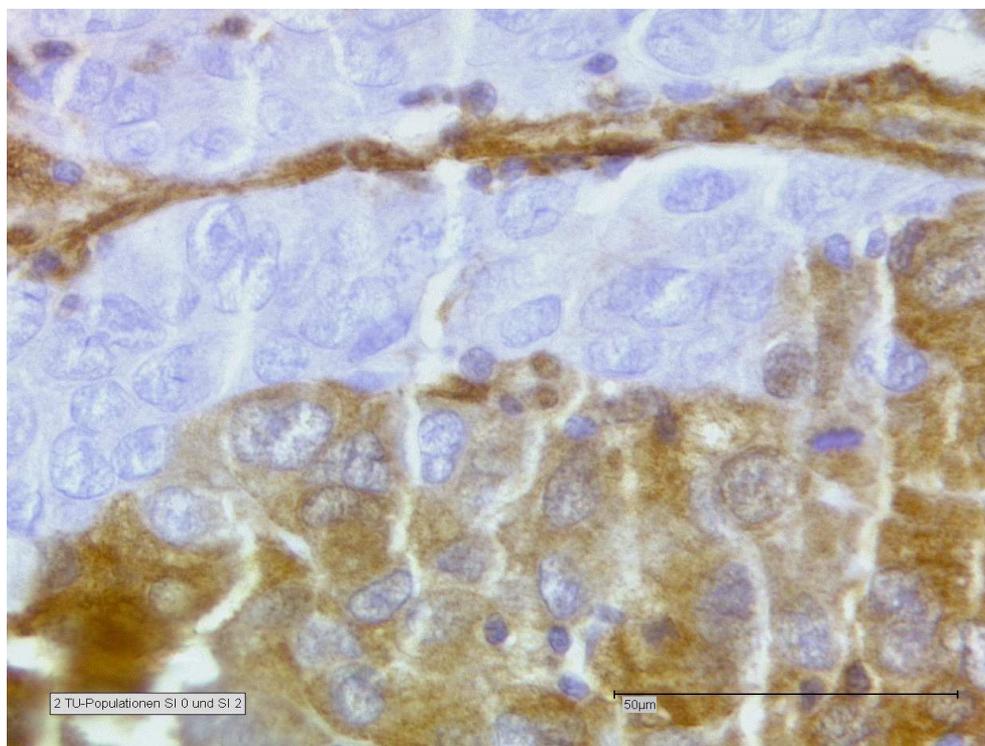


Abb.10: Zwei aneinandergrenzende Tumorpopulationen: SI 0 und SI 2



Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach der UICC

Die Klassifikation durch das TNM-System erlaubt eine genügend präzise Beschreibung und Dokumentation der anatomischen Ausdehnung der Erkrankung. Bei 4 Kategorien von T, 3 Kategorien von N und 2 Kategorien von M stehen 24 TNM-Kategorien zur Verfügung. Wenn keine großen Fallzahlen vorliegen, ist es für die Tabellierung und die Analyse notwendig, diese Kategorien in eine günstige Anzahl von TNM-Stadien zusammenzufassen.

Die Stadiengruppierung soll so gut wie möglich sicherstellen, dass jede Gruppe in sich in bezug auf die Überlebensrate mehr oder weniger homogen ist und dass sich für die jeweiligen Krebslokalisation die Überlebensraten verschiedener Gruppen unterscheiden (Wittekind et al, 1997).

Vor allem die Einteilung des Lymphknotenstatus hat sich mit der 6. Auflage, 2002, des TNM-Systems stark verändert. Da die Dokumentation des TNM-Stadiums in der für die vorliegende Dissertation verwendeten Datenbank noch nach den alten Vorgaben erfolgt war, wurde für die Auswertung die Einteilung der 5. Auflage von 1997 verwendet:

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
Stadium IIIB	T4	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABC	A vidin B iotin Peroxidase C omplex
ADH	A ntidiuretisches H ormon
ADP	A denosindiphosphat
APAF	A popotosis A ctivating F actor-1
AQP	A quaporin
ATP	A denosintriphosphat
BCL-2	beim B-Cell-Lymphoma entdecktes Onkogen
Ca	C alcium
CacyBP	C alcyclin b inding p rotein
CARD	C aspase R ecruiting D omain
CHT	C hemotherapie
CP	C yclophosphamid
CYP	C ytochrom P
DAB	D iaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DFS	D isease f ree s urvival (rezidivfreies Überleben)
DNA	D esoxyribonuklein a cid
DNS	D esoxyribonukleinsäure
DSB	D ouble s trand b reak (Doppelstrangbruch)
DXR	D oxorubicin
EGF	E pidermal g rowth f actor
ER	e strogen r eceptor / Ö strogenrezeptor
ex	e xcluded
FM	F ernmetastase
GAPDH	G lyceraldehyd-3- P osphat- D ehydrogenase
GTP	G uanosintriphosphat
HGF	H epatocyte g rowth f actor
in	i ncluded
IRS	I mmunreaktiver S core
kDA	K ilo- D alton
Lat.	lateinisch
LR	L okalrezidiv

MET	Rezeptor für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (leitet sich von METHyl ab)
Mg	M agnesium
mM	M illimol
mRNA	m essenger ribo nukleinacid
NAD	N icotinamid- a denin- d inukleotid
OS	O verall s urvival (Gesamtüberleben)
PAF	P latelet a ctivating f actor
PAI-1	P lasminogenaktivator I nhibitor
PDGF	P lateled d erived g rowth f actor
PGE2	P rostaglandin E 2
PM	P hosphoramid M ustard
PostMP	p ostmenopausal
PP	P rozentsatz p ositiver Zellen
PR	p rogesterone r eceptor
PraeMP	p rämenopausal
SD	S tandard D eviation
SI	s taining i ntensity
SRC	Onkogen des Rous-Sarkom-Virus (für SaRC oma)
TAM	T amoxifen
TGF	T ransforming g rowth f actor
tPA	t issue p lasminogen a ctivator
UICC	International Union Against Cancer
ÜLZ	Ü berlebenszeit
uPA	P lasminogenaktivator vom U rokinase-Typ
Zn	Z ink

Literaturverzeichnis

1. **Abd El-Rehim DM**, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO. (2004)
Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004 Jun;203(2):661-71.
2. **Allen BG**, Andrea JE, Sutherland C, Schonekess BO, Walsh MP. (1997)
Molecular cloning of chicken calyculin (S100A6) and identification of putative isoforms. *Biochem Cell Biol.* 1997;75(6):733-8.
3. **American Cancer Society** (1995)
Cancer Facts and Figures
4. **Bazan HE**, Allan G, Bazan NG. (1992)
Enhanced expression of the growth-regulated calyculin gene during corneal wound healing. *Exp Eye Res.*: 55(1):173-7.
5. **Berta GN**, Ghezzi F, D'Avolio A, Zulian P, Carbone V, Racca S, Vercellino V, Di Carlo F. (1997)
Enhancement of calyculin gene RNA expression in squamous cell carcinoma of the oral mucosa, but not in benign lesions. *J Oral Pathol Med.* 1997 May;26(5):206-10.
6. **Bohnenstengel F**, Friedel G, Ritter CA, McClellan M, Fritz P, Eichelbaum M, Linder A, Toomes H, Dierkesmann R, Kroemer HK. (2000)
Variability of cyclophosphamide uptake into human bronchial carcinoma: consequences for local bioactivation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;45(1):63-8.
7. **Boyd J**, Risinger JI, Wiseman RW, Merrick BA, Selkirk JK, Barrett JC (1995)
Regulation of microfilament organization and anchorage-independent growth by tropomyosin 1
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, 11534-11538
8. **Breen EC**, Fu Z, Normand H (1999)
Calyculin Gene Expression Is Increased by Mechanical Strain in Fibroblasts and Lung
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.: 21, 746-752

9. **Burgoyne RD**, Geisow MJ (1989)
The annexin family of calcium-binding proteins.
Cell Calcium: 10 (1): 1-10
10. **Busse D**, Kroemer HK, Sperker B, Murdter TE. (1998)
[Treatment of cancer with cytostatics: results with high dose therapy with cyclophosphamide and drug targeting with doxorubicin]
Pharm Unserer Zeit. 1998 Sep;27(5):216-22. Review. German.
11. **Cai Y**, Ludeman SM, Wilson LR, Chung AB, Dolan ME. (2001)
Effect of O6-benzylguanine on nitrogen mustard-induced toxicity, apoptosis, and mutagenicity in Chinese hamster ovary cells.
Mol Cancer Ther. 2001 Nov;1(1):21-8.
12. **Calabretta B**, Battini R, Kaczmarek L, de Riel JK, Baserga R. (1986)
Molecular cloning of the cDNA for a growth factor-inducible gene with strong homology to S-100, a calcium-binding protein.
J Biol Chem.: 261(27):12628-32
13. **Carter D** (1984)
Interpretation of Breast Biopsies
Raven Press, New York
14. **Chambers AF**, Tuck AB. (1993)
Ras-responsive genes and tumor metastasis.
Crit Rev Oncog. 1993;4(2):95-114. Review
15. **Chan KK**, Hong PS, Tutsch K, Trump DL. (1994)
Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites with and without SR-2508.
Cancer Res. 1994 Dec 15;54(24):6421-9.
16. **Chatellard-Causse C**, Blot B, Cristina N, Torch S, Missotten M, Sadoul R. (2002)
Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization.
J Biol Chem. 2002 Aug 9;277(32):29108-15. Epub 2002 May 28.
17. **Chen L**, Waxman DJ. (1995)
Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy.
Cancer Res. 1995 Feb 1;55(3):581-9.

- 18. Chow V**, Yuen APW, Lam KY, Tsao GSW, Ho WK, Wei WI. (2001)
A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (α, β, γ) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma.
J Cancer Res Clin Oncol.: 127: 59-63
- 19. Colvin M**, Brundrett RB, Kan MN, Jardine I, Fenselau C. (1976)
Alkylating properties of phosphoramidate mustard.
Cancer Res. 1976 Mar;36(3):1121-6
- 20. Courtois-Coutry N**, Le Moellic C, Boulkroun S, Fay M, Cluzeaud F, Escoubet B, Farman N, Blot-Chabaud M (2002)
Calcyclin Is an Early Vasopressin-induced Gene in the Renal Collecting Duct
J Biol Chem, 277 (28), 25728-25734
- 21. Domeyer BE**, Sladek NE. (1980)
Kinetics of cyclophosphamide biotransformation in vivo.
Cancer Res. 1980 Jan;40(1):174-80
- 22. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group** (2000)
2000analysis overview results.
Fifth meeting of the Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.
Oxford, UK
- 23. Ellis M**, Ballman K. (2004)
Trawling for genes that predict response to breast cancer adjuvant therapy.
J Clin Oncol. 2004 Jun 15;22(12):2267-9. Epub 2004 May 10.
- 24. Engelkamp D**, Schafer BW, Mattei MG, Erne P, Heizmann CW (1993)
Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E.
Proc Natl Acad Sci U S A.: 90(14):6547-51
- 25. Ferrari S**, Calabretta B, deRiel JK, Battini R, Ghezzi F, Lauret E, Griffin C, Emanuel BS, Gurrieri F, Baserga R (1987)
Structural and functional analysis of a growth-regulated gene, the human calcyclin.
J Biol Chem 262, 8325-8332

- 26. Ferrari S**, Calabretta B, Selleri L, Ceccherelli G, Torelli G, Torelli U, (1988)
Expression of oncogenes and cell cycle related genes in acute and chronic leukemias.
Leukemia 2 (12 Suppl): 160S-166S
- 27. Filipek A**, Gerke V, Weber K, Kuznicki J (1991)
Characterization of cell-cycle-regulated protein calyculin from Ehrlich ascites tumor cells. Identification of two binding proteins obtained by Ca^{2+} - dependent affinity chromatography
Eur. J. Biochem. 195, 795-800
- 28. Filipek A**, Jastrzebska B, Nowotny M, Kuznicki J (2002)
CacyBP/SIP, a calyculin and siah-1 interacting protein binds EF-hand proteins of the S100 family
J. Biol. Chem.: epub (ahead of print)
- 29. Filipek A**, Kuznicki J. (1998)
Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calyculin.
J Neurochem.: 70(5):1793-8
- 30. Filipek A**, Puzianowska M, Cieslak B, Kuznicki J, (1993)
Calyculin - Ca^{2+} -binding protein homologous to glial S-100-beta is present in neurones
Neuroreport 4, 383-386
- 31. Fisher B**, Anderson S, Redmond cK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. (1995)
Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total Mastectomy with Lumpectomy with or without Irradiation in the treatment of breast cancer
N Engl J Med; 333 (22), 1456-1461
- 32. Fisher B**, Anderson S, Wolmark N et al (2000)
Chemotherapy with or without tamoxifen for patients with ER-negative breast cancer and negative nodes: results from NSABP B23.
Pro ASCO 19: 72a, at 277
- 33. Fullen DR**, Reed JA, Finnerty B, McNutt NS. (2001)
S100A6 expression in fibrohistiocytic lesions.
J Cutan Pathol. 2001 May;28(5):229-34.

- 34. Funke I, Fries S, Rolle M, Heiss MM, Untch M, Bohmert H, Schildberg FW, Jauch KW. (1996)**
Comparative analysis of bone marrow micrometastases in breast and gastric cancer
Int J Cancer 1996 Mar 15; 65(6): 755-761
- 35. Funke I, Untch M, Mayer B, Schraut W, Schildberg F-W (2002)**
Prospektive Studie zur prognostischen Wertigkeit der minimal residualen Tumorerkrankung beim Mammakarzinom
in: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms - State of the Art - W. Zuckerschwerdt Verlag München, ISBN 3-88603-794-0, S. 249 – 255
- 36. Ghezso F, Valpreda S, De Riel JK, Baserga R. (1989)**
Identification of serum-responsive elements in the promoter of human calyculin, a growth-regulated gene.
DNA: 8(3):171-7
- 37. Golitsina NL, Kordowska J, Wang CL, Lehrer SS (1996)**
Ca²⁺-dependent binding of calyculin to muscle tropomyosin.
Biochem Biophys Res Commun. 1996 Mar 18;220(2):360-5.
- 38. Grosse F, Nasheuer HP, Scholtissek S, Schomburg U. (1986)**
Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase-alpha-primase complex.
Eur J Biochem. 1986 Nov 3;160(3):459-67.
- 39. Harvey JM, de Klerk NH, Sterrett GF. (1992)**
Histological grading in breast cancer: interobserver agreement, and relation to other prognostic factors including ploidy.
Pathology 1992 Apr; 24(2): 63-8
- 40. Hassan M, Svensson US, Ljungman P, Bjorkstrand B, Olsson H, Bielenstein M, Abdel-Rehim M, Nilsson C, Johansson M, Karlsson MO. (1999)**
A mechanism-based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide autoinduction in breast cancer patients.
Br J Clin Pharmacol. 1999 Nov;48(5):669-77
- 41. Heizmann CW, Cox JA. (1998)**
New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family.
Biometals.: 11(4):383-97. Review.

- 42. Heizmann CW.** (2002)
The multifunctional S100 protein family.
Methods Mol Biol. 2002;172:69-80. Review
- 43. Henson DE,** Ries L, Freedman LS, Carriaga M. (1991)
Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis of a prognostic index.
Cancer 1991 Nov 15;68 (10): 2142-9
- 44. Hirata A,** Hirata F (2002)
DNA Chain Unwinding and Annealing Reactions of Lipocortin (Annexin) I Heterotetramer: Regulation by Ca^{2+} and Mg^{2+}
Biochem Biophys Res Commun.: 291: 205-09.
- 45. Hoyaux D,** Alao J, Fuchs J, Kiss R, Keller B, Heizmann CW, Pochet R, Frermann D. (2000)
S100A6, a calcium- and zinc-binding protein, is overexpressed in SOD1 mutant mice, a model for amyotrophic lateral sclerosis.
Biochim Biophys Acta. 2000 Dec 20;1498(2-3):264-72.
- 46. Hsieh HL,** Schafer BW, Cox JA, Heizmann CW. (2002)
S100A13 and S100A6 exhibit distinct translocation pathways in endothelial cells.
J Cell Sci. 2002 Aug 1;115(Pt 15):3149-58.
- 47. Hsu SM,** Raine L. (1981)
Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry.
J Histochem Cytochem 29:1349-1353
- 48. Ilg EC,** Schafer BW, Heizmann CW. (1996)
Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors.
Int J Cancer.: 68(3):325-32.
- 49. Jindal HK,** Chaney WG, Anderson CW, Davis RG, Vishwanatha JK. (1990)
The Protein-Tyrosine Kinase substrate, Calpactin I heavy chain (p36), is part of the Primer Recognition Protein Complex that interacts with DNA Polymerase α
J Biol Chem. 266, (8): 5169-5176
- 50. Joo JH,** Kim JW, Lee Y, Yoon SY, Kim JH, Paik SG, Choe IS. (2003)
Involvement of NF-kappaB in the regulation of S100A6 gene expression in human hepatoblastoma cell line HepG2.
Biochem Biophys Res Commun. 2003 Jul 25;307(2):274-80

51. **Kesse-Adu R**, Shousha S. (2004)
Myoepithelial markers are expressed in at least 29% of oestrogen receptor negative invasive breast carcinoma.
Mod Pathol. 2004 Jun;17(6):646-52.
52. **Kim J**, Hajjar KA (2002)
Annexin II: A Plasminogen-Plasminogen Activator Co-Rezeptor
Front Biosci 2002 February 1;7:d341-348
53. **Kligman D**, Hilt DC. (1988)
The S100 protein family.
Trends Biochem Sci.: 13(11):437-43
54. **Knabbe C**. (1994)
Hormonelle Regulation von TGF- β in Mammakarzinomzellen.
Habilitationsschrift, Universität Hamburg
55. **Komatsu K**, Andoh A, Ishiguro S, Suzuki N, Hunai H, Kobune-Fujiwara Y, Kameyama M, Miyoshi J, Akedo H, Nakamura H (2000)
Increased Expression of S100A6 (Calcyclin), a Calcium-binding Protein of the S100 Family, in Human Colorectal Adenocarcinomas
Clin. Cancer Res.: 6, 172-177
56. **Komatsu K**, Kobune-Fujiwara, Andoh A, Ishiguro S, Hunai H, Suzuki N, Kameyama M, Murata K, Miyoshi J, Akedo H, Tatsuta M, Nakamura H. (2000)
Increased expression of S100A6 at the invading fronts of the primary lesion and liver metastasis in patients with colorectal adenocarcinoma
Br. J. Cancer, 83 (6), 769-774
57. **Komatsu K**, Murata K, Kameyama M, Ayaki M, Mukai M, Ishiguro S, Miyoshi J, Tatsuta M, Inoue M, Nakamura H. (2002)
Expression of S100A6 and S100A4 in Matched Samples of Human Colorectal Mucosa, Primary Colorectal Adenocarcinomas and Liver Metastases.
Oncology. 2002;63(2):192-200.
58. **Kordowska J**, Stafford WF, Wang CL. (1998)
Ca²⁺ and Zn²⁺ bind to different sites and induce different conformational changes in human calcyclin.
Eur J Biochem.: 253(1):57-66

-
- 59. Kuznicki J**, Filipek A, Hunziker PE, Huber S, Heizmann CW. (1989)
Calcium-binding protein from mouse Ehrlich ascites-tumour cells is homologous to human calyculin.
Biochem J.: 263(3):951-6.
- 60. Kuznicki J**, Kordowska J, Puzianowska M, Wozniewicz BM. (1992)
Calcyclin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts.
Exp Cell Res.: 200(2):425-30.
- 61. Lesniak W**, Filipek A. (1996)
Ca²⁺-dependent interaction of calyculin with membrane.
Biochem Biophys Res Commun.: 220(2):269-73.
- 62. Lin HC**, Sudhof TC, Anderson RG. (1992)
Annexin VI is required for budding of clathrin-coated pits.
Cell. 1992 Jul 24;70(2):283-91.
- 63. Low JE**, Borch RF, Sladek NE. (1982)
Conversion of 4-hydroperoxycyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide to phosphoramidate mustard and acrolein mediated by bifunctional catalysis.
Cancer Res. 1982 Mar;42(3):830-7.
- 64. Maelandsmo GM**, Flørenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad Ø (1997)
Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma.
Int. J. Cancer (Pred. Oncol.): 74, 464-469
- 65. Mani RS**, Kay CM (1993)
Calcium-Dependent Regulation of the Caldesmon-Heavy Meromyosin Interaction by Calyculin.
Biochemistry 32, 11217-11223
- 66. Mani RS**, Kay CM (1995)
Effect of calyculin on caldesmon-actin interaction.
J Biol Chem. 1995 Mar 24;270(12):6658-63.
- 67. Mani RS**, McCubbin WD, Kay CM (1992)
Calcium-Dependent Regulation of Caldesmon by an 11-kDa Smooth Muscle Calcium-Binding Protein, Calyculin
Biochemistry 31, 11896-11901

- 68. Matsuzawa SI**, Reed JC. (2001)
Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses.
Mol Cell. 2001 May;7(5):915-26.
- 69. McGuire WL**. (1991)
Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines.
J Natl Cancer Inst. 1991 Feb 6;83(3):154-5.
- 70. Mizutani A**, Tokumitsu H, Kobayashi R, Hidaka H. (1993)
Phosphorylation of Annexin XI (CAP-50) in SR-3Y1 Cells
J Biol Chem. 268 (21): 15517-15522
- 71. Mizutani A**, Usuda N, Tokumitsu H, Minami H, Yasui K, Kobayashi R, Hidaka H. (1992)
CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast3Y1 cells.
J Biol Chem.: 267(19):13498-504
- 72. Monks NR**, Biswas DK, Pardee AB. (2004)
Blocking anti-apoptosis as a strategy for cancer chemotherapy: NF-kappaB as a target.
J Cell Biochem. 2004 Jul 1;92(4):646-50
- 73. Mueller, A.**, Bächli T, Höchli M, Schäfer BW, Heizmann CW (1999)
Subcellular distribution of S100 proteins in tumor cells and their relocation in response to calcium activation
Histochem. Cell. Biol.: 111: 453-459
- 74. Muller M**, Mader RM, Steiner B, Steger GG, Jansen B, Gnant M, Helbich T, Jakesz R, Eichler HG, Blochl-Daum B. (1997)
5-fluorouracil kinetics in the interstitial tumor space: clinical response in breast cancer patients.
Cancer Res. 1997 Jul 1;57(13):2598-601.
- 75. Münstedt K**, Franke F.E. (1997)
Prognosefaktoren beim Mammakarzinom- eine kritische Evaluation des derzeitigen und des möglichen klinischen Nutzens prognostischer und prädiktiver Faktoren
Gießener gynäkologische Fortbildung 1997: 196-203

-
- 76. Murphy LC**, Murphy LJ, Tsuyuki D, Duckworth ML, Shiu RPC. (1988)
Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Highly Conserved,
Putative Calcium Binding Protein, Identified by an Anti-prolactin Receptor
Antiserum
J Biol Chem. 1988; 263 (5): 2397-2401
- 77. Nakayama S**, Kretsinger RH. (1994)
Evolution of the EF-hand family of proteins.
Annu Rev Biophys Biomol Struct.: 23:473-507. Review.
- 78. Nowotny M**, Bhattacharya S, Filipek A, Krezel AM, Chazin W, Kuznicki J
(2000)
Characterization of the Interaction of Calcyclin (S100A6) and Calcyclin-
binding Protein.
J. Biol. Chem.: 275, 31178-31182
- 79. Okazaki K**, Niki I, Iino S, Kobayashi S, Hidaka H (1993)
A Role of Calcyclin, a Ca^{2+} -binding Protein, on the Ca^{2+} -dependent In-
sulin Release from the Pancreatic β Cell.
J Bio Chem 269 (8), 6149-6152
- 80. Otterbein LR**, Kordowska J, Witte-Hoffmann C, Wang CL, Dominguez R.
(2002)
Crystal Structures of S100A6 in the $Ca(2+)$ -Free and $Ca(2+)$ -Bound
States. The Calcium Sensor Mechanism of S100 Proteins Revealed at
Atomic Resolution.
Structure (Camb). 2002 Apr;10(4):557-67.
- 81. Pedrocchi M**, Schäfer BW, Müller H, Eppenberger U, Heizmann CW
(1994)
Expression of Ca^{2+} -binding proteins of the S100 family in malignant hu-
man breast-cancer cell lines and biopsy samples
Int. J. Cancer: 57, 684-690
- 82. Piccart MJ**, Cardoso F, Awada A, di Leo A, Gelber RD. (2002)
Kontroversen in der adjuvanten systemischen Therapie des rezeptorne-
gativen Mammakarzinoms
in: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms - State of the Art
2002,
W. Zuckerschwerdt Verlag München, ISBN 3-88603-794-0, S. 372 – 388

- 83. Piche A**, Grim J, Rancourt C, Gomez-Navarro J, Reed JC, Curiel DT. (1998)
Modulation of BCL-2 protein levels by an intracellular anti-Bcl-2 single-chain antibody increases drug-induced cytotoxicity in the breast cancer cell line MCF-7
Cancer Res. 1998 May 15; 58 (10):2134-40
- 84. Presant CA**, Wolf W, Waluch V, Wiseman C, Kennedy P, Blayney D, Brechner RR. (1994)
Association of intratumoral pharmacokinetics of fluorouracil with clinical response.
Lancet. 1994 May 14;343(8907):1184-7.
- 85. Rao RV**, Poksay KS, Castro-Obregon S, Schilling B, Row RH, del Rio G, Gibson BW, Ellerby HM, Bredesen DE. (2004)
Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress.
J Biol Chem. 2004 Jan 2;279(1):177-87. Epub 2003 Oct 15.
- 86. Raynal P**, Pollard HB.
Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins.
Biochim Biophys Acta. 1994 Apr 5;1197(1):63-93. Review
- 87. Reiner A**, Reiner G, Spona J, Schemper M, Holzner JH. (1988)
Histopathologic Characterization of Human Breast Cancer in Correlation with Estrogen Receptor Status
Cancer 61: 1149-1154
- 88. Remmele W**, Stegner HE (1987)
Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Scores (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe
Pathologe (1987) 8 : 138 – 140
- 89. Satoh H**, Shibata H, Nakano Y, Kitaura Y, Maki M. (2002)
ALG-2 interacts with the amino-terminal domain of annexin XI in a Ca(2+)-dependent manner.
Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 15;291(5):1166-72
- 90. Sauer H.** (1995)
Band 4: Zytostatika, Hormone, Zytokine (aus: Supportive Maßnahmen in der Onkologie, Herausgeber: Jehn U, Berghof H.)
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, S. 25 ff.

91. **Schäfer BW**, Heizmann CW. (1996)
The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology.
Trends Biochem Sci.: 21(4):134-40
92. **Schäfer BW**, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. (1995)
Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family.
Genomics.: 25(3):638-43.
93. **Schwartz PS**, Waxman DJ. (2001)
Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells.
Mol Pharmacol. 2001 Dec;60(6):1268-79.
94. **Shrestha P**, Muramatsu Y, Kudeken W, Mori M, Takai Y, Ilg E, Schäfer BW, Heizmann CW (1998),
Localization of Ca²⁺-binding S100 proteins in epithelial tumours of the skin
Virchows Arch.: 432: 53-59
95. **Siegel S** (1988)
Non-parametric statistics for the behavioral sciences.
New York: McGraw Hill 1988, 2nd ed.
96. **Skouteris GG**, Schroder CH. (1996)
The hepatocyte growth factor receptor kinase-mediated phosphorylation of lipocortin-1 transduces the proliferating signal of the hepatocyte growth factor.
J Biol Chem. 1996 Nov 1;271(44):27266-73.
97. **Slamon DJ**, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. (1989)
Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene.
Science 1989; 244: 707-712
98. **Sopkova-de Oliveira Santos J**, Oling FK, Rety S, Brisson A, Smith JC, Lewit-Bentley A (2000)
S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)(2) heterotetramer complex.
Biochim Biophys Acta.: 1498(2-3):181-91

-
- 99. Sorlie T**, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. (2003)
Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
- 100. Stradal, TB**, Gimona M (1999)
Ca²⁺-dependent Association of S100A6 (Calcyclin) with the Plasma Membrane and the Nuclear Envelope
J. Biol. Chem.: 274 (44), 31593-31596
- 101. Strasser P**, Gimona M, Moessler H, Herzog M, Small JV. (1993)
Mammalian calponin: Identification and expression of genetic variants.
FEBS 330:13-18
- 102. Stulik J**, Österreicher j, Koupilova K, Knizek J, Bures J, Jandik P, Langr F, Dedic K, Schäfer BW, Heizmann CW, (2000)
Differential expression of the Ca²⁺ binding S100A6 protein in normal, preneoplastic and neoplastic colon mucosa
Eur. J. Cancer 36, 1050-1059
- 103. Sudo T**, Hidaka H (1998)
Regulation of Calcyclin (S100A6) Binding by Alternative Splicing in the N-terminal Regulatory Domain of Annexin XI Isoforms
J. Biol. Chem.: 273 (11), 6351-6357
- 104. Susin SA**, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G (1999)
Mitochondrial Release of Caspase-2 and -9 during the Apoptotic Process
J. Exp. Med. 1999; 189 (2): 381.393
- 105. Timmons PM**, Chan CTJ, Rigby PWJ, Poirer F. (1993)
The gene encoding the calcium binding protein calcyclin is expressed at sites of exocytosis in the mouse
J. Cell Sci. 104, 187-196
- 106. Tokumitsu H**, Mizutani A, Minami H, Kobayashi R, Hidaka H, (1992)
A calcyclin-associated protein is a newly identifies member of the Ca²⁺/phospholipid-binding proteins, annexin family
J. Biol. Chem. 267, 8919-8924

-
- 107. Tomas A**, Futter C, Moss SE. (2004)
Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis.
J Cell Biol. 2004 Jun 21;165(6):813-22
- 108. Tomas A**, Moss SE. (2003)
Calcium- and cell cycle-dependent association of annexin 11 with the nuclear envelope.
J Biol Chem. 2003 May 30;278(22)
- 109. Tonini GP**, Casalaro A, Cara A, Di MD (1991)
Inducible expression of calcyclin, a gene with strong homology to S-100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Schwann-like cell lines.
Cancer Res. 51, 1733-1737
- 110. Tonini GP**, Fabretti G, Kuznicki J, Massimo L, Scaruffi P, Brisigotti M, Mazzocco K. (1995)
Gene expression and protein localisation of calcyclin, a calcium-binding protein of the S-100 family in fresh neuroblastomas.
Eur J Cancer. : 31A(4):499-504.
- 111. Vaupel P**, Höckel M (2002)
Durchblutung, Oxygenierungsstatus und metabolisches Mikromilieu des Mammakarzinoms
in: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms - State of the Art 2002,
W. Zuckerschwerdt Verlag München, ISBN 3-88603-794-0, S. 301 – 307
- 112. Volz A**, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D. (1993)
Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21.
Genomics: 18(1):92-9.
- 113. Wagener Ch.** (1999)
Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren
Georg Thieme Verlag Stuttgart / New York, 2. Auflage
- 114. Watanabe M**, Ando Y, Tokumitsu H, Hidaka H. (1993)
Binding site of annexin XI on the calcyclin molecule.
Biochem Biophys Res Commun.: 196(3):1376-82

- 115. Weterman MA**, Stoopen GM, van Muijen GN, Kuznicki J, Ruiter DJ, Bloemers HP. (1992)
Expression of calyculin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice.
Cancer Res.: 52(5):1291-6
- 116. Wittekind C**, Wagner G. (1997)
UICC: TNM – Klassifikation maligner Tumoren.
Springer Verlag, 5. Auflage, S. 14
- 117. Yule SM**, Boddy AV, Cole M, Price L, Wyllie R, Tasso MJ, Pearson AD, Idle JR. (1996)
Cyclophosphamide pharmacokinetics in children.
Br J Clin Pharmacol. 1996 Jan;41(1):13-19.
- 118. Zeng FY**, Gerke V, Gabius HJ. (1993)
Identification of annexin II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calyculin-binding proteins in bovine heart.
Int J Biochem.: 25(7):1019-27
- 119. Zimmer DB**, Chessher J, Wilson GL, Zimmer WE (1997)
S100A1 and S100B Expression and Target Proteins in Type I Diabetes
Endocrinology 138 (12), 5176-5183

Danksagung

Mein Dank gilt **Herrn Professor Dr. Wolfgang Simon** für die Betreuung der Dissertation, für die wissenschaftlich fundierten Ratschläge und seine konstruktive Kritik.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei **Herrn Dr. Peter Fritz**, der mit viel Geduld, fachlicher Kompetenz und steter Hilfsbereitschaft die Erstellung der Dissertation begleitete.

Den Mitarbeitern am Margarete-Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie, **Frau McClellan** und **Frau Gawronski**, sei für die Hilfsbereitschaft bei der immunhistochemischen Färbung der Präparate ebenso gedankt, wie Herrn **Alexander Ehle** und **Frau Heike Grollmuss** für die Unterstützung bei EDV-technischen Problemen.

Frau Dr. Dagmar Busse danke ich für die kritische Durchsicht des Abschnittes über den Cyclophosphamid-Stoffwechsel und die Anregungen zum Kapitel Diskussion.

Meiner Frau danke ich für ein hervorragendes Lektorat und ganz besonders für die Rücksichtnahme und Geduld, mit der sie die vielen, der Familie vorenthaltenen Stunden ertrug und mich gleichzeitig moralisch unterstützte.

Curriculum vitae

Persönliche Daten: Andreas Gerteis

geb. am 31.12.1966 in Spaichingen, Württemberg

verheiratet, ein Kind

Schulstrasse 10/1

70736 Fellbach, Baden-Württemberg

Schulausbildung:	1973 - 1977	Grundschule, Rupert-Mayer-Schule Spaichingen
	1977 - 1986	Gymnasium, Gymnasium Spaichingen Abschluß mit Abitur, Juni 1986
Wehrdienst:	1986 - 1988	Grundwehrdienst, Heeresmusikkorps 10, Ulm
Studium:	1988 - 1995	Studium im Fach Medizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
	Juli 1990	Physikum
	März 1992	1. Staatsexamen
	März 1994	2. Staatsexamen
Praktisches Jahr:	1994 - 1995	Kreisklinik Albstadt, Wahlfach Gynäkologie
	03. Mai 1995	3. Staatsexamen
Berufserfahrung:	1995 - 1996	Arzt im Praktikum
	Seit Dez. 1996	Assistenzarzt im Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe
	Dez.`96 – Aug.`99	Kreisklinik Albstadt Chefarzt Prof. Dr. med. G. Geier
	seit Sept. 1999	Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart Chefarzt Prof. Dr. med. W. Simon