

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Prognostische Relevanz der
Neuronatin-Expression in Mammakarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Sarah Walter
aus Gardelegen
Magdeburg 2017

Dokumentationsblatt

Walter, Sarah:

Prognostische Relevanz der Neuronatin-Expression in Mammakarzinomen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med. (doctor medicinae) an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

2017 – 72 Seiten, 12 Abbildungen, 9 Tabellen.

Kurzreferat:

Das Mammakarzinom hat mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 76–81 % eine relativ gute Prognose. In dieser Arbeit wurde die Expression von Neuronatin unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Faktoren auf seine Bedeutung für die Prognose des Mammakarzinoms hin untersucht. Die immunhistochemische Analyse von 148 Mammakarzinomen zeigte eine gesteigerte Neuronatin-Expression im Karzinom im Vergleich zum normalen Brustdrüsenparenchym. Darüber hinaus korrelierte eine erhöhte Neuronatin-Expression mit einem kürzeren Überleben, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, dem Vorhandensein von Metastasen und impliziert somit eine ungünstigere Prognose. Darüber hinaus konnte die Neuronatin-Expression als unabhängiger Prognoseparameter für das Mammakarzinom identifiziert werden.

Schlüsselwörter: Neuronatin – Mammakarzinom – Prognose

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiopathogenese	1
1.1.3 Pathologische Diagnostik	2
1.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren	6
1.2 Neuronatin	10
1.2.1 Ursprung und Struktur	10
1.2.2 Vorkommen	11
1.2.3 Funktion	11
1.2.4 Pathologie	11
1.2.5 Neuronatin in malignen Tumoren	12
1.2.6 Neuronatin im Mammakarzinom	13
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Patientenkollektiv	16
3.1.2 Charakteristika der Mammakarzinome	17
3.2 Methoden	18
3.2.1 Patientenauswahl	18
3.2.2 Anfertigung mikroskopischer Schnittpräparate	19
3.2.3 Entparaffinierung und Vorbehandlung	19
3.2.4 Immunhistochemische Färbung	19
3.2.5 Positiv- und Negativkontrolle	20

3.2.6	Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion	20
3.2.7	Statistische Methoden	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Klinisch-pathologische Daten des Patientenkollektivs	24
4.2	Prognoseparameter	25
4.2.1	Klinisch-pathologische Prognoseparameter	25
4.2.2	Nottingham-Prognose-Index	30
4.3	Immunhistochemische Expressionsanalyse	32
4.3.1	Expression von Neuronatin im Brustdrüsenparenchym	33
4.3.2	Expression von Neuronatin im Carcinoma in situ	34
4.3.3	Expression von Neuronatin im Mammakarzinom	34
4.3.4	Korrelation der Neuronatin-Expression mit den klinisch-pathologischen Faktoren	35
4.3.5	Definition der Risikogruppen	36
4.3.6	Korrelation der Neuronatin-Expression mit dem Überleben	36
4.4	Ermittlung von Prognoseparametern mithilfe der Multivariaten Analyse	38
4.4.1	Univariate Analyse	38
4.4.2	Multivariate Analyse	39
5	Diskussion	41
5.1	Patientenkollektiv	41
5.2	Klinisch-pathologische Prognoseparameter	42
5.3	Nottingham-Prognose-Index	45
5.4	Neuronatin-Expression und die klinisch-pathologischen Faktoren	46
5.4.1	Neuronatin-Expression und Histologie	47
5.4.2	Neuronatin-Expression und Tumorstadium	48
5.4.3	Neuronatin-Expression und Metastasen	48
5.4.4	Neuronatin-Expression und Hormonrezeptorstatus	49
5.4.5	Neuronatin-Expression und Nottingham-Prognose-Index	50
5.4.6	Neuronatin-Expression und Überleben	50
5.5	Neuronatin-Expression und therapeutische Ansätze	51
5.6	Kritische Betrachtung der Relevanz der Neuronatin-Expression	52
5.7	Neuronatin als unabhängiger Prognoseparameter für das Mammakarzinom	53
	Zusammenfassung	55
	Danksagung	69

Ehrenerklärung	70
Lebenslauf	71

Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under the curve
BRCA	early-onset breast cancer
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
DAB	Diaminobenzindinlösung
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DNA	Deoxyribonucleic acid
EPG	Excellent Prognostic Group
ER	Östrogenrezeptor
FI	Färbeintensität
FISH	Floureszenz-in-situ-Hybridisierung
GPG	Good Prognostic Group
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HPF	high power field
HR	hazard ratio
Ig	Immunglobulin
IRS	Immunreaktiver Score
JÜR	Jahres-Überlebensrate
LK	Lymphknoten
miRNA	micro Ribonucleic acid

MPG	Moderate Prognostic Group
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NNAT	Neuronatin
NPI	Nottingham-Prognose-Index
NST	kein spezieller Typ
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase-System
PMP-1	Peroxisomales Membran Protein-1
PP	Prozentsatz positiver Zellkerne
PPG	Poor Prognostic Group
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonucleic acid
ROC	receiver operating characteristics
SD	Standardabweichung
SISH	Silber-in-situ-Hybridisierung
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union internationale contre le cancer
VPG	Very Poor Prognostic Group

Tabellenverzeichnis

1.1	Histologisches Grading für das invasive Mammakarzinom	4
1.2	Histopathologische TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	4
1.3	Immunreaktiver Score zur Hormonrezeptorauswertung	5
1.4	Berechnung des Nottingham-Prognose-Index	9
1.5	Prognosegruppen nach dem Nottingham-Prognose-Index und die dazugehörigen 10-Jahres-Überlebensraten	9
4.1	Gesamtüberleben und Neuronatin-Expression unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Faktoren	26
4.2	Rezidivfreies Überleben unter Berücksichtigung der klinisch- pathologischen Faktoren	28
4.3	Univariate Analyse	40
4.4	Multivariate Analyse	40

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung von Peroxisomales Membran Protein-1, Neuronatin und Phospholamban	10
3.1	Peroxidase-Anti-Peroxidase-System	20
3.2	Positiv- und Negativkontrolle	21
3.3	Intensität der Neuronatin-Expression	21
4.1	Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Nottingham-Prognose-Index .	31
4.2	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom Nottingham-Prognose-Index	31
4.3	Neuronatin-Expression im Karzinom, Carcinoma in situ und normalen Brustdrüsenparenchym	32
4.4	Neuronatin-Expression im Brustdrüsenparenchym	33
4.5	Neuronatin-Expression im Carcinoma in situ	34
4.6	Neuronatin-Expression in invasiven Mammakarzinomen	35
4.7	Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Neuronatin-Expression . .	37
4.8	Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der Neuronatin-Expression	38

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau und macht weltweit 25,2 % aller Krebserkrankungen in der weiblichen Bevölkerung aus [34]. Dabei spielen geographische Faktoren eine Rolle: So zeigt sich in Australien, Nordeuropa und Nordamerika beispielsweise eine höhere Inzidenz als in Afrika oder Südostasien [81]. Laut einer gemeinsamen Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. erkrankten im Jahr 2012 insgesamt 69 550 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Im Mittel liegt das Erkrankungsalter bei 64 Jahren. Die aktuelle Inzidenzrate beträgt 117,4/100 000 Einwohner bei einer Mortalität von 23,9/100 000 Einwohner. Insgesamt haben die Frauen ein Lebenszeitrisiko von 12,8 %, ein Mammakarzinom zu bekommen. In Deutschland liegt 2011 bis 2012 die absolute 5-Jahres-Überlebensrate (JÜR) bei 76–81 % [58].

1.1.2 Ätiopathogenese

Die Entstehung des Mammakarzinoms ist multifaktoriell. Die allgemeinen und hereditären Prädispositionsfaktoren, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergehen, werden im folgenden Kapitel erläutert.

Allgemeine Risikofaktoren

Das Alter ist ein entscheidender Risikofaktor. Die Inzidenz des Mammakarzinoms nimmt mit dem Alter zu [58]. Sportlich aktive Frauen reduzieren ihr Brustkrebsrisiko [12], wobei im Gegensatz dazu eine Gewichtszunahme über einen gewissen Zeitraum zu einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos mit einem hazard ratio (HR) von bis zu 1,65

führt [93]. Weitere wichtige Prädispositionsfaktoren sind eine frühe Menarche (vor dem 12. Lebensjahr) und eine späte Menopause (nach dem 55. Lebensjahr) sowie keine oder eine späte erste Schwangerschaft (> 35 . Lebensjahr) [75, 88]. Frauen, die ihre Kinder nicht stillen, haben ebenfalls ein höheres Risiko als die, die stillen [102]. Eine postmenopausale Hormontherapie erhöht das Brustkrebsrisiko geringfügig [91, 76]. Frauen mit einem Carcinoma in situ haben ein deutlich erhöhtes Risiko, ein invasives Mammakarzinom zu entwickeln [106]. Das Risiko für ein Mammakarzinom der kontralateralen Brust ist abhängig vom Hormonrezeptorstatus des ipsilateralen Karzinoms. Ein Hormonrezeptor-positiver Primärtumor zeigt dabei ein erhöhtes Risiko und ein Hormonrezeptor-negativer Primärtumor ein verringertes Risiko [95].

Familiäre Disposition

Die meisten Brustkrebserkrankungen treten sporadisch auf und weisen keine positive Familienanamnese auf. Frauen mit Verwandten 1. Grades mit einem Mammakarzinom zeigen ein erhöhtes Karzinomrisiko [22]. Etwa 5–10 % aller Brustkrebserkrankungen liegt eine Keimbahnmutation zugrunde [65]. Die bekanntesten prädisponierenden Hochrisikogene sind die zwei Brustkrebs susceptibilitäts-gene BRCA1 und BRCA2. Eine genetische Veränderung dieser Tumorsuppressorgene liegt in 40–60 % aller familiärer Mammakarzinome vor [73, 126]. Frauen mit einer Mutation in diesen Genen erkranken etwa 20 Jahre früher als Frauen ohne familiäre Prädisposition und haben ein lebenslanges Risiko von bis zu 80 % an einem Mammakarzinom bzw. von bis zu 40 % an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [8, 38].

1.1.3 Pathologische Diagnostik

Die Mammakarzinome sind maligne epitheliale Tumoren des Brustdrüsenparenchyms. Als heterogene Tumorerkrankung zeigen sie Unterschiede bezüglich des Verlaufs, der Prognose und des Ansprechens auf eine Therapie. Invasive Mammakarzinome entstehen auf dem Boden von Präkanzerosen. Diese Vorstufen werden auch als Carcinoma in situ bezeichnet und unterteilen sich in ein Duktales Carcinoma in situ (DCIS) und ein Carcinoma lobulare in situ (CLIS) [66]. Im folgenden Abschnitt wird zu den wichtigsten Aspekten der pathologischen Diagnostik Stellung genommen.

Lokalisation

Zur Bestimmung der Lage eines Karzinoms kann die Brust in vier Quadranten eingeteilt werden. Von der anatomischen Lokalisation her finden sich die meisten Karzinome im oberen äußeren Quadranten (55 %). 15 % sind im oberen inneren Quadranten, 15 % im Mamillenbereich, 10 % im unteren äußeren Quadranten und 5 % im unteren inneren Quadranten angesiedelt [109].

Histologische Einteilung

Die histologische Einteilung invasiver Mammakarzinome erfolgt anhand der aktuellen WHO-Klassifikation. Als Hauptentität wird das Invasiv Karzinom, kein spezieller Typ (NST) angegeben, auch bekannt als Invasiv duktales Karzinom. Das gemeinsame Merkmal dieser heterogenen Gruppe ist, dass die Tumoren keine hinreichenden Charakteristika aufweisen, um einem speziellen Typ zugeordnet werden zu können. Es gehören 50–80 % aller invasiven Mammakarzinome dieser Gruppe an [66].

Das zweithäufigste Karzinom der Mamma ist das Invasiv lobuläre Karzinom, welches 10–15 % aller invasiven Mammakarzinome ausmacht [68]. Im wesentlichen ist das typische Erscheinungsbild dieser Tumorgruppe durch seine Kleinzelligkeit und sein dissoziiertes infiltratives Wachstum gekennzeichnet [66]. Charakteristisch für das Invasiv lobuläre Mammakarzinom ist darüber hinaus der immunhistochemische Verlustnachweis der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion [23].

Weitere histologische Entitäten des invasiven Mammakarzinoms gemäß der WHO-Klassifikation sind das Tubuläre, das Kribriforme, das Muzinöse, das Invasiv mikropapilläre und das Metaplastische Karzinom, sowie das Karzinom mit medulärer, apokriner oder siegelringzelliger Differenzierung [66].

Histologisches Grading

Als histologisches Grading bezeichnet man die Beurteilung des Differenzierungsgrads von Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe. Bei dem Grading von Mammakarzinomen spielen drei histologische Merkmale eine Rolle: die Tubulus- bzw. Drüsenbildung, die Kernpleomorphie und die Mitosezahl (10 Gesichtsfelder mit 40-fachem Objektiv). Die ursprüngliche Methode von Bloom und Richardson [18] wurde von Elston und Ellis [32] optimiert, siehe Tabelle 1.1.

Staging

Die Stadieneinteilung der Mammakarzinome erfolgt anhand der TNM-Klassifikation. Hierbei werden die anatomische Ausdehnung des Primärtumors (T), der regionäre Lymphknotenstatus (N) und das Auftreten von Fernmetastasen (M) beurteilt. Klinisch erstellte TNM-Klassifikationen sind durch ein Präfix “c” gekennzeichnet, wohingegen histopathologische TNM-Klassifikationen ein “p” erhalten. Die Tabelle 1.2 zeigt eine Zusammenfassung dieses Klassifikationsschemas. Weiterhin verschlüsselt werden die Resektionsränder (R), Lymph- (L) und Blutgefäßeinbrüche (V) sowie Nervenscheideninfiltrationen (Pn) [124].

Tab. 1.1 Histologisches Grading für das invasive Mammakarzinom [32].

Merkmale	Kriterien	Scorewerte
Tubulusausbildung	> 75 %	1
	10–75 %	2
	< 10 %	3
Kernpleomorphie	Gering	1
	Mittelgradig	2
	Stark	3
Mitoserate*	0–5/10 HPF**	1
	6–11/10 HPF	2
	> 12/10 HPF	3

Summenscore (3–9)	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3, 4, 5	Gering	G1	Gut differenziert
6, 7	Mäßig	G2	Mäßig differenziert
8, 9	Hoch	G3	Schlecht differenziert

* Für 10 Gesichtsfelder mit 40-fachem Objektiv, abhängig vom Gesichtsfelddurchmesser.

** HPF: high power field; Beispiel für Gesichtsfelddurchmesser von 0,44 mm.

Tab. 1.2 Histopathologische TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms [124].

Einteilung	Beschreibung
	Primärtumor
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm und ≤ 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
	Regionäre Lymphknoten
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 1–3 axillären Lymphknoten
pN2	Metastasen in 3–9 axillären Lymphknoten
pN3	Metastasen in ≥ 10 Lymphknoten
	Metastasen
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Hormonrezeptorbestimmung und HER2-Status

Im Rahmen der Primärdiagnostik werden, empfohlen durch die sogenannte S3-Leitlinie, derzeit die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus und des HER2-Status durchgeführt, vorzugsweise bereits an der Stanzbiopsie [45].

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus erfolgt immunhistochemisch unter Berücksichtigung des Prozentsatzes positiver Tumorzellen und der durchschnittlichen Färbeintensität. Zur Darstellung eignet sich der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele [89], siehe Tabelle 1.3.

Tab. 1.3 Immunreaktiver Score zur Hormonrezeptorauswertung [89].

Prozentsatz positiver Zellkerne (PP)		Färbeintensität (FI)	
Keine positiven Kerne	0 Punkte	Keine Färbereaktion	0 Punkte
< 10 % positive Kerne	1 Punkt	Schwache Färbereaktion	1 Punkt
10–50 % positive Kerne	2 Punkte	Mäßige Färbereaktion	2 Punkte
51–80 % positive Kerne	3 Punkte	Starke Färbereaktion	3 Punkte
> 81 % positive Kerne	4 Punkte		

$$\text{Immunreaktiver Score (IRS)} = \text{PP} \times \text{FI} \quad (0\text{--}12 \text{ Punkte})$$

Ein weiterer Score, der die gleichen Parameter verwendet und ebenfalls durch die S3-Leitlinie empfohlen wird, ist der Allred-Score [4].

Die Bewertung Östrogenrezeptor (ER)- bzw. Progesteronrezeptor (PR)-positiv setzt mindestens 1 % positive Tumorzellkerne voraus [44]. Der ER- bzw. der PR-Status gehört zu den wichtigsten prädiktiven Faktoren des Mammakarzinoms und ist richtungsweisend bzw. notwendig für die Therapieplanung [3].

Liegt eine HER2-Positivität vor, so wird zumeist eine Trastuzumab-Therapie durchgeführt. Dies ist der Fall, wenn sich zum einen immunhistochemisch eine Proteinüberexpression und zum anderen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Silber-in-situ-Hybridisierung (SISH) eine Genamplifikation nachweisen lässt [125].

Anhand des Hormonrezeptor- und HER2-Status sowie der Ki-67 Proliferationsrate können Mammakarzinome in folgende vier Subtypen unterteilt werden [20]:

- **Luminal A:** ER- und/oder PR-positiv, HER2-negativ, Ki-67 < 14 %,
- **Luminal B:** ER- und/oder PR-positiv, HER2-negativ, Ki-67 > 14 %,
ER- und/oder PR-positiv, HER2-positiv,
- **HER2-positiv:** ER- und PR-negativ, HER2-positiv,
- **triple-negativ:** ER-, PR- und HER2-negativ.

Diese Klassifikation stellt die Grundlage für die aktuelle Therapieempfehlung dar [40].

1.1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren

Ideale Prognosefaktoren geben unabhängig von der Therapie zum Diagnosezeitpunkt Auskunft über den Krankheitsverlauf, das Gesamtüberleben und das Rezidivrisiko. Prädiktive Faktoren hingegen geben die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens eines Tumors auf eine bestimmte Therapie an. Im folgenden Abschnitt werden nur ein Bruchteil der Mammakarzinom-Studien aufgeführt, welche sich sowohl mit prognostischen als auch mit prädiktiven Faktoren beschäftigen.

Alter

Brustkrebspatientinnen, die zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 40 Jahre sind, zeigen im Gegensatz zu älteren Patientinnen eine schlechtere Prognose und weisen im Durchschnitt ein höheres Tumorstadium, einen höheren histologischen Grad und mehr befallene Lymphknoten auf [5]. Sie zeigen eine 5-JÜR von 79,3 % bzw. 10-JÜR von 77,2 % [47]. Auch Patientinnen höheren Alters zeigen eine schlechte Prognose. So sinkt die Gesamtüberlebensrate laut einer niederländischen Studie auf 56 %, wenn die Patientinnen bei Erstdiagnose älter als 75 Jahre sind [97].

Histologischer Typ

Das Invasive Karzinom NST zeigt insgesamt eine etwas schlechtere Prognose als die durchschnittliche Prognose aller Mammakarzinome. Die 10-JÜR beträgt 35–50 % [31]. Dem gegenüber zeigt das Invasiv lobuläre Karzinom bei anfänglich besserer Überlebensrate nach 10 Jahren ein schlechteres Langzeitüberleben [85]. Eine noch schlechtere Prognose hat, mit einer 10-JÜR von 30 %, nur noch das Inflammatorische Mammakarzinom [115]. Eine gute bis sehr gute Prognose zeigt das Tubuläre bzw. das Kribriforme Mammakarzinom mit einer 10-JÜR von über 90 % [54, 70].

Ki-67

Für die Tumorphiliferation ist das Mitose-assoziierte Kern-Antigen Ki-67 einer der wichtigsten immunhistochemischen Marker [37]. Darüber hinaus wird das Ki-67 als unabhängiger prognostischer und prädiktiver Parameter beim Mammakarzinom beschrieben [84]. Zwei aktuelle retrospektive Studien zeigen, dass eine gesteigerte Ki-67-Expression mit einer schlechten Überlebensrate einhergeht. Der dort ermittelte Cut-off-Wert für das Ki-67 liegt bei 20 % [19, 116].

Tumorgroße

Die Tumorgroße ist ein wichtiger prognostischer Faktor [92]. Eine aktuelle prospektive Studie in den Niederlanden legt dar, dass das Gesamtüberleben von Brust-

krebspatientinnen von der Tumorgroße abhängt. Mit einem Tumordurchmesser von ≤ 1 cm liegt die Gesamtüberlebensrate bei 95 %. Bei steigendem Tumordurchmesser sinkt die Gesamtüberlebensrate. So liegt sie nur noch bei 73 %, wenn der Tumordurchmesser mehr als 5 cm beträgt. Darüber hinaus zeigt diese Studie eine Gesamtüberlebensrate von 45 % bei Tumoren mit direkter Ausbreitung in Brustwand oder Haut [97].

Lymphknotenstatus

Ein ebenfalls aussagekräftiger Prognosefaktor ist der Lymphknotenstatus [9]. In einer aktuellen Studie wird gezeigt, dass eine höhere Anzahl befallener Lymphknoten zu einer Verminderung der Gesamtüberlebensrate führt. So beträgt die Gesamtüberlebensrate bei tumorfreien Lymphknoten 90 % und im Vergleich dazu bei ≥ 10 befallene Lymphknoten nur 66 % [97]. Eine weitere Studie befasst sich mit dem rezidivfreien Überleben in Abhängigkeit von der Anzahl befallener Lymphknoten. Zum Vergleich zeigt sich eine 5-Jahres-rezidivfreie-Überlebensrate bei 1–3 befallene Lymphknoten von 67 % und bei ≥ 10 befallene Lymphknoten von 32 % [107].

Histologisches Grading

Das histologische Grading ist prognostisch relevant. Tumoren mit einem histopathologischen Grad 1 (G1) weisen eine gute Prognose auf, wobei Grad 3 (G3) Tumoren mit einer schlechten Prognose einhergehen [33]. Darüber hinaus konnte belegt werden, dass G1- bzw. G3-Tumoren eine 97 % bzw. 73 % 5-JÜR implizieren [110].

Lymph- und Blutgefäßeinbrüchen

Als ergänzende prognostische Marker werden Lymph- und Blutgefäßeinbrüche berücksichtigt, insbesondere bei Patientinnen mit tumorfreien Lymphknoten [39]. Mit ihnen werden das Alter der Patientinnen (< 40 Jahre), ein schlechterer histologischer Grad (G2, G3), ein Tumordurchmesser > 2 cm und ≥ 4 befallenen Lymphknoten assoziiert [108]. Eine Studie aus dem Jahr 2012 aus Großbritannien zeigt bei vorhandenen Lymph- und Blutgefäßeinbrüchen eine 5-JÜR von 81 %. Patientinnen ohne Nachweis dieser Einbrüche zeigen eine 5-JÜR von 92 %. Die metastasenfreie Überlebenszeit zeigt ähnliche Werte [86].

Fernmetastasen

Das Vorliegen von Fernmetastasen geht mit einer schlechten Prognose einher. Die mittlere Überlebenszeit eines metastasierten Mammakarzinoms liegt bei 17,9 Monaten, wenn ein Organ befallen ist, und bei 4,1 Monate, wenn mehrere Organe betroffen sind [69]. Die 5-, 10-, bzw. 20-JÜR beläuft sich auf 15 %, 3,4 %, bzw. 1,3 % [77].

Hormonrezeptor- und HER2-Status

Vor allem als Indikator für das Ansprechen auf eine hormonelle Therapie ist die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus sehr wichtig. Eine Hormonrezeptor-Positivität bedeutet in Kombination mit einer entsprechenden Therapie eine bessere Prognose [41, 104]. Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren weisen im Gegensatz zu Hormonrezeptor-negativen Patientinnen kleinere Tumordurchmesser, weniger befallene Lymphknoten und ein weniger weit fortgeschrittenes Tumorstadium auf [130]. ER-positive Patientinnen zeigen insgesamt ein besseres Langzeitüberleben als ER-negative Patientinnen [80].

Eine HER2-Überexpression oder Genamplifikation kommt in 20 % der Mammakarzinome vor und geht einher mit einem aggressiveren Tumorverhalten sowie einer schlechteren klinischen Prognose [94, 103]. Diese Patientinnen zeigen eine 10-JÜR von 50 % im Gegensatz zu einer 10-JÜR von 65 % für Patientinnen ohne HER2-Überexpression und ohne Genamplifikation [72]. Patientinnen mit HER2-positiven Karzinomen zeigen mit Trastuzumab-Therapie eine bessere Überlebensrate bzw. eine bessere Prognose als Patientinnen mit HER2-negativen bzw. -positiven Tumoren ohne Trastuzumab-Therapie [24]. Darüber hinaus weisen triple-negative Mammakarzinome die schlechteste Prognose auf [30, 87].

Microarray

DNA-Microarrays können mithilfe von bekannten DNA-, RNA- und miRNA-Sequenzen die Menge an exprimierten Genen in zahlreichen Gewebeproben gleichzeitig bestimmen [66]. Microarrays sind im Bereich des Mammakarzinoms Bestandteil aktueller Forschung und gehören demzufolge noch nicht zu den etablierten Untersuchungen. Durch sie können neue Prognosefaktoren ermittelt werden. Zum Beispiel konnte die miRNA-210 neben anderen durch ein miRNA-Microarray im Mammakarzinom nachgewiesen werden [53]. Eine Folgestudie zeigt, dass eine Überexpression von miRNA-210 mit einer schlechteren Überlebensrate einhergeht [121]. So wurden in verschiedensten Studien viele weitere Gene ermittelt, die eine prognostische Relevanz zeigten. Auf dieser Grundlage konnten Multigen-Tests entwickelt werden, die die Prognose bestimmter Risikogruppen gezielter abschätzen können.

Um das individuelle Rezidivrisiko für Patientinnen mit einem Mammakarzinom zu bestimmen, kann eine Analyse von 21 Genen in Gewebeproben des Tumors durchgeführt werden [79] (Oncotype DX, Genomic Health Inc, Redwood City, CA, USA). Ein weiterer Genexpressionstest kombiniert die Expression von 11 Genen mit der Tumorgröße und der Anzahl von befallenen Lymphknoten. Damit wird ebenfalls das Rezidivrisiko ermittelt [35] (EndoPredict, Sividon Diagnostics GmbH, Köln, Deutschland).

Prognoseeinschätzung

Eine weit verbreitete Methode zur Prognoseeinschätzung ist der Nottingham-Prognose-Index (NPI) aus dem Jahr 1982. Zu seiner Berechnung herangezogen werden der Lymphknotenstatus, der Differenzierungsgrad nach dem Nottingham-Score [32] und der Tumordurchmesser [36, 46] eines Mammakarzinoms, siehe Tabelle 1.4.

Tab. 1.4 Berechnung des Nottingham-Prognose-Index [46].

Komponente	Wert	Bezug
Nodalstatus	1	0 LK mit Metastasen
	2	1–3 LK mit Metastasen
	3	> 3 LK mit Metastasen
Grad	1	Nottingham-Score 3–5
	2	Nottingham-Score 6–7
	3	Nottingham-Score 8–9
Durchmesser	$0,2 \times \text{Durchmesser}$	Durchmesser in cm.

$$\text{NPI} = \text{Nodalstatus} + \text{Grad} + 0,2 \times \text{Durchmesser}$$

Der errechnete Wert resultiert in einer Schätzung der 10-JÜR, siehe Tabelle 1.5. Generell gilt, je höher der errechnete Wert ist, desto schlechter ist die Prognose [16]. Auch in aktuellen Studien wird dieser Index verwendet. So zeigt sich unter anderem eine Korrelation zwischen dem NPI und den immunhistochemischen Markern des Mammakarzinoms. Zum Beispiel liegt bei einer hohen Ki-67-Proliferationsrate auch eine schlechte Prognosegruppe laut NPI vor [64]. In einer Studie aus Großbritannien stimmte die errechnete 10-JÜR des NPI (77,3 %) sehr gut mit der tatsächlichen Rate (77,2 %) überein [47].

Tab. 1.5 Prognosegruppen nach dem Nottingham-Prognose-Index und die dazugehörigen 10-JÜR [16].

NPI-Prognosegruppe	NPI	10-JÜR [%]
EPG – exzellent	2,08–2,40	96 ± 2
GPG – gut	2,42–3,40	93 ± 2
MPG I – mäßig I	3,42–4,40	81 ± 2
MPG II – mäßig II	4,42–5,40	74 ± 2
PPG – schlecht	5,42–6,40	55 ± 2
VPG – sehr schlecht	6,50–6,80	38 ± 2

Die Stadieneinteilung der TNM-Klassifikation ist eine weitere Methode zur Prognoseabschätzung. Sie beruht auf der anatomischen Ausbreitung des Tumors und schließt nur die Tumorgöße (T), den Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasen

(M) ein [124]. Diese sehr starre Einteilung beinhaltet zum Beispiel nicht den histologischen Grad des Tumors. Daher ist eine Abgrenzung von Gruppen mit bzw. ohne erforderliche adjuvante Therapie nicht eindeutig möglich. Trotzdem hat sie prognostische Relevanz [26].

1.2 Neuronatin

1.2.1 Ursprung und Struktur

Neuronatin (NNAT) ist ein Protein, das im Nervensystem speziell während der embryonalen Gehirnentwicklung von Säugetieren vermehrt produziert wird. Erstmalig entdeckt wurde NNAT in neonatalen Gehirnen von Ratten [56]. NNAT wird nur vom väterlichen Allel exprimiert. Das mütterliche Allel ist durch eine Methylierung inaktiv [60]. Die Isolierung bzw. die Bestimmung der Lokalisation des NNAT-Gens in der menschlichen DNA gelang im Jahr 1996. Das Gen liegt auf Chromosom 20q11.2-q12 [27] und besteht aus 3 Exons und 2 Introns, welche in die Proteine NNAT- α und - β , dekodiert werden [28].

Das Protein NNAT besteht wie andere Membranproteine aus zwei unterschiedlichen Anteilen: einem hydrophoben und einem hydrophilen Anteil [27]. Darüber hinaus zeigt NNAT eine 50 %-ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und dem strukturellen Aufbau der Membranproteine Peroxisomalen Membran Protein-1 (PMP-1) [74] und Phospholamban [113]. Sie stellen regulierende Untereinheiten von Ionenkanälen dar. NNAT, Peroxisomales Membran Protein-1 (PMP-1) und Phospholamban sind amphipathische Polypeptide und gehören zu den Proteolipid-Proteinen [27]. Ihre strukturelle Ähnlichkeit wird schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt.

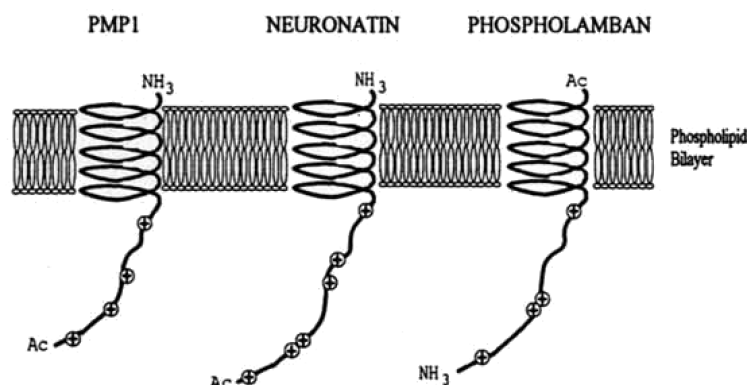


Abb. 1.1 Schematische Darstellung von PMP-1, NNAT und Phospholamban [27].

1.2.2 Vorkommen

NNAT wird hauptsächlich im neonatalen Gehirn während der neuronalen Entwicklung exprimiert [27]. Eine Beteiligung an der Gehirnentwicklung wird vermutet [27, 56]. Im Gehirn von Erwachsenen lässt sich NNAT nur noch in der Hypophyse nachweisen. In den Zellen des Hypophysenvorderlappens zeigt sich eine kräftige Expression von NNAT-mRNA im Gegensatz zu keiner bzw. einer geringgradigen Expression im übrigen Gehirn [120].

Außerhalb des Gehirns kann NNAT in den verschiedensten Geweben nachgewiesen werden. Zum Beispiel zeigen ekkrine und apokrine Drüsen der Haut immunhistochemisch eine kräftige Positivität für NNAT, sowohl in den sekretorischen Anteilen als auch in den Gangabschnitten [29]. In den β -Zellen des Pankreas [21] und im Fettgewebe [111] wird NNAT ebenfalls exprimiert.

1.2.3 Funktion

Die Funktionen von NNAT sind weitgehend unbekannt. Zwei bereits erforschte Funktionen werden kurz zusammengefasst. Zum einen spielt NNAT eine Rolle im Glukosestoffwechsel. Hier induziert NNAT die Glykogensynthese durch Dephosphorylierung und Aktivierung der Glykogensynthetase mithilfe der PI3-Kinase [101]. Zum anderen wird NNAT eine relevante Rolle bei der Genese von Adipozyten zugeschrieben. Am Mausmodell zeigt sich, dass NNAT die Differenzierung von Fettzellen durch die Anhebung des intrazytoplasmatischen Ca^{2+} und durch die Phosphorylierung des cAMP-response element-binding Proteins unterstützt [111].

1.2.4 Pathologie

Die Pathologie von Neuronatin ist eng gekoppelt an den Kalziumhaushalt der Zelle. Wichtig für eine Zelle ist ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Ca^{2+} , welches durch zahlreiche Bindungsproteine und Ca^{2+} -Transporter aufrecht erhalten wird [62]. Das Endoplasmatische Retikulum als Calcium-Speicher der Zelle spielt dabei eine wichtige Rolle [13]. Eine akute Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums kann zur Apoptose der Zelle führen [50]. Diese Reaktion wird ausgelöst durch deregulierte Entleerung des Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum-Speicher bzw. einen intrazytoplasmatischen Anstieg von freiem Ca^{2+} [61], Glukosemangel, Hypoxie, fehlerhafte Proteinsekretion [50] oder Aggregate fehlgefalteter Proteine [119]. Ein gestörter Ca^{2+} -Haushalt und der persistierende Endoplasmatische Retikulum-Stress führen zu neurodegenerativen Erkrankungen [114], Diabetes mellitus [43] und zu einer Tumorentstehung [123].

Bei Verlust der Methylierung des mütterlichen Allels kommt es in der Zelle zu einer

gesteigerten NNAT-Expression [42]. Eine vermehrte NNAT-Expression induziert eine Erhöhung des intrazytoplasmatischen Ca^{2+} durch die Antagonisierung von Calciumpumpen. Die daraus resultierende Endoplasmatische Retikulum-Stressreaktion kann zur Apoptose führen [100].

Bei der Pathogenese der Lafora-Krankheit, einer neurodegenerativen Erkrankung, wird eine NNAT-Mitwirkung angenommen. Versuche mit Zell-Linien zeigen, dass NNAT eine unnatürliche Ca^{2+} -Erhöhung induziert. Diese führt im Endoplasmatischen Retikulum zu einer Stressreaktion und zu fehlgefalteten Proteinen, welche vermutlich zur Entstehung dieser Krankheit beitragen. In Hautbiopsien der betroffenen Patienten lässt sich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe immunhistochemisch eine gesteigerte Expression von NNAT nachweisen [100].

Darüber hinaus wird vermutet, dass NNAT eine Rolle bei der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 spielt. Das zeigt ein Experiment an Mauszell-Linien Insulin produzierender Zellen. Ein hoher Glukosespiegel simuliert dabei den Diabetes mellitus. Darunter kommt es zur Erhöhung von NNAT und zur Apoptose der β -Zellen [55].

1.2.5 Neuronatin in malignen Tumoren

Es gibt nur wenige maligne Tumoren, die bis jetzt mit NNAT in Verbindung gebracht wurden. Die zwei malignen Neoplasien des Gehirns, bei denen ein Bezug zu NNAT festgestellt wurde, sind das Medulloblastom [105] und das Glioblastom [127].

Das Medulloblastom ist der häufigste bösartige Hirntumor des Kindes [82]. Siu et al. verglichen Gewebeproben vom Medulloblastom mit gesundem Gewebe. Dabei zeigt sich im Tumor eine starke Erhöhung der NNAT-mRNA sowie des eigentlichen Proteins. In den weiterhin untersuchten Zell-Linien konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte NNAT-Expression das Wachstum der Medulloblastomzellen begünstigt. Das heißt, eine gesteigerte NNAT-Expression hat eine gesteigerte Proliferation der Tumorzellen zur Folge [105].

Das Glioblastom ist der häufigste maligne Tumor des Gehirns mit einer mittleren Überlebenszeit von 12 Monaten [82]. In einer Studie zeigten die Glioblastom-Patienten mit einer hohen NNAT-Expression eine mittlere Überlebenszeit von 11,1 und mit einer niedrigen Expression eine mittlere Überlebenszeit von 18,9 Monaten. Eine hohe NNAT-Expression ist daher mit einer schlechteren Prognose assoziiert. In Versuchen mit Zell-Linien ließen sich wie beim Medulloblastom auch beim Glioblastom bei gesteigerter NNAT-Expression eine gesteigerte Proliferation der Tumorzellen nachweisen [127].

Auch bei anderen malignen Tumoren außerhalb des zentralen Nervensystems konnte ein Zusammenhang zur NNAT-Expression dargestellt werden. Im Nephroblastom, einem malignen embryonalen Nierentumor des Kindesalters [118], wird NNAT eben-

falls erhöht exprimiert. Ein Vergleich zwischen gesundem Nierenparenchym und Tumorgewebe zeigt, dass das Tumorgewebe einen Verlust der Methylierung der Promotor-Region des NNAT-Gens aufweist. Wissenschaftliche Arbeiten gehen davon aus, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Tumorentstehung und einer erhöhten NNAT-Expression angenommen werden kann [51].

Uchihara et al. haben Operationsmaterial von primären Lungenkarzinomen untersucht und dabei NNAT-positive mit -negativen Tumoren in Bezug auf die klinisch-morphologischen Eigenschaften verglichen. Es zeigte sich, dass schlecht differenzierte Adenokarzinome einen höheren Anteil NNAT-positiver Tumoren aufweisen als gut differenzierte Karzinome. Patienten mit NNAT-positiven Adenokarzinomen zeigten eine schlechtere Prognose und eine verminderte 5-JÜR. Eine signifikante Korrelation der NNAT-Expression zum Alter der Patienten, dem Tumorstadium und dem Plattenepithelkarzinom der Lunge fand sich nicht [117].

Aus den oben angeführten Versuchen wurde geschlossen, dass NNAT eine potenzielle Funktion im Karzinom hat, obwohl die zugrunde liegenden Abläufe ungeklärt sind [105, 117, 127]. Einen therapeutischen Ansatz zeigt eine Studie zu Prostatakarzinomen. Dort wurden Prostatakarzinomzell-Linien mit und ohne Metformin behandelt. Die mit Metformin behandelten Zellen zeigten einen Anstieg von miRNA-708 [128]. Eine Vermehrung der miRNA-708 korreliert mit einem Anstieg des NNAT-Spiegel [96]. Das hatte zur Folge, dass der Ca^{2+} -Ausstrom vom Endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma vermindert war. Das intrazytoplasmatische Ca^{2+} sank, es entstand eine akute Endoplasmatische Retikulum-Stressreaktion mit nachfolgender Apoptose. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Metformin indirekt den Zelltod der Prostatakarzinomzellen induziert und somit ein möglicher therapeutischer Ansatz ist [128].

1.2.6 Neuronatin im Mammakarzinom

Zwei Veröffentlichungen bringen Mammakarzinome mit NNAT in Verbindung. Zum einen wurden in einem Maus-Xenograft-Modell Tamoxifen-sensitive mit -resistenten Mammakarzinomen verglichen. Mittels genetischer Analysen konnte neben anderen Genen auch bei NNAT ein starker Anstieg in den Tamoxifen-resistenten Tumoren im Gegensatz zu den sensitiven Tumoren verzeichnet werden [11].

Zum anderen beschäftigte sich eine Versuchsreihe mit miRNAs, kleinen nicht codierten RNAs, die die Genexpression regulieren können [10]. Die hier in Mammakarzinomen untersuchte miRNA-708 supprimiert NNAT. Das heißt, ein hoher miRNA-708-Spiegel geht mit einer niedrigen NNAT-Expression einher und umgekehrt. Metastasierte Tumorzellen wurden mit nicht metastasierten Tumorzellen verglichen. Dabei fand sich ein vergleichsweise geringer Anteil von miRNA-708 in den metastasierten

Tumorzellen. Die daraus resultierende Erhöhung von NNAT führte zum Anstieg des Ca^{2+} im Zytoplasma [96]. Eine hohe Ca^{2+} -Konzentration in Mammakarzinomzellen geht einher mit einer gesteigerten Zellwanderung und Metastasenentstehung [129]. In Untersuchungen von Zell-Linien zeigte sich, dass eine miRNA-708-Überexpression die Migration der Mammakarzinomzellen hemmt. Dieses Erkenntnis könnte potenzielle therapeutische Relevanz haben [96]. Interessanterweise haben triple-negative Mammakarzinome einerseits eine schlechte Prognose [87, 30], zeigen andererseits aber ein niedrigeres miRNA-708-Level als andere Untergruppen [96]. Daher ist zu vermuten, dass Mammakarzinome, die eine schlechte Prognose haben, auch eine erhöhte NNAT-Expression aufweisen.

Kapitel 2

Zielsetzung

Wie in Abschnitt 1.2 dargelegt wurde, ist die Funktion von NNAT in malignen Tumoren weitgehend unbekannt. Belegt ist, dass eine gesteigerte NNAT-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist. Zudem haben Dugu et al. gezeigt, dass apokrine Drüsen eine kräftige Positivität für NNAT aufweisen [29]. Da das Mammaparenchym aus zahlreichen apokrinen Drüsen besteht, aus denen maligne Tumoren hervorgehen können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mammakarzinome auf ihr immunhistochemisches Expressionsverhalten bezüglich NNAT untersucht. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die prognostische Relevanz der NNAT-Expression für das Mammakarzinom zu evaluieren. Folgende detaillierte Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- Bestehen Unterschiede in der Expression von NNAT hinsichtlich der unterschiedlichen Mammakarzinomentitäten?
- Gibt es Unterschiede in der NNAT-Expression zwischen Hormonrezeptor-positiven bzw. -negativen Mammakarzinomen?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der NNAT-Expression und den morphologischen Tumorfaktoren wie der Tumorgröße, dem histologischen Grad und dem Lymphknotenstatus?
- Hat die Expression von NNAT einen Einfluss auf die Prognose bzw. auf die Überlebenszeit von Mammakarzinompatientinnen?

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 148 Fälle von Patientinnen, deren Mammakarzinome im Zeitraum von 1999–2006 im Universitätsklinikum der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg diagnostiziert wurden.

Die patientenbezogenen Daten wurden aus histopathologischen Befunden des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg und aus Krankenakten der Universitätsfrauenklinik und weiteren Kliniken des Universitätsklinikums ermittelt. Für alle Patientinnen wurden das Alter, das Datum der Erstdiagnose, der histologische Tumortyp, die TNM-Klassifikation einschließlich einer Lymph- bzw. Hämangiosis carcinomatosa, das UICC-Stadium, das histologische Grading, der Hormonrezeptor- sowie Menopausenstatus und das Auftreten einer metachronen Metastase sowie eines Lokalrezidivs erfasst. Die Fälle wurden nach den Histologienummern verschlüsselt und tabellarisch aufgearbeitet. Weitere klinisch bzw. diagnostisch erhobene Daten wie das Rezidivdatum, das Sterbedatum und die Nachbeobachtungszeit (Follow-up) wurden letztmalig im März 2016 aktualisiert und in die Auswertungstabelle übernommen.

In die retrospektive Studie eingeschlossen wurden Stanzbiopsien und Resektate primärer Mammakarzinome ohne neoadjuvante Therapie und mit ausreichend vorhandenem histologischen Untersuchungsmaterial. Ausschlusskriterium war eine unzureichende Datenlage bezüglich der neoadjuvanten Therapie, der Tumorklassifikation, des histologischen Typs oder des histologischen Grades.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt (Ethikvotum Nr. 104/2013).

3.1.2 Charakteristika der Mammakarzinome

Tumorklassifikation

Die Stadieneinteilung der Karzinome erfolgte entsprechend der siebenten Auflage der UICC TNM-Klassifikation für Mammatumoren [124], siehe Tabelle 1.2. In wenigen Fällen musste der Nodalstatus, der einer älteren Auflage der TNM-Klassifikation entsprach, an die aktuelle TNM-Klassifikation angepasst werden.

Die Hämatoxylin- und Eosin- (HE) gefärbten Schnittpräparate wurden hinsichtlich der Tumorausdehnung (T), des Lymphknotenstatus (N), des Gratings (G), einer Venen- (V) oder Lymphgefäß (L)-Infiltration nachbeurteilt, insofern diese Angaben nicht in den primären Befunden enthalten waren.

Histologische Typisierung und Grading der Karzinome

Die untersuchten Mammakarzinome wurden in folgende histologische Typen unterteilt: Invasive Karzinome, kein spezieller Typ (NST), Invasiv lobuläre Mammakarzinome und eine kleine Gruppe invasiver Mammakarzinome anderer histologischer Subtypen. Die Unterscheidung in die verschiedenen histologischen Karzinomtypen entspricht der aktuellen WHO-Klassifikation [66]. Daran angelehnt wurden alle Invasiv duktaalen Mammakarzinome der Gruppe der Invasiven Karzinome, kein spezieller Typ (NST) zugeordnet. Bei 57 Patientinnen konnte auch eine In-situ-Komponente beurteilt werden.

Die Ermittlung des histologischen Malignitätsgrades der Karzinominfiltrate, das Grading, erfolgte anhand der aktuellen WHO-Klassifikation nach der Methode von Elston und Ellis in gut (G1), mäßig (G2) und gering (G3) differenzierte Mammakarzinome [32, 66], siehe Tabelle 1.1.

Hormonrezeptorstatus

Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus für den ER bzw. für den PR erfolgte nach dem IRS nach Remmele [89], siehe Tabelle 1.3. Eine HER2-Positivität lag vor, wenn sich immunhistochemisch eine Proteinüberexpression (Score 3+) oder eine Genamplifikation mittels SISH bei einem Score von 2+ nachweisen ließen. Eine Nachbeurteilung der jeweiligen Scores war nicht notwendig.

Nottingham-Prognose-Index

Unter Berücksichtigung des zusätzlich erhobenen Tumordurchmessers, des Lymphknotenstatus und des Gratings konnte der NPI für 140 Patientinnen berechnet werden [46], siehe Tabelle 1.4, während dies für 8 Patientinnen aufgrund der mangelnden Datenlage bezüglich der Tumorgöße nicht möglich war. Zur Prognoseabschätzung

wurden die Patientinnen anhand des errechneten Wertes in die sechs prognostischen Gruppen eingeteilt, beginnend mit einer sehr guten bis hin zu einer sehr schlechten Prognose [16], siehe Tabelle 1.5.

Prognoseparameter

Alle verfügbaren klinisch-pathologischen Parameter wurden in Hinblick auf das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben analysiert. Im nachstehenden Abschnitt werden wichtige Begriffe in Bezug auf die Prognose definiert.

Das Gesamtüberleben ist definiert als Zeitspanne zwischen der Erstdiagnose des Primärtumors und dem Todesdatum unabhängig von der Todesursache.

Das rezidivfreie Überleben ist definiert als Zeitspanne zwischen der Erstdiagnose des Primärtumors und dem Wiederauftreten eines Lokalrezidivs oder einer Metastase.

Als Lokalrezidiv wurde in dieser Arbeit das erneute Auftreten des Mammakarzinoms im Bereich des Operationsgebiets gezählt, wenn das Karzinom vollständig operativ entfernt wurde und ein krankheitsfreies Intervall aufzeigte. Als metachrone Metastasen wurden Fernmetastasen definiert, die nach einer operativen Therapie zu einem späteren Zeitpunkt auftraten.

Patientinnen, die bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine Metastase (M1), welche nicht vollständig reseziert wurde, aufzeigten, wurden in die Berechnung bezüglich des rezidivfreien Überlebens nicht mit einbezogen.

Es wurden Patientinnen von der Berechnung bezüglich des rezidivfreien Überlebens ausgeschlossen, die bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine Metastase (M1) aufzeigten, die anschließend nicht vollständig reseziert wurde.

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenauswahl

Die Patientinnen wurden mithilfe des Informationssystems der digitalen Pathologie (IS-P)(imassense Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) ermittelt und unter Berücksichtigung der vollständigen histologischen Befunde des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg ausgewählt. Anschließend wurden die zu den Patientinnen dazugehörigen Paraffinblöcke und Schnittpräparate der Tumoren mithilfe der Histologienummern aus dem Pathologiearchiv herausgesucht. Anhand der HE-gefärbten Schnittpräparate wurden die Paraffinblöcke identifiziert, welche ausreichend Tumormaterial enthielten. Von diesen Paraffinblöcken wurden dann Schnittpräparate für die immunhistochemische Untersuchung angefertigt.

3.2.2 Anfertigung mikroskopischer Schnittpräparate

Die Anfertigung der Paraffinleerschnitte erfolgte mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Dafür wurden die Paraffinblöcke auf Eis gekühlt und in 2 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden im Anschluss in einem 39 °C warmen Wasserbad (VEB Ilm Labor, Ilmenau, Deutschland) geglättet und auf einen Objektträger (SuperFrost, Thermo Fisher Scientific Messtechnik GmbH, München, Deutschland) aufgezogen. Zur Verbesserung der Haftung am Objektträger sowie zum Trocknen wurden diese Leerschnitte über Nacht bei 60 °C in einem Brutschrank (BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert.

3.2.3 Entparaffinierung und Vorbehandlung

Für die Entparaffinierung wurden die Leerschnitte dreimal für 5 Minuten in Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und danach jeweils für 3 Minuten zweimal in 100 % igem, einmal in 96 % igem und einmal in 75 % igem Ethanol (MERCK, Darmstadt, Deutschland) zur Rehydrierung überführt. Anschließend wurden die Schnittpräparate dreimal mit Aqua destillata gespült.

Zur Antigendemaskierung fand in dem Pascal-Drucktopf (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) in 0,01 M Natrium-Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 eine Vorbehandlung statt. Die Schnittpräparate wurden dabei unter Druck für 10 Sekunden auf 120 °C erhitzt.

3.2.4 Immunhistochemische Färbung

Der immunhistochemischer Färbeablauf zur Darstellung von NNAT erfolgte nach dem Peroxidase-Anti-Peroxidase-System (PAP) und wurde per Hand durchgeführt, siehe Abbildung 3.1. Zur Herabsetzung der Oberflächenspannung wurden die Paraffinleerschnitte dreimal für jeweils 5 Minuten mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) gespült. Danach erfolgte das Auftragen von 100 µl des polyklonalen Immunglobulin Kaninchen Anti-Neuronatin Primärantikörpers (Nummer ab27266, abcam, Cambridge, Großbritannien) in einer Verdünnung 1:100 mit Antikörperverdünnungspuffer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA).

Die Inkubation der Schnittpräparate mit dem Primärantikörper wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Erneut erfolgte eine dreimalige Spülung mit TRIS für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurde der mit Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper, ein polyklonales Ziegen Anti-Kaninchen Immunglobulin/HRP (Nummer P0448, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.

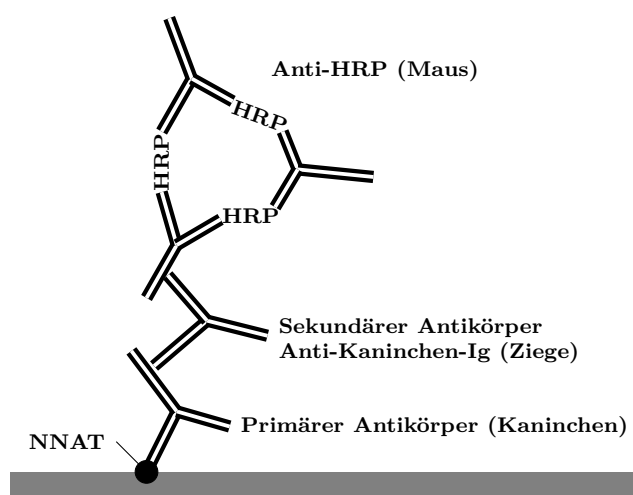


Abb. 3.1 Peroxidase-Anti-Peroxidase-System.

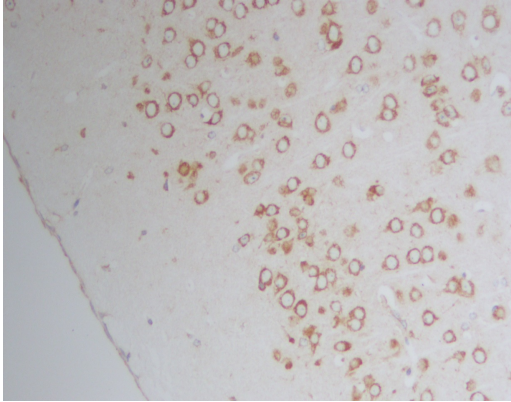
Danach wurden die Schnittpräparate abermals dreimal für jeweils 5 Minuten mit TRIS gespült. Abschließend wurden die Schnitte für jeweils 5 Minuten mit einer 1:50 verdünnten Diaminobenzindinlösung (DAB, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), bestehend aus 20 µl DAB+ Chromogen und 1 ml DAB+ Substratpuffer (Nummer K3468, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Zum Beenden der Färbereaktion wurden die Schnittpräparate 5 Minuten in Aqua destillata gestellt. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne für 1 Minute in Hämalaun nach Mayer und eine Spülung mit Aqua destillata. Zum Bläuen wurden die Schnittpräparate dann 5 Minuten mit lauwarmen Leitungswasser gespült. Danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (75 %, 96 %, 2×100 %) dehydriert. Nachdem die Schnittpräparate zweimal für jeweils 5 Minuten in Xylol platziert wurden, erfolgte das Eindecken mit Corbit-Balsam (Hecht-Mertens, Kiel, Deutschland) und einem Deckgläschen.

3.2.5 Positiv- und Negativkontrolle

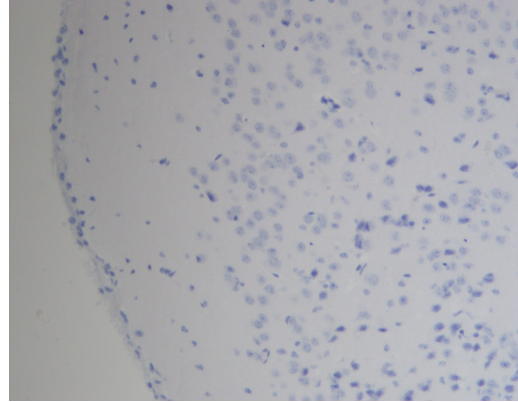
Als Positivkontrolle wurde auf jeden zehnten Objektträger zusätzlich ein Paraffinschnitt von Maushirngewebe entsprechend der Herstellerempfehlung aufgezogen und mitgefärbt, siehe Abbildung 3.2 a. Als Negativkontrolle der Spezifität der Färbung wurden Schnittpräparate mitgeführt, auf die anstatt des Primärantikörpers nur TRIS aufgebracht wurde, siehe Abbildung 3.2 b.

3.2.6 Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion

Die NNAT-Expression der Schnittpräparate wurde lichtmikroskopisch beurteilt. Es wurde zum einen die Färbeintensität der zu untersuchenden Zellen und zum anderen der Prozentsatz an positiven Zellen bestimmt. Mammakarzinomgewebe, Anteile vom

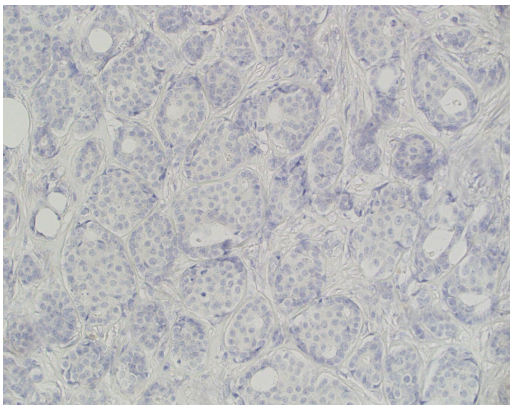


a. Positivkontrolle ($\times 200$).

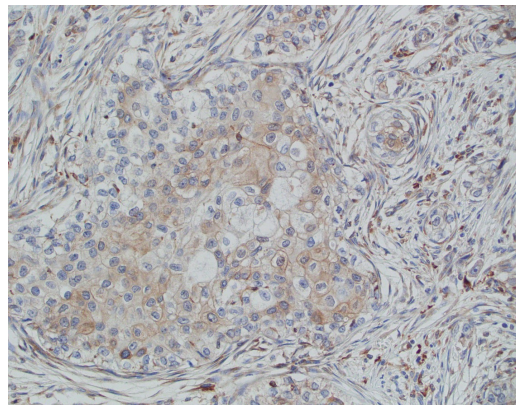


b. Negativkontrolle ($\times 200$).

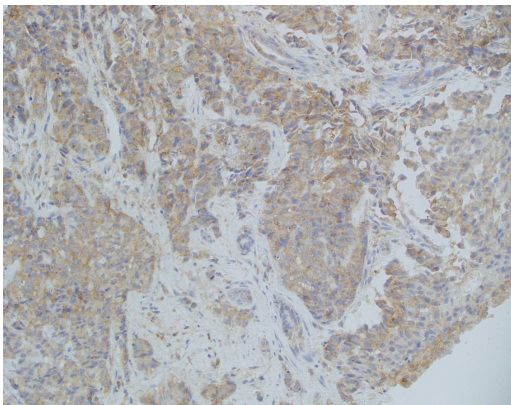
Abb. 3.2 Positiv- und Negativkontrolle.



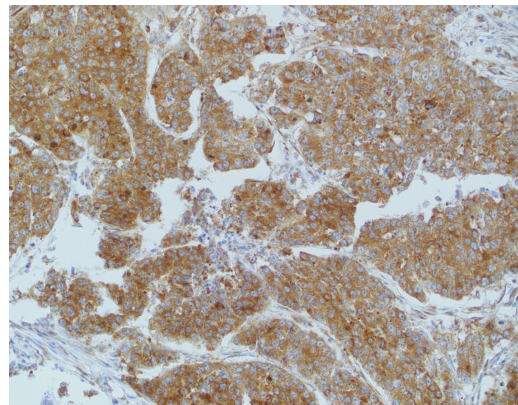
a. Färbeintensität 0 ($\times 200$).



b. Färbeintensität 1 ($\times 200$).



c. Färbeintensität 2 ($\times 200$).



d. Färbeintensität 3 ($\times 200$).

Abb. 3.3 Intensität der NNAT-Expression.

Carcinoma in situ und normales Brustdrüsenparenchym wurden beurteilt.

Die Färbeintensität reicht von keiner Anfärbung (0) über schwache (1) und mäßige (2) bis hin zur starken (3) Positivität, siehe Abbildung 3.3. Zur Umsetzung des Scoring-Modells wurden die dafür vergebenen Punktwerte mit dem ermittelten Prozentsatz an positiven Zellen multipliziert. Um kleinere Zahlenwerte für eine anschaulichere Auswertung zu erhalten wurde das Produkt anschließend durch 10 geteilt. Der sich daraus ergebende IRS variiert somit zwischen 0 und 30. Dieser IRS wurde gleichermaßen für die Mammakarzinome, die In-situ-Komponente und das normale Brustdrüsenparenchym angewandt.

Die Fotodokumentation erfolgte mit dem Lichtmikroskop Zeiss Axioplan (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) in einer 100-, 200- bzw. 400-fachen Vergrößerung und mit aufgesetzter Kamera Olympus DP26 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland).

3.2.7 Statistische Methoden

Mithilfe der Software SPSS Version 22 (IBM SPSS Statistics, International Business Machines Corporation, Chicago, USA) wurde die statistische Analyse durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem p -Wert von $p < 0,05$ angenommen.

Mit Kreuztabellen und dem χ^2 -Test nach Pearson [83] wurden die Häufigkeiten und die Korrelation der NNAT-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern beurteilt. Die weitere statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung des Student's t -Tests und des Differenzen- t -Tests für paarweise zugeordnete Werte unabhängiger und abhängiger Stichproben. Zur Ermittlung eines optimalen Schwellenwertes (Cut-off-Wert) für die NNAT-Expression, welcher zwischen einer Niedrig- und Hoch-Risikogruppe im weiteren Verlauf diskriminiert, wurde eine receiver operating characteristics (ROC)-Kurvenanalyse durchgeführt. Um einen Zusammenhang zwischen der NNAT-Expression in Mammakarzinomen, im Carcinoma in situ und im normalen Brustdrüsenparenchym festzustellen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson vorgenommen. Die Darstellung von Boxplot-Diagrammen erfolgte unter Angabe der Mediane, der 25 %- und der 75 %-Perzentile ohne Berücksichtigung der Ausreißer.

Das Follow-up wurde vom Zeitpunkt der Erstdiagnose an bestimmt. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten für das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben wurden nach der Kaplan-Meier-Methode (log rank) errechnet, wobei die Kaplan-Meier-Kurven die statistische Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeiten des Patientenkollektivs graphisch darstellen. Berechnungsziele waren die 3-, 5- und 10-Jahres-Gesamtüberlebensrate sowie die rezidivfreie 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebensrate.

Zusätzlich wurden Analysen zur Korrelation der klinisch-pathologischen Faktoren

und des Gesamt- bzw. rezidivfreien Überlebens nach dem univariaten Cox-Regression-Modell durchgeführt. Die Parameter, die in der univariaten Analyse ein signifikantes Ergebnis aufwiesen, wurden anschließend als Covariate in der multivariaten Analyse nach dem Cox-Regression-Modell gleichzeitig gegeneinander auf klinische Relevanz hin überprüft.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Klinisch-pathologische Daten des Patientenkollektivs

Das untersuchte Kollektiv bestand aus 148 Patientinnen mit einem mittleren Alter von 64,3 Jahren (SD: $\pm 13,3$). Zum Diagnosezeitpunkt war die jüngste Patientin 29 Jahre und die älteste 97 Jahre alt. 120 Patientinnen (81,1 %) befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in der Menopause, 28 Patientinnen (18,9 %) waren prämenopausal. Das verwendete Untersuchungsmaterial lag in 116 Fällen (78,4 %) als Resektat und in 32 Fällen (21,6 %) als Stanzbiopsie vor. Bei allen 148 Patientinnen wurde ein invasives Mammakarzinom untersucht. Davon ließen sich 116 Fälle (78,4 %) einem Invasiven Karzinom, kein spezieller Typ (NST) zuordnen. Das zweithäufigste Karzinom, das untersucht wurde, war das Invasiv lobuläre Karzinom mit 23 Fällen (15,5 %). In den verbliebenen 9 Fällen (6,1 %) litten die Patientinnen unter Karzinomen unterschiedlichsten Typs: 6 Muzinöse Karzinome, 1 Metaplastisches Karzinom, 1 Karzinom mit neuroendokriner Differenzierung und 1 Invasiv papilläres Karzinom. Bei 57 Patientinnen (38,5 %) konnte zusätzlich zum invasiven Mammakarzinom auch ein Carcinoma in situ untersucht werden. Diese Fälle unterteilten sich wiederum in 48 DCIS und 9 CLIS. Ebenfalls bestimmt wurde die Anzahl der Karzinomherde in einer Brust. Dabei zeigten sich in 125 Fällen (84,5 %) ein einzelner Herd und in 23 Fällen (15,5 %) mehrere Herde, wobei 12 Patientinnen (8,1 %) ein multizentrisches und 11 Patientinnen (7,4 %) ein multifokales Mammakarzinom aufwiesen. In 140 Fällen (94,6 %) konnte der exakte Tumordurchmesser ermittelt werden. Im Mittel lag dieser bei 24,0 mm (SD: $\pm 20,9$). Der kleinste Durchmesser betrug 6 mm und der größte 200 mm. Alle weiteren klinisch-pathologischen Daten der 148 Patientinnen mit einem Mammakarzinom sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 zusammengefasst.

Vergleicht man die in der Einleitung unter 1.1.1 und 1.1.3 erwähnten aktuellen

epidemiologischen und pathologischen Fakten mit denen der hier untersuchten Patientinnen, so zeigt sich ein repräsentatives Kollektiv.

4.2 Prognoseparameter

4.2.1 Klinisch-pathologische Prognoseparameter

Im Untersuchungszeitraum verstarben 34 (23 %) von 148 Patientinnen. Die Todesursache war in 30 Fällen (20,3 %) tumorassoziiert, in den verbliebenen 4 Fällen (2,7 %) konnten andere Ursachen eruiert werden. Das mittlere Follow-up aller 148 Patientinnen betrug 91,6 Monate (Umfang: 2–181, SD: $\pm 49,6$). Für das gesamte Patientinnenkollektiv ergab sich eine durchschnittliche Gesamtüberlebenszeit von 145,3 Monaten (SD: $\pm 5,4$). Die 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrugen 87,0 %, 81,0 % und 75,6 %.

Von den 148 Patientinnen bekamen 18 (12,2 %) im Follow-up nach durchschnittlich 31,2 Monaten (Umfang: 5–111, SD: $\pm 26,0$) ein Lokalrezidiv. Metachrone Metastasen traten bei 22 (14,9 %) der 148 Patientinnen im Beobachtungszeitraum im Mittel nach 37,6 Monaten (Umfang: 2–137, SD: $\pm 35,1$) auf, wobei in je 4 Fällen Knochen- bzw. Fernlymphknotenmetastasen, in 3 Fällen Lebermetastasen, in 2 Fällen Lungenmetastasen und in je einem Fall Haut-, Gehirn-, Pleura- bzw. Ovarmetastasen vorlagen. Simultane metachrone Metastasen fanden sich bei 3 Patientinnen in Lunge und Knochen sowie bei jeweils einer Patientin in Knochen und Leber bzw. in Knochen, Leber und Lunge. Insgesamt bildeten sich bei 36 Patientinnen (24,3 %) des Gesamtkollektivs ein Lokalrezidiv und/oder eine metachrone Metastase.

Die Kaplan-Meier-Analyse ergab, dass die nachfolgenden klinisch-pathologischen Parameter signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben korrelierten, siehe Tabelle 4.1: eine fortgeschrittene lokale Tumorausdehnung (pT1–pT4) bzw. ein fortgeschrittenes UICC-Stadium (I–IV), ein positiver Lymphknotenstatus (pN0 vs. pN1–3), das Vorhandensein von Fernmetastasen (M0 vs. M1), der Nachweis einer Lymph- (L0 vs. L1) oder Blutgefäßinfiltration (V0 vs. V1), ein geringer Differenzierungsgrad (G1–G3), das Auftreten von metachronen Metastasen und eines Lokalrezidivs. Auch ohne Signifikanznachweis konnte bei einem negativen ER- bzw. PR-Status und bei einem positiven HER2-Status ein kürzeres Gesamtüberleben beobachtet werden. Bei den 24 Patientinnen (16,2 %) mit einem triple-negativen Mammarkarzinom konnte mit 120,0 Monaten (SD: $\pm 13,2$) im Vergleich zu den übrigen Patientinnen mit 142,8 Monaten (SD: $\pm 6,3$) eine kürzere Überlebenszeit festgestellt werden. Der p -Wert betrug hier jedoch lediglich 0,617. Im Ergebnis der Analyse zeigte der Menopausenstatus keine signifikante Relevanz bezüglich des Gesamtüberlebens der Patientinnen.

Tab. 4.1 Gesamtüberleben und Neuronatin-Expression unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Faktoren.

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	3-JÜR [%]	5-JÜR [%]	10-JÜR [%]	Gesamtüberleben [Monate]				NNAT (IRS)	
					Mittelwert	Standard-Fehler	95 %-CI	p	Mittelwert	p
Menopausenstatus	148									
prämenopausal	28 (18,9)	89,3	85,7	77,9	150,4	11,2	128,5 – 172,4	0,639	8,6 ± 7,7	0,988
postmenopausal	120 (81,1)	86,5	79,7	75,2	139,0	5,8	127,7 – 150,3		8,6 ± 6,6	
Histologischer Typ	148									
kein spezieller Typ (NST)	116 (78,4)	87,0	83,2	77,6	139,9	5,5	129,1 – 150,6	0,083	8,6 ± 7,0	0,314
Invasiv lobulär	23 (15,5)	91,3	78,0	78,0	147,2	12,1	123,4 – 171,0		7,5 ± 5,9	
anderer Typ	9 (6,1)	76,2	57,1	0	57,3	8,4	40,7 – 73,8		11,6 ± 6,0	
Tumorklassifikation										
<i>Tumorausdehnung</i>	148									
pT1	82 (55,4)	95,1	93,8	90,7	161,1	4,7	152,0 – 170,2	< 0,001	7,7 ± 6,3	0,274
pT2	51 (34,5)	79,9	71,2	64,5	128,2	10,0	108,5 – 147,8		9,5 ± 7,3	
pT3	5 (3,4)	80,0	60,0	40,0	82,6	18,1	47,1 – 118,1		9,0 ± 3,7	
pT4	10 (6,8)	60,0	40,0	40,0	58,0	13,2	32,0 – 83,9		11,3 ± 8,7	
<i>Tumorgroße</i>	148									
Tumor ≤ 2 cm	82 (55,4)	95,0	93,7	90,6	160,9	4,7	151,6 – 170,2	< 0,001	7,8 ± 6,3	0,108
Tumor > 2 cm	66 (44,6)	77,3	65,7	58,3	119,6	9,1	101,8 – 137,5		9,6 ± 7,3	
<i>Lymphknotenmetastasen</i>	148									
pN0	103 (69,6)	90,2	84,6	82,0	147,8	5,6	136,8 – 158,8	0,005	8,5 ± 6,9	0,564
pN1	22 (14,9)	86,4	81,8	81,8	137,6	11,1	115,9 – 159,4		8,2 ± 6,1	
pN2	13 (8,8)	76,9	61,5	35,9	85,6	13,7	58,8 – 112,5		11,0 ± 5,3	
pN3	10 (6,8)	70,0	70,0	58,3	117,4	24,7	69,1 – 165,7		7,3 ± 9,0	
<i>Lymphknotenstatus</i>	148									
pN0 (negativ)	103 (69,6)	90,2	84,6	82,0	147,8	5,6	136,8 – 158,8	0,028	8,5 ± 6,9	0,788
pN1/2/3 (positiv)	45 (30,4)	80,0	73,1	62,3	128,4	10,6	107,6 – 149,2		8,8 ± 6,6	
<i>Fernmetastasen</i>	148									
M0	131 (88,5)	90,7	86,4	82,2	155,1	5,0	145,2 – 164,9	< 0,001	8,2 ± 6,5	0,051
M1	17 (11,5)	58,8	39,7	26,5	69,0	15,7	38,3 – 99,8		11,6 ± 8,2	
<i>Veneninfiltration</i>	148									
V0	124 (83,8)	90,2	85,7	81,3	153,7	5,3	143,3 – 164,0	< 0,001	8,4 ± 6,4	0,606
V1	24 (16,2)	70,8	56,1	44,8	95,3	14,9	66,1 – 124,6		9,2 ± 8,6	
<i>Lymphgefäßinfiltration</i>	148									
L0	87 (58,8)	93,0	87,6	84,5	152,2	5,6	141,3 – 163,1	0,006	8,1 ± 6,6	0,269
L1	61 (41,2)	78,6	71,6	63,4	127,8	9,4	109,3 – 146,3		9,3 ± 7,1	

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	3-JÜR [%]	5-JÜR [%]	10-JÜR [%]	Gesamtüberleben [Monate]				NNAT (IRS)	
					Mittelwert	Standard-Fehler	95 %-CI	p	Mittelwert	p
Tumorstadium (UICC)	148									
Stadium I	62 (41,9)	98,4	98,4	96,4	169,2	3,3	162,7 – 175,7	< 0,001	7,3 ± 6,2	0,114
Stadium II	51 (34,5)	85,9	77,2	74,7	131,9	8,4	115,5 – 148,4		9,2 ± 6,9	
Stadium III	18 (12,1)	78,9	73,3	53,8	119,5	16,5	87,0 – 151,7		8,4 ± 6,4	
Stadium IV	17 (11,5)	56,3	35,7	28,6	69,9	16,8	37,0 – 102,8		11,7 ± 8,4	
Grading	148									
G1	22 (14,9)	100	100	100	(*)	(*)	(*)	< 0,001	7,0 ± 5,3	0,067
G2	81 (54,7)	91,2	84,4	81,5	153,5	6,4	140,9 – 166,1		7,9 ± 6,4	
G3	45 (30,4)	73,2	66,0	54,9	109,5	10,6	88,7 – 130,3		10,5 ± 7,8	
Hormonrezeptorstatus										
<i>Östrogenrezeptor</i>	148									
negativ	34 (23,0)	82,2	76,2	65,5	124,8	11,1	103,1 – 146,8	< 0,199	9,5 ± 7,3	0,381
positiv	114 (77,0)	88,5	82,3	78,9	149,1	5,9	137,6 – 160,7		8,3 ± 6,6	
<i>Progesteronrezeptor</i>	148									
negativ	62 (41,9)	85,3	78,0	67,3	127,7	8,2	111,8 – 143,7	< 0,149	9,0 ± 6,7	0,478
positiv	86 (58,1)	88,3	82,9	81,5	151,7	6,6	138,8 – 164,7		8,2 ± 6,9	
<i>HER2-Status</i>	148									
negativ	117 (79,1)	90,5	83,7	78,1	149,6	5,7	138,4 – 160,8	< 0,111	8,4 ± 6,6	0,491
positiv	31 (20,9)	73,9	70,4	66,7	121,5	12,4	97,2 – 145,7		9,3 ± 7,5	
NPI	140									
exzellent	15 (10,7)	100	100	100	(*)	(*)	(*)	< 0,001	7,6 ± 5,3	0,043
gut	43 (30,7)	100	100	96,8	170,4	3,6	163,4 – 177,4		6,9 ± 6,5	
mäßig I	39 (27,9)	87,1	79,0	79,0	138,6	9,1	120,4 – 156,8		7,7 ± 5,8	
mäßig II	22 (15,7)	67,6	58,0	52,7	99,1	14,9	70,0 – 128,1		12,3 ± 8,2	
schlecht	13 (9,3)	100	84,6	69,2	143,2	15,8	112,3 – 174,0		8,2 ± 6,2	
sehr schlecht	8 (5,7)	50,0	50,0	16,7	54,2	13,7	27,3 – 81,0		11,3 ± 8,7	
Metachrone Metastasen	148									
negativ	126 (85,1)	92,0	88,4	87,5	161,8	4,7	152,7 – 170,9	< 0,001	7,8 ± 6,6	0,001
positiv	22 (14,9)	59,1	40,9	18,2	60,8	9,2	42,6 – 78,7		13,1 ± 6,5	
Lokalrezidiv	148									
negativ	130 (87,8)	87,6	83,2	79,8	150,6	5,5	139,9 – 161,3	< 0,009	8,4 ± 6,9	0,298
positiv	18 (12,2)	83,3	66,7	50,0	103,1	13,9	75,9 – 130,3		10,1 ± 5,9	

Legende: Mit (*) markierte Einträge sind aufgrund einer 100 %-igen Überlebensrate nicht definiert.

Tab. 4.2 Rezidivfreies Überleben unter Berücksichtigung der klinisch-pathologischen Faktoren.

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	3-JÜR [%]	5-JÜR [%]	10-JÜR [%]	Rezidivfreies Überleben [Monate]			
					Mittelwert	Standard-Fehler	95 %-CI	p
Menopausenstatus	131							
prämenopausal	24 (18,3)	91,7	83,1	83,1	157,5	11,2	135,5 – 179,5	0,523
postmenopausal	107 (81,7)	85,3	80,6	78,7	142,9	6,0	131,0 – 161,7	
Histologischer Typ	131							
kein spezieller Typ (NST)	101 (77,1)	89,6	83,6	81,8	145,1	5,5	134,4 – 155,8	0,021
Invasiv lobulär	21 (16,0)	81,0	81,0	81,0	148,1	13,5	121,7 – 174,7	
anderer Typ	9 (6,9)	66,7	53,3	0	39,5	5,5	28,6 – 50,4	
Tumorklassifikation								
<i>Tumorausdehnung</i>	131							
pT1	77 (58,8)	92,1	89,0	89,0	157,6	5,5	146,9 – 168,4	0,010
pT2	44 (33,6)	80,3	72,0	68,2	133,9	11,0	112,3 – 155,6	
pT3	4 (3,0)	75,0	50,0	50,0	83,5	21,5	41,3 – 125,7	
pT4	6 (4,6)	62,5	62,5	0	47,0	11,3	24,9 – 69,2	
<i>Tumorgröße</i>	131							
Tumor ≤ 2 cm	77 (58,8)	92,1	89,0	89,0	157,6	5,5	146,9 – 168,4	0,002
Tumor > 2 cm	54 (41,2)	78,0	68,8	68,8	129,4	10,3	109,1 – 149,7	
<i>Lymphknotenmetastasen</i>	131							
pN0	95 (72,5)	89,0	85,1	83,1	149,6	5,8	138,2 – 158,8	0,051
pN1	22 (16,8)	85,7	80,4	80,4	135,8	11,8	112,7 – 159,4	
pN2	9 (6,9)	66,7	44,4	44,4	83,7	18,7	47,1 – 112,5	
pN3	5 (3,8)	80,0	80,0	80,0	146,8	31,5	85,5 – 208,5	
<i>Lymphknotenstatus</i>	131							
pN0 (negativ)	95 (72,5)	89,0	85,1	83,1	149,6	5,8	138,2 – 160,9	0,143
pN1/2/3 (positiv)	36 (27,7)	80,0	70,7	70,7	137,4	11,9	113,9 – 160,8	
<i>Veneninfiltration</i>	131							
V0	123 (93,9)	85,7	79,9	78,4	148,9	5,9	137,4 – 160,4	0,203
V1	8 (6,1)	100	100	100	(*)	(*)	(*)	
<i>Lymphgefäßinfiltration</i>	131							
L0	82 (62,6)	88,7	84,3	82,1	148,1	6,3	135,8 – 160,5	0,408
L1	49 (37,4)	82,6	75,3	75,3	144,3	9,9	124,8 – 163,8	

Klinisch-pathologischer Faktor	n (%)	3-JÜR [%]	5-JÜR [%]	10-JÜR [%]	Rezidivfreies Überleben [Monate]			
					Mittelwert	Standard-Fehler	95 %-CI	p
Tumorstadium (UICC)	131							
Stadium I	62 (47,3)	93,5	91,7	91,7	161,3	5,5	150,6 – 172,0	0,003
Stadium II	51 (38,9)	83,1	75,6	71,9	130,1	8,9	112,5 – 147,6	
Stadium III	18 (13,8)	70,8	57,7	57,7	117,5	18,8	80,7 – 154,3	
Grading	131							
G1	22 (16,8)	100	100	100	(*)	(*)	(*)	0,016
G2	77 (58,8)	85,2	80,8	80,8	150,4	7,3	136,1 – 164,8	
G3	32 (24,4)	79,5	67,6	62,5	119,8	12,0	96,4 – 143,3	
Hormonrezeptorstatus								
<i>Östrogenrezeptor</i>	131							0,568
negativ	29 (22,1)	81,3	73,6	73,6	132,4	11,9	109,1 – 155,8	
positiv	102 (77,9)	87,9	83,1	81,2	152,9	6,2	140,8 – 165,1	
<i>Progesteronrezeptor</i>	131							0,272
negativ	55 (42,0)	84,7	75,7	72,6	133,6	8,5	116,9 – 150,3	
positiv	76 (58,0)	87,9	84,6	84,6	155,8	6,9	142,1 – 169,3	
<i>HER2-Status</i>	131							0,941
negativ	108 (82,4)	87,4	80,8	79,0	150,5	6,1	138,4 – 162,5	
positiv	23 (17,6)	82,2	82,2	82,2	141,0	12,7	116,1 – 165,9	
NPI	127							
exzellent	15 (11,8)	100	100	100	(*)	(*)	(*)	< 0,001
gut	43 (33,9)	93,0	90,3	90,3	159,3	7,0	145,5 – 173,0	
mäßig I	36 (28,3)	85,2	78,9	78,9	136,0	10,0	116,3 – 155,6	
mäßig II	20 (15,7)	66,2	60,2	51,6	103,1	15,9	72,2 – 134,2	
schlecht	9 (7,1)	88,9	88,9	88,9	165,8	15,3	135,8 – 195,8	
sehr schlecht	4 (3,2)	75,0	0	0	40,8	13,0	15,3 – 66,2	

Legende: Mit (*) markierte Einträge sind aufgrund einer 100 %-igen Überlebensrate nicht definiert.

Für die Analyse des rezidivfreien Überlebens standen nur 131 Fälle von 148 zur Verfügung. Ausgeschlossen wurden 17 Patientinnen, bei denen zum Diagnosezeitpunkt eine Metastase vorlag, welche nicht vollständig reseziert wurde. Die rezidivfreie Überlebenszeit ab dem Diagnosezeitpunkt betrug im Durchschnitt 150,7 Monate (SD: $\pm 5,6$). Die 3-, 5- und 10 Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten für das rezidivfreie Überleben beliefen sich für die 131 Patientinnen auf 86,5 %, 81,0 % und 79,6 %.

Für das rezidivfreie Überleben konnte die Kaplan-Meier-Analyse für die folgenden klinisch-pathologischen Faktoren ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben nachweisen, siehe Tabelle 4.2: eine fortgeschrittene lokale Tumorausdehnung (pT1–pT4) bzw. ein fortgeschrittenes UICC-Tumorstadium (I–IV) und ein geringer Differenzierungsgrad (G1–G3). Bei einem positiven ER- bzw. PR-Status bzw. einem negativen HER2-Status zeigte sich ebenfalls ein kürzeres rezidivfreies Überleben, jedoch ohne Signifikanz. Keine signifikante Relevanz für das rezidivfreie Überleben zeigten der Menopausenstatus, der Lymphknotenstatus (pN0 vs. pN1–3) sowie der Nachweis von Lymph- (L0 vs. L1) bzw. Blutgefäßeinbrüchen (V0 vs. V1).

4.2.2 Nottingham-Prognose-Index

Anhand des NPI, siehe Tabelle 1.4 [46], welcher sich aus dem Tumordurchmesser, dem Lymphknotenstatus und dem Grading berechnen lässt, wurden 140 Fälle sechs prognostischen Gruppen zugeordnet, siehe Tabelle 1.5 [16], welche anschließend nach der Kaplan-Meier-Methode analysiert wurden, siehe Tabellen 4.1 und 4.2. Dabei zeigten das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben jeweils eine hochsignifikante prognostische Relevanz ($p < 0,001$). Ein niedriger NPI geht mit einer hohen Überlebenswahrscheinlichkeit und einer daraus resultierenden guten Prognose einher. Dem gegenüber ist ein hoher NPI mit einer niedrigen Überlebenswahrscheinlichkeit und einer schlechten Prognose assoziiert. In Bezug auf das Gesamtüberleben bzw. das rezidivfreie Überleben zeigte die laut NPI schlechte Prognosegruppe, abweichend vom NPI, in dem hier untersuchten Kollektiv eine gute bzw. mäßiggradige Prognose.

Das Gesamtüberleben betrug in der guten Prognosegruppe im Mittel 170,4 Monate, in der mäßigen Prognosegruppe 138,6 Monate und in der sehr schlechten Prognosegruppe 54,2 Monate, siehe Abbildung 4.1.

Bei der Analyse des rezidivfreien Überlebens fand sich in den Gruppen mit sehr schlechter Prognose im Mittel mit 40,8 Monaten ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben als bei Patientinnen mit mäßiger Prognose bzw. guter Prognose mit einem jeweiligen mittleren rezidivfreien Überleben von 136,0 Monaten bzw. 159,3 Monaten, siehe Abbildung 4.2.

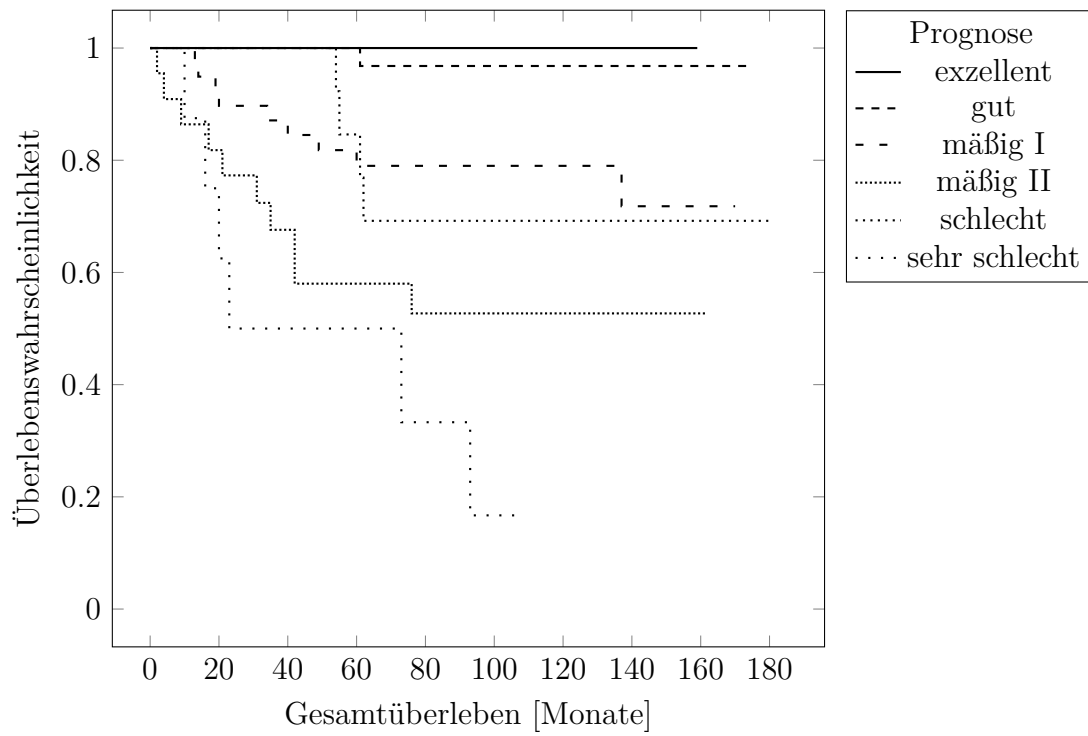


Abb. 4.1 Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom NPI.

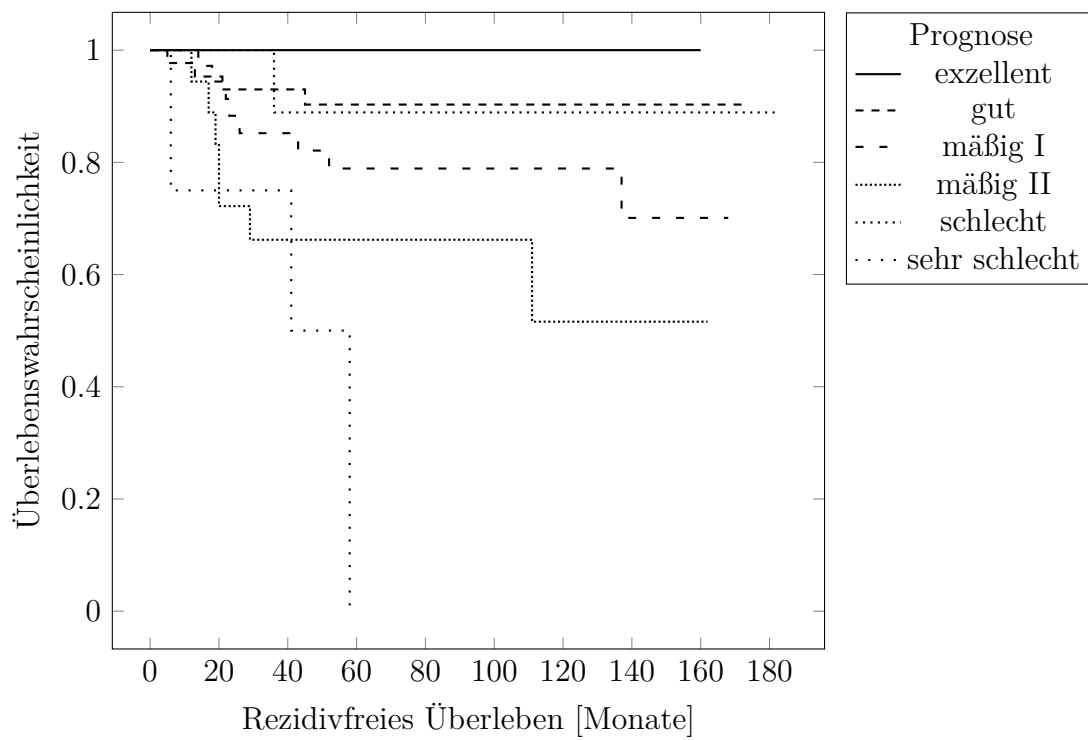


Abb. 4.2 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit vom NPI.

4.3 Immunhistochemische Expressionsanalyse

Die Expression von NNAT wurde bei allen 148 Patientinnen im invasiven Mammakarzinom untersucht. Zusätzlich konnte bei 57 (38,5 %) Fällen ein Carcinoma in situ und bei 91 (61,5 %) Fällen normales Brustdrüsenparenchym analysiert werden. Bei 48 (32,4 %) Patientinnen war sowohl die Auswertung des invasiven Mammakarzinoms und des Carcinoma in situs als auch des normalen Brustdrüsenparenchyms möglich.

Der IRS für NNAT betrug im Durchschnitt über alle invasiven Mammakarzinome 8,6 (Umfang: 0–28,5; SD: $\pm 6,8$). Im Carcinoma in situ war die Expression von NNAT im Mittel mit einem IRS von 9,5 (Umfang: 0–28,5; SD: $\pm 6,8$) etwas höher und im normalen Brustdrüsenparenchym mit einem IRS von 5,9 (Umfang: 0–28,5; SD: $\pm 6,0$) deutlich verringert.

Insgesamt zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied in der NNAT-Expression bezüglich des invasiven Mammakarzinoms, des Carcinoma in situ und des normalen Brustdrüsenparenchyms ($p < 0,001$), siehe Abbildung 4.3.

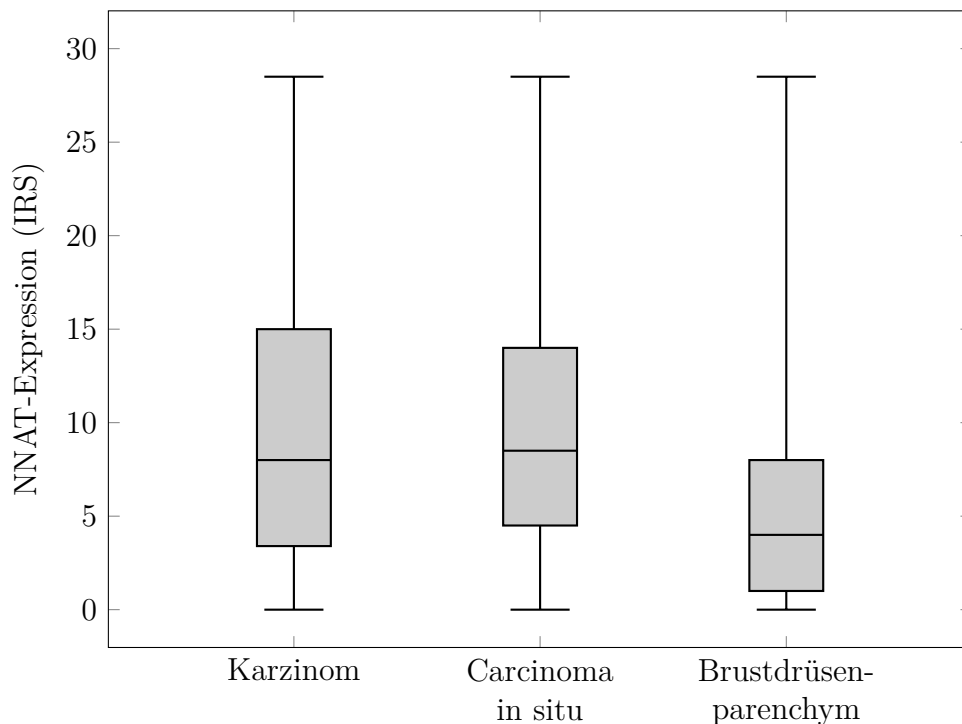


Abb. 4.3 NNAT-Expression im Karzinom, Carcinoma in situ und normalen Brustdrüsenparenchym.

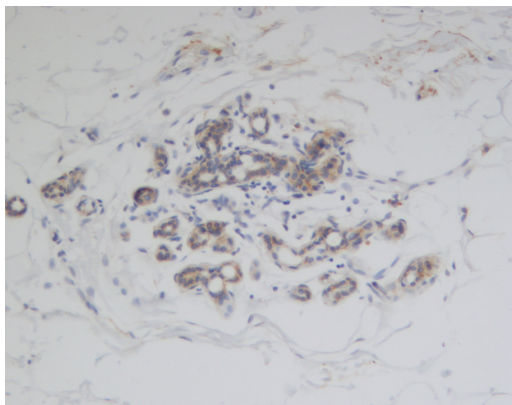
Im Paarvergleich konnte dabei eine hochsignifikante Korrelation der NNAT-Expression im invasiven Mammakarzinom und im Carcinoma in situ mit Hilfe des χ^2 -Tests nach Pearson [83] nachgewiesen werden ($r = 0,717$; $p < 0,001$). Weiterhin zeigte sich eine ebenfalls hochsignifikante Korrelation zwischen der Expression von NNAT

im invasiven Mammakarzinom und im normalen Brustdrüsenparenchym ($r = 0,649$; $p < 0,001$), sowie im Carcinoma in situ und im normalen Brustdrüsenparenchym ($r = 0,735$; $p < 0,001$).

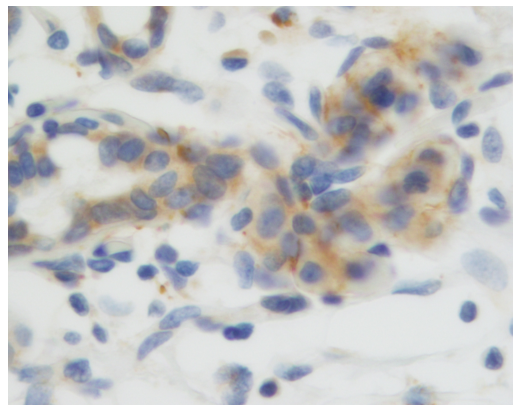
4.3.1 Expression von Neuronatin im Brustdrüsenparenchym

NNAT wurde in den Zellen des normalen Brustdrüsenparenchyms vor allem zytoplasmatisch exprimiert. Teilweise zeigte sich auch eine inkomplette Markierung der Zellmembran, eine nukleäre Expression fand sich nicht, siehe Abbildungen 4.4 a und 4.4 b.

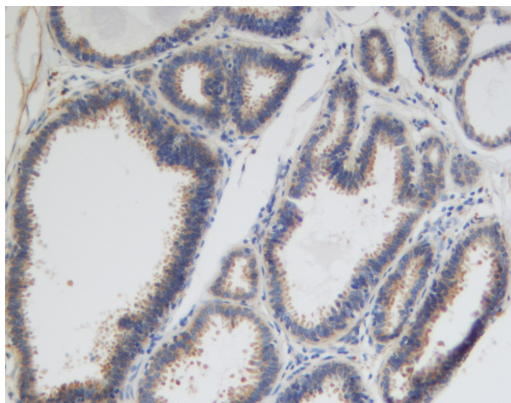
Neben normalem Brustdrüsenparenchym fand sich auch eine NNAT-Expression in benignen mastopathischen Veränderungen wie Skleradenose und Kolumnarzellmetaplasie, siehe Abbildungen 4.5 c und 4.5 d. Zudem konnte teilweise eine positive immunhistochemische Reaktion in Fibroblasten, Myoepithelzellen, Histiozyten, Riesenzellen und Schaumzellen beobachtet werden.



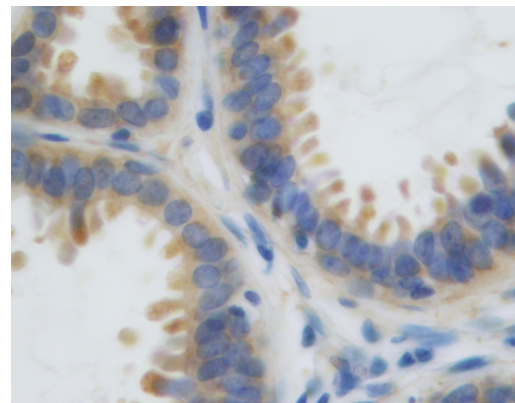
a. Normales Brustdrüsenparenchym ($\times 100$).



b. Normales Brustdrüsenparenchym ($\times 400$).



c. Kolumnarzellmetaplasie ($\times 100$).



d. Kolumnarzellmetaplasie ($\times 400$).

Abb. 4.4 NNAT-Expression im Brustdrüsenparenchym.

4.3.2 Expression von Neuronatin im Carcinoma in situ

Die atypisch proliferierten Epithelzellen des Carcinoma in situ zeigten überwiegend eine zytoplasmatische Expression von NNAT, wobei sich auch in wenigen Fällen eine inkomplette Anfärbung der Zellmembran nachweisen ließ. Eine nukleäre Positivität fand sich nicht. Die randlich bzw. zentral gelegenen, atypisch proliferierten Epithelzellen im Carcinoma in situ wiesen keinen Unterschied in der NNAT-Expression auf. Mit einem mittleren IRS von 9,6 (Umfang: 0-28,5; SD: $\pm 7,1$) für das DCIS und von 8,6 (Umfang: 0-17,0; SD: $\pm 5,3$) für das CLIS zeigten die beiden in situ Typen keine signifikante Diskrepanz bezüglich der NNAT-Expression ($p=0,689$), siehe Abbildung 4.5.

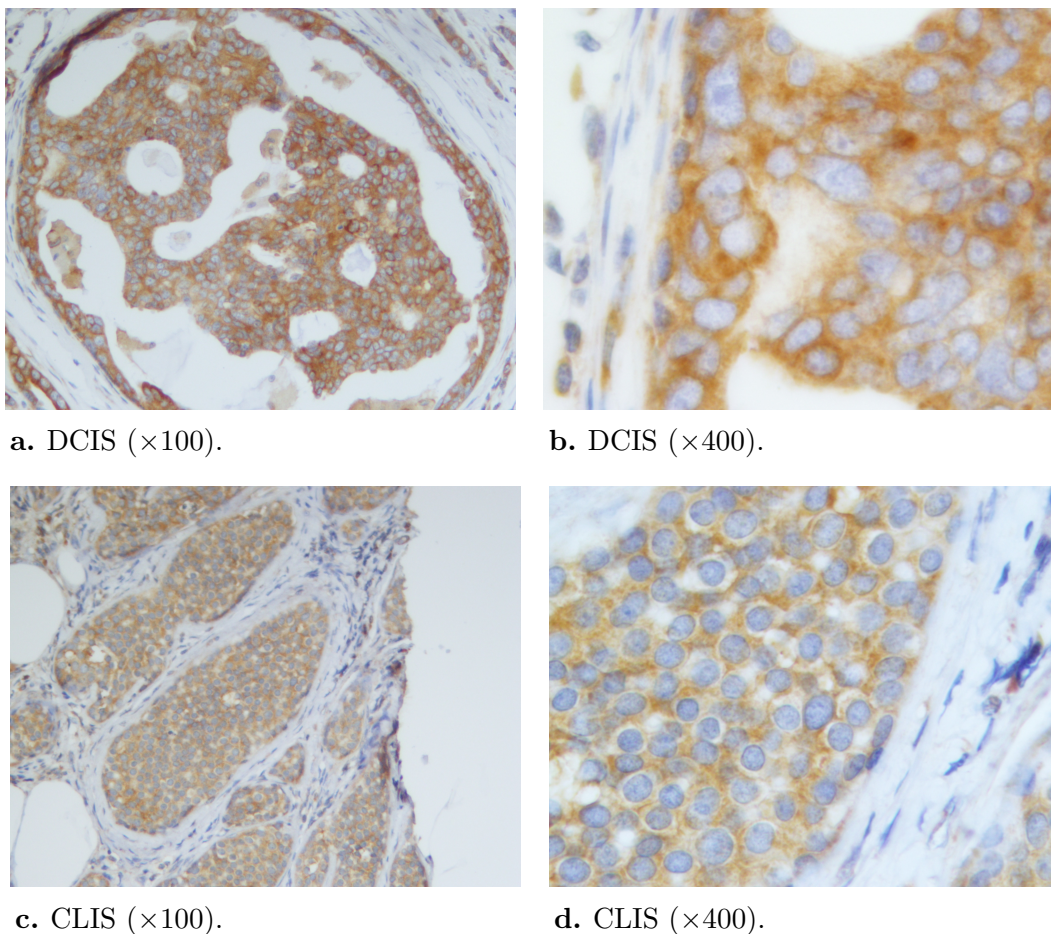


Abb. 4.5 NNAT-Expression im Carcinoma in situ.

4.3.3 Expression von Neuronatin im Mammakarzinom

Die invasiven Tumorzellen waren ebenso durch eine vornehmlich zytoplasmatische NNAT-Expression gekennzeichnet, aber auch hier fand sich abschnittsweise eine unvollständige Markierung der Zellmembran bei nukleärer Negativität. Einen Unterschied in der Expression von NNAT bezogen auf die zonale Verteilung der Tu-

morzellen (Tumorzentrum oder Invasionszone) ließ sich nicht erkennen. Das histologische Erscheinungsbild der Expression von NNAT unterscheidet sich in den verschiedenen Mammakarzinom-Typen nicht. So zeigte sich ein annähernd homogenes Expressionsmuster sowohl im Invasiv lobulären (Abbildung 4.6 a), im Muzinösen (Abbildung 4.6 b) und im Metaplastischen (Abbildung 4.6 c), als auch im Invasiven Mammakarzinom, kein spezieller Typ (NST), (Abbildung 4.6 d).

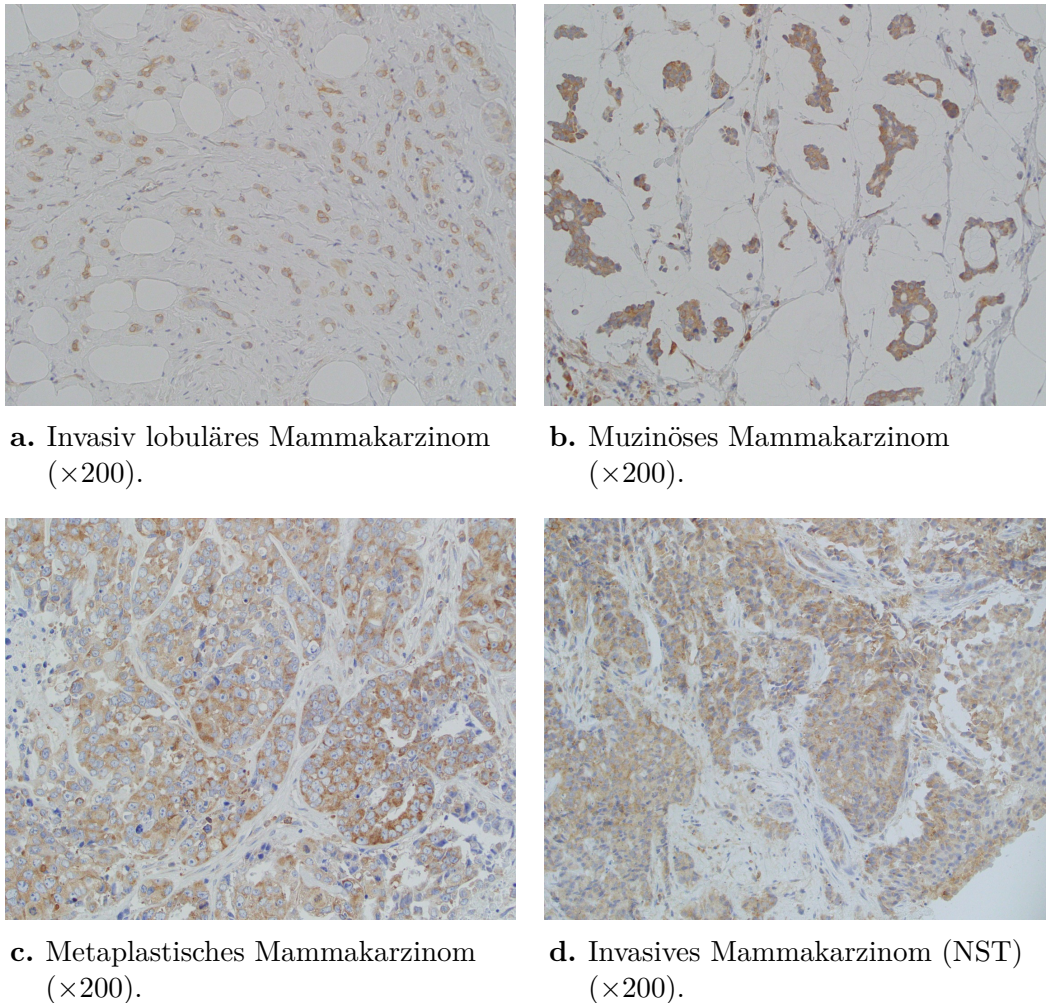


Abb. 4.6 NNAT-Expression in invasiven Mammakarzinomen.

4.3.4 Korrelation der Neuronatin-Expression mit den klinisch-pathologischen Faktoren

Die Daten der immunhistochemischen NNAT-Expression, bezogen auf die erhobenen klinisch-pathologischen Faktoren bzw. Kategorien, sind in der Tabelle 4.1 erfasst. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer gesteigerten NNAT-Expression und einer damit verbundenen ungünstigeren Prognose konnte bei dem Auftreten von me-

tachronen Metastasen ($p = 0,043$) und bei einem schlechtem Nottingham-Prognose-Index ($p = 0,001$) nachgewiesen werden.

Eine auffallende Erhöhung der NNAT-Expression, obgleich keine statistische Signifikanz vorlag, konnte bei folgenden klinisch-pathologischen Parametern beobachtet werden: einer fortgeschrittenen lokalen Tumorausdehnung (pT1–pT4), einer fortgeschrittenen Tumorgroße (≤ 2 cm vs. > 2 cm), dem Nachweis von Lymph- (L0 vs. L1) bzw. Blutgefäßeinbrüchen (V0 vs. V1), einem fortgeschrittenen UICC-Stadium (I–IV), einem geringen Differenzierungsgrad (G1–G3), dem Vorliegen von Fernmetastasen (M0 vs. M1), einem negativen ER- bzw. PR-Status, einem positiven HER2-Status und dem Auftreten eines Lokalrezidivs. Bei Betrachtung der triple-negativen Mammakarzinome zeichnete sich ebenfalls ein potenzieller Zusammenhang ($p = 0,519$) zu der NNAT-Expression ab, denn der IRS dieser Tumorgruppe war mit 10,8 größer als der der übrigen Karzinome mit einem IRS von 8,1.

Es fanden sich keine Korrelationen zwischen der NNAT-Expression und dem Menopausenstatus oder einem positiven bzw. negativen Lymphknotenstatus (pN0 vs. pN1–3).

4.3.5 Definition der Risikogruppen

Mithilfe der ROC-Analyse wurde ein optimaler Cut-off-Wert für die immunhistochemische Expression von NNAT definiert, der bei guter Kombination von Sensitivität und Spezifität zwischen Gruppen mit niedrigem bzw. hohem Risiko bezüglich des rezidivfreien und Gesamtüberlebens diskriminiert. Mit einer Sensitivität von 85,1 %, einer Spezifität von 35,3 % und einem AUC (area under the curve)-Wert von $0,846 \pm 0,032$ (95 % CI: 0,784–0,909; $p < 0,001$) erwies sich ein IRS von 14 als optimaler Cut-off-Wert. Das heißt, Mammakarzinome mit einem IRS zwischen 0,0 und 13,9 wurden der Gruppe mit geringer NNAT-Expression zugeordnet, wohingegen Mammakarzinome mit einem IRS zwischen 14,0 und 30,0 in die Gruppe mit hoher NNAT-Expression eingeordnet wurden.

4.3.6 Korrelation der Neuronatin-Expression mit dem Überleben

Die Abhängigkeit des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens vom NNAT-Expressionslevel wurde mittels Kaplan-Meier-Methode verifiziert. Die Einteilung hierfür erfolgte gemäß Abschnitt 4.3.5 in eine hoch- bzw. gering-exprimierende Risikogruppe. Abbildung 4.7 stellt die Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben für diese beiden Risikogruppen dar. Patientinnen mit einem Mammakarzinom und einer geringen NNAT-Expression zeigten mit einer mittleren Gesamtüberlebenszeit von $164,1 \pm 4,6$ Monaten ein signifikant längeres Gesamtüberleben

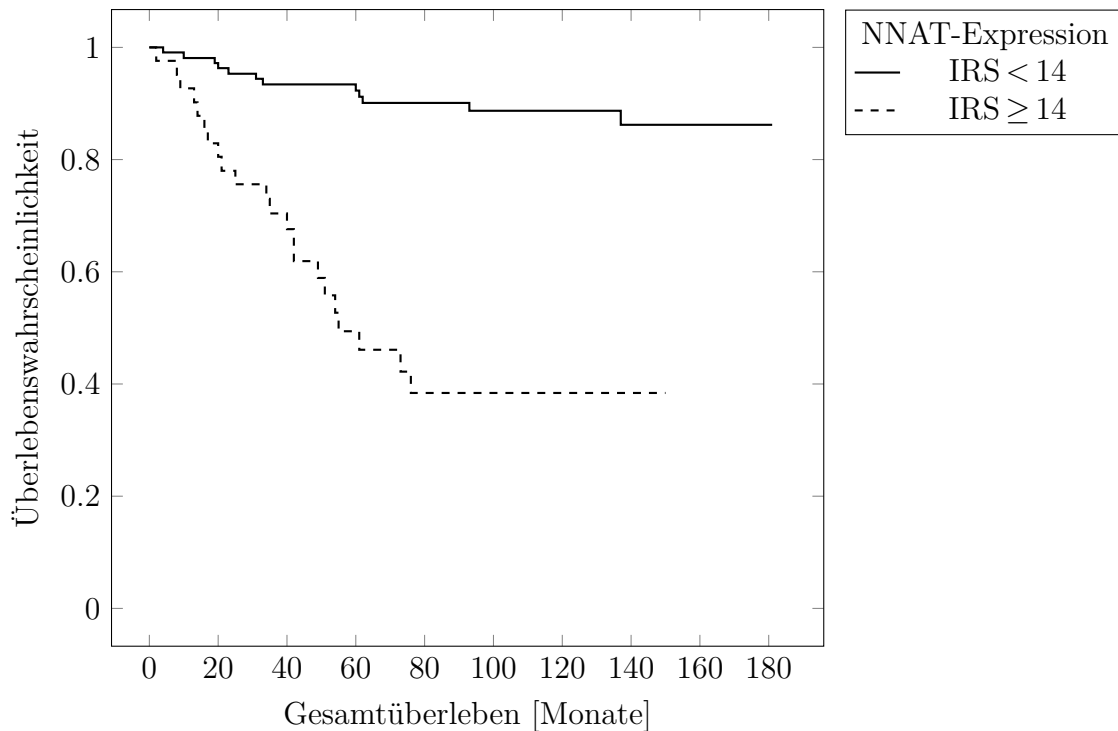


Abb. 4.7 Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der NNAT-Expression.

als Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit einer hohen NNAT-Expression mit einer mittleren Gesamtüberlebenszeit von $80,7 \pm 9,7$ Monate ($p < 0,001$). Die mittlere 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten lagen in der Gruppe mit geringer NNAT-Expression bei 93,4 %, 92,3 % und 88,7 % im Vergleich zu 70,4 %, 49,4 % und 38,4 % in der Gruppe mit einer hohen NNAT-Expression ($p < 0,001$). Die Betrachtung der Datenlage des rezidivfreien Überlebens zeigte, dass die gesteigerte NNAT-Expression im Mammakarzinom in einer signifikant kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit mit durchschnittlich $102,2 \pm 11,4$ Monaten resultierte. Im Vergleich dazu wiesen Mammakarzinome mit einem geringen IRS für NNAT ein mittleres rezidivfreies Überleben von $159,6 \pm 5,6$ Monaten ($p = 0,003$) auf, siehe Abbildung 4.8. Der hochsignifikante Zusammenhang zwischen der NNAT-Expression und dem krankheitsfreien Überleben spiegelte sich auch in den Überlebenswahrscheinlichkeiten wieder. Die mittlere rezidivfreie 3-, 5- und 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug für die Gruppe mit geringer NNAT-Expression 91,7 %, 86,9 % und 85,2 % bzw. 69,7 %, 61,2 % und 61,2 % für die Gruppe mit hoher NNAT-Expression.

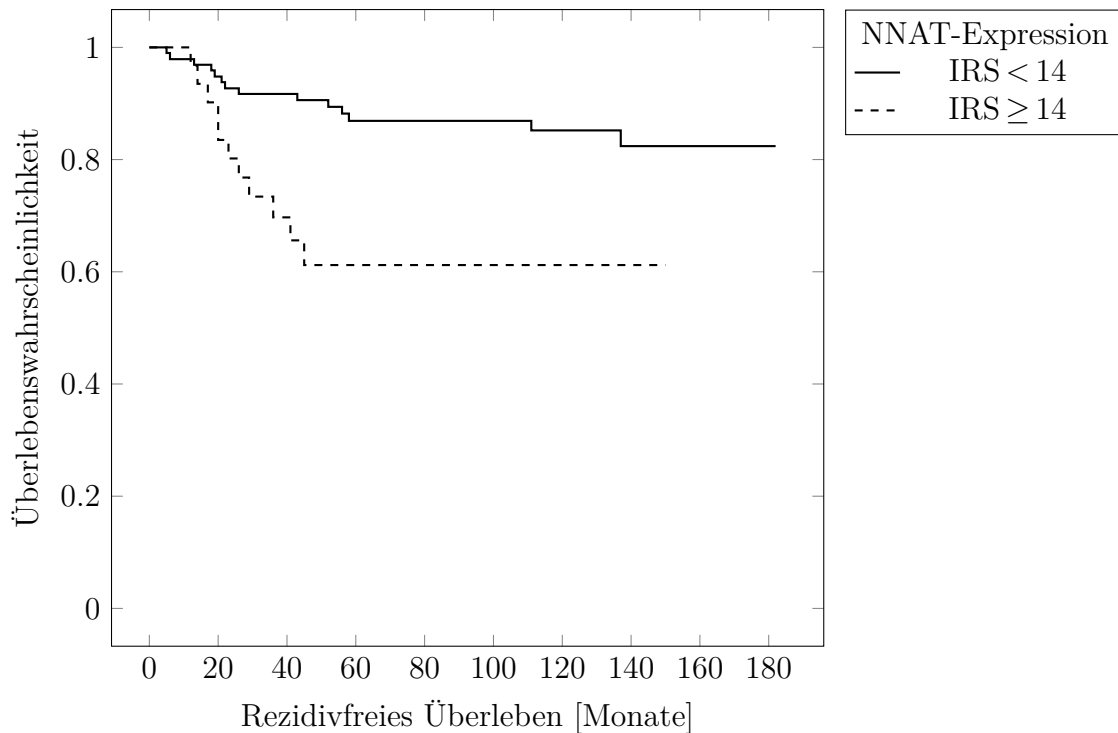


Abb. 4.8 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der NNAT-Expression.

4.4 Ermittlung von Prognoseparametern mithilfe der Multivariaten Analyse

Die Bestimmung von Prognoseparametern hat das Ziel, den individuellen Krankheitsverlauf einer Patientin, die an einem Mammakarzinom erkrankt ist, abzuschätzen. Die klassischen etablierten klinisch-pathologischen sowie morphologischen Prognosefaktoren und die NNAT-Expression wurden auf ihre prognostische Relevanz hin separat überprüft. Anhand des krankheitsfreien Zeitraums wurde die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv der Erkrankung (metachrone Metastase oder Lokalrezidiv) und anhand der Gesamtüberlebenszeit wurde die Wahrscheinlichkeit für den Tod der Patientin errechnet.

4.4.1 Univariate Analyse

In der univariaten Analyse wurden die folgenden klinisch-pathologischen Parameter in Bezug auf das Gesamt- und das rezidivfreie Überleben untersucht, siehe Tabelle 4.3: Der Menopausenstatus, die Tumorgöße (≤ 2 cm vs. > 2 cm), der Lymphknotenstatus, der Nachweis von Lymph- bzw. Blutgefäßeinbrüche, die Expression der Hormonrezeptoren bzw. der HER2-Status und die NNAT-Expression ($\text{IRS} \geq 14$ vs. $\text{IRS} < 14$). Für das Gesamtüberleben wurden zusätzlich das Auftreten von meta-

chronen Metastasen und von Lokalrezidiven in die Analyse mit einbezogen. Einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben hatten die klinisch-pathologischen Faktoren wie die Tumorgröße, die Venen- und Lymphgefäßinfiltration, der Lymphknotenstatus, das Auftreten von metachronen Metastasen und von Lokalrezidiven sowie die NNAT-Expression. Bezüglich des rezidivfreien Überlebens zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zu der Tumorgröße und zu der NNAT-Expression.

4.4.2 Multivariate Analyse

Die multivariate Analyse nach dem Cox-Regression-Modell wurde durchgeführt, um prognostisch unabhängige Faktoren zu ermitteln, siehe Tabelle 4.4. In diese Berechnung wurden die Parameter einbezogen, die sich in der univariaten Analyse als signifikant herausgestellt hatten.

Als unabhängige Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben konnten die NNAT-Expression ($\text{IRS} \geq 14$ vs. $\text{IRS} < 14$), die Tumorgröße (≤ 2 cm vs. > 2 cm), das Auftreten von metachronen Metastasen und der Nachweis von Blutgefäßeinbrüchen identifiziert werden, wobei die NNAT-Expression und die metachronen Metastasen sich als die aussagekräftigsten unabhängigen Faktoren für eine ungünstige Prognose präsentierten. Bezüglich des rezidivfreien Überlebens konnten die NNAT-Expression und die Tumorgröße als unabhängige Prognosefaktoren bestimmt werden. Beide zeigten dabei die gleiche Signifikanz für eine schlechte Prognose.

Tab. 4.3 Univariate Analyse.

Klinisch-pathologischer Faktor		Gesamtüberleben			Rezidivfreies Überleben		
		HR	95 %-CI	p	HR	95 %-CI	p
Menopausenstatus	(prä- vs. postmenopausal)	0,810	0,335 – 1,958	0,640	0,707	0,242 – 2,063	0,526
Tumorgroße	(≤ 2 cm vs. > 2 cm)	0,183	0,080 – 0,421	$< 0,001$	0,286	0,123 – 0,663	0,004
Lymphknotenstatus	(negativ vs. positiv)	0,477	0,243 – 0,936	0,031	0,555	0,249 – 1,235	0,149
Veneninfiltration	(negativ vs. positiv)	0,274	0,135 – 0,555	$< 0,001$	22,122	0,015 – 31 656	0,404
Lymphgefäßinfiltration	(negativ vs. positiv)	0,391	0,196 – 0,784	0,008	0,718	0,326 – 1,581	0,411
Östrogenrezeptor	(negativ vs. positiv)	1,595	0,777 – 3,273	0,203	1,380	0,576 – 3,307	0,470
Progesteronrezeptor	(negativ vs. positiv)	1,634	0,833 – 3,204	0,153	1,547	0,706 – 3,393	0,276
HER2-Status	(negativ vs. positiv)	0,849	0,340 – 2,117	0,725	1,041	0,357 – 3,034	0,941
Metachrone Metastasen	(negativ vs. positiv)	0,102	0,051 – 0,201	$< 0,001$	(*)	(*)	(*)
Lokalrezidiv	(negativ vs. positiv)	0,378	0,176 – 0,812	0,013	(*)	(*)	(*)
NNAT-Expression	(≥ 14 vs. < 14)	7,254	3,556 – 14,798	$< 0,001$	3,168	1,428 – 7,027	0,005

Tab. 4.4 Multivariate Analyse.

Klinisch-pathologischer Faktor		Gesamtüberleben			Rezidivfreies Überleben		
		HR	95 %-CI	p	HR	95 %-CI	p
Tumorgroße	(≤ 2 cm vs. > 2 cm)	0,356	0,145 – 0,870	0,023	0,261	0,112 – 0,610	0,002
Veneninfiltration	(negativ vs. positiv)	0,339	0,162 – 0,709	0,004	(**)	(**)	(**)
Metachrone Metastasen	(negativ vs. positiv)	0,227	0,109 – 0,479	$< 0,001$	(*)	(*)	(*)
NNAT-Expression	(≥ 14 vs. < 14)	6,291	2,953 – 13,404	$< 0,001$	3,545	1,581 – 7,946	0,002

Legende: Ein hazard ratio (HR) von h für “(A vs. B)” bedeutet, dass die Sterberate der Gruppe A gleich dem h -fachen der Sterberate der Gruppe B ist.

Die Faktoren der mit (*) markierten Zellen sind für das rezidivfreie Überleben nicht definiert.

Der mit (**) markierte Faktor wurde hier nicht berücksichtigt, da der in der univariaten Analyse keine Signifikanz zeigte.

Kapitel 5

Diskussion

In dieser Dissertation wurde erstmalig über die prognostische Relevanz der NNAT-Expression in Bezug auf die klinisch-pathologischen Parameter und das rezidivfreie bzw. das Gesamtüberleben berichtet, wofür ein Kollektiv von 148 Mammakarzinomen untersucht wurde.

5.1 Patientenkollektiv

Das betrachtete Patientenkollektiv stellte sich unter Berücksichtigung der unter 1.1.1 erwähnten epidemiologischen Fakten der deutschen Bevölkerung als repräsentatives Kollektiv dar. Im Mittel lag das Erkrankungsalter der Patientinnen des Kollektivs zum Zeitpunkt der Mammakarzinom-Diagnose bei 64 Jahren. Dies entspricht den aktuellen Daten des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [58]. Laut der European Society of Breast Cancer Specialists beträgt das durchschnittliche Erkrankungsalter in Europa 60 Jahre [59]. Damit lag das mittlere Erkrankungsalter des Kollektivs über dem europäischen Durchschnitt. Diese Abweichung könnte in einem niedrigeren Erkrankungsalter anderer europäischer Staaten begründet sein [122]. Darüber hinaus könnte eine geringere Teilnahme der deutschen Patientinnen am Mammographie-Screening, welches früher kleinere Mammakarzinome entdeckt, zu einem höheren Alter der Betroffenen bei der Diagnosestellung geführt haben [15].

Für das Mammakarzinom konnte europa- und deutschlandweit über die letzten 20 Jahre ein Anstieg der Inzidenzrate sowie ein leichter Rückgang der Mortalitätsrate verzeichnet werden [58, 71]. Die 5-JÜR der Patientinnen des untersuchten Kollektivs entspricht mit 81 % der europäischen und deutschen Überlebensrate [25, 58].

In einer Studie der Universität Regensburg wurde für 3658 Mammakarzinome die Ki-67-Rate bestimmt und unter anderem mit dem rezidivfreien Überleben korreliert. Dabei zeigte sich eine 5-JÜR für das rezidivfreie Überleben von 76–87 % [52]. Die Wahrscheinlichkeit, 5 Jahre ohne ein Rezidiv zu überleben, lag bei den hier

untersuchten Patientinnen mit 81 % genau im Mittelfeld.

Vergleicht man die Verteilung der histologischen Typen, weist das untersuchte Kollektiv die in der Literatur angegebenen Häufigkeiten auf. Dort ist das Invasive Karzinom, kein spezieller Typ (NST) mit 50–80 % [66] am häufigsten, gefolgt von dem Invasiv lobulären Karzinom mit 10–15 % [68]. Dementsprechend war das Invasive Karzinom, kein spezieller Typ (NST) in diesem Kollektiv mit 78 % am meisten vertreten und zeigte mit einer 5-JÜR von 83 % die beste Prognose. Das Invasiv lobuläre Karzinom war mit 16 % am zweithäufigsten zu beobachten und wies eine vergleichsweise schlechtere 5-JÜR von 78 % auf. In der Studie von Adachi et al. [1] lag die 5-JÜR mit 94 % für das Invasive Karzinom, kein spezieller Typ (NST) und mit 83 % für das Invasiv lobuläre Karzinom doch deutlich über der dieser Arbeit. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass in der Publikation von Adachi et al. [1] Tumorcharakteristika wie geringer histologischer Grad und ein fortgeschrittenes Tumorstadium, die mit einer schlechteren Prognose und demzufolge einer niedrigen Überlebensrate korrelierten, unterrepräsentiert vertreten sind. So lag in 70 % der Fälle ein pT1-Stadium vor, wohingegen nur 55 % des hier untersuchten Kollektivs dieser Gruppe angehören [1].

5.2 Klinisch-pathologische Prognoseparameter

Im nachfolgenden Abschnitt werden die klinisch-pathologischen Faktoren diskutiert, die einen nachweisbaren Einfluss auf die Prognose des Mammakarzinoms zeigen. Mit 55 % war das pT1-Stadium unter den untersuchten Mammakarzinomen am häufigsten vertreten, gefolgt von dem pT2-Stadium mit 35 % und dem pT4-Stadium mit 7 %. Die kleinste Gruppe war mit 3 % das pT3-Stadium. Diese Verteilung entspricht der des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., denn bundesweit lag folgende Tumorstadienverteilung vor: 53 % (pT1), 36 % (pT2), 6 % (pT3), 6 % (pT4) [58]. Ein sehr ähnliches Verteilungsmuster bezüglich der Tumorstadien und ein mit einer fortgeschrittenen Tumorausdehnung einhergehendes schlechteres Überleben konnte auch die niederländische Publikation von Saadatmand et al. [97] zeigen. Dort wurden von 1999 bis 2005 80.228 Patientinnen untersucht. Die mittlere 5-JÜR lag für das pT1-Stadium bei 90 % und fiel auf 44 % für das pT4-Stadium [97]. Im Vergleich dazu belief sich die 5-JÜR des vorliegenden Kollektivs auf 94 % (pT1) und auf 40 % (pT4). In dieser Arbeit lag die 5-JÜR für das pT1-Stadium etwas über der der Vergleichsstudie. Gründe dafür können eine bessere Diagnostik bzw. Therapie und eine engmaschigere Nachsorge der Patientinnen sein. In Bezug auf das pT4-Stadium fällt eine leicht verminderte 5-JÜR auf. Dies ist am ehesten auf die unterschiedliche Kohortengröße und die damit verbundene erhöhte Varianz in dieser Arbeit zurückzuführen.

In Abschnitt 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass das histologische Grading hochsignifikant ($p < 0,001$) mit dem Gesamtüberleben korreliert. Patientinnen mit einem gering differenzierten Mammakarzinom wiesen eine wesentlich schlechtere 5- bzw. 10-JÜR auf als Patientinnen mit einem gut differenzierten Tumor. Dies steht im Einklang mit der Fachliteratur [32, 33, 110]. Im untersuchten Kollektiv waren 15 % der Mammakarzinome gut, 55 % mäßig und 30 % gering differenziert. Ein sehr ähnliches Verteilungsmuster zeigten auch Engstrom et al. mit 13 %, 54 % respektive 33 %, sowie eine 5-JÜR von 89 % für G1-Tumoren bzw. von 64 % für G3-Tumoren [33]. Abweichend davon betrug die 5-JÜR im hier betrachteten Kollektiv 100 % für gut bzw. 66 % für gering differenzierte Mammakarzinome. Die Differenz bezüglich der G1-Tumoren lässt sich am ehesten durch den Unterschied in der entsprechenden Gruppenstärke erklären. So sind hier mit 55 % mehr als die Hälfte der Mammakarzinome ≤ 2 cm. Dem gegenüber gehörten nur 19 % der Patientinnen der Vergleichsstudie dieser Gruppe an [33]. Mammakarzinome mit einer geringeren Tumorgöße haben eine bessere Prognose als größere Tumoren und gehen gehäuft mit einem guten Differenzierungsgrad einher [48], womit sich die sehr gute 5-JÜR am besten begründen lässt.

Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen haben eine schlechtere Prognose als Patientinnen ohne Nachweis dieser. Das belegten sowohl die vorliegende Arbeit als auch die Studien von Saadatmand et al. [97] und Inwald et al. [52]. Bei Inwald et al. wurden 62 % Mammakarzinome mit tumorfreien und 38 % mit befallenen Lymphknoten untersucht [52]. Annähernd gleiche Werte zeigten sich auch bei Saadatmand et al. [97]. Die Verteilung variiert in dem vorliegenden Kollektiv leicht, denn 70 % der Patientinnen zeigten tumorfreie und 30 % tumorinfiltrierte Lymphknoten. In beiden Arbeiten betrug die 5-JÜR 85 %. Abweichend davon zeigen jedoch Patientinnen mit einem positiven Lymphknotenstatus eine 5-JÜR von 78 % in der niederländischen Publikation [97], verglichen mit 73 % in dieser Arbeit. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche prozentuale Verteilung bezüglich des positiven bzw. negativen Lymphknotenstatus sein. Des Weiteren kann auch die große Populationsvarianz als Ursache in Betracht kommen.

Das Vorliegen von synchronen Fernmetastasen besitzt eine sehr hohe prognostischen Relevanz, da ihr Nachweis unabhängig von anderen Faktoren mit einer verhältnismäßig geringen Überlebenszeit für die Mammakarzinompatientinnen einhergeht [69, 77, 90]. In den letzten Jahrzehnten hat sich die Diagnostik verbessert und Mammakarzinome werden immer früher in weniger fortgeschrittenen Tumorstadien entdeckt. Parallel dazu wurden auch die operativen Möglichkeiten sowie die medikamentösen Therapien weiterentwickelt [14, 17, 67]. Das hat zur Folge, dass über die Jahre hinweg die Anzahl der zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasierten Mammakarzinome abnimmt und die Überlebensrate auch für diese Patientinnen stetig

ansteigt. Bei 11 % der Patientinnen dieses Kollektivs konnte zum Diagnosezeitpunkt eine synchrone Metastasierung festgestellt werden. Im Vergleich dazu zeigte die aktuelle Statistik der American Cancer Society einen Rückgang der synchron metastasierten Mammakarzinome auf 5 % [6]. In einer Studie von Andre et al. [7] wurden zwei Patientenkollektive (1987–1993 vs. 1994–2000) verglichen. Dabei konnte ein Anstieg der 5-JÜR von 11 % auf 28 % verzeichnet werden [7]. In diesen positiven Verlauf primär metastasierter Mammakarzinome reihen sich die hier untersuchten Patientinnen (1999–2006) mit einer 5-JÜR von 40 % gut ein.

Der Hormonrezeptorstatus sagt viel über die Prognose von Mammakarzinomen aus. Hormonrezeptor-positive Karzinome lassen eine bessere Prognose zu und zeigen eine höhere Überlebensrate [49, 98, 104, 130]. Auch wenn sich in dem vorliegenden Kollektiv kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Hormonrezeptoren und dem Gesamtüberleben zeigte, ließ sich doch ein deutlicher Unterschied in der mittleren Überlebenszeit bezüglich des ER und des PR erkennen. Die mittlere Überlebenszeit betrug 149 Monate für ER-positive und 125 Monate für ER-negative Mammakarzinome sowie 152 Monate für PR-positive und 128 Monate für PR-negative Tumoren. Ebenso wie die oben angeführten Vergleichsstudien hatten auch hier die Patientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus insgesamt eine bessere Prognose und wiesen eine höhere Überlebensrate auf. Es wurde eine 5-JÜR von 82 % für ER-positive und von 76 % für ER-negative Mammakarzinome ermittelt. Bezüglich des PR beläuft sich die 5-JÜR für positive Neoplasien auf 83 % und für negative auf 78 %. Im Vergleich dazu zeigt eine Dissertation der Universität Ulm bezüglich der Hormonrezeptoren eine etwas höhere 5-JÜR: ER-positiv 90 %, ER-negativ 80 %, PR-positiv 91 % und PR-negativ 80 % [98]. Die höheren Überlebensraten lassen sich damit begründen, dass die Vergleichsarbeit der Universität Ulm Patientinnen ausgeschlossen hatte, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen festgestellt wurden. Demgegenüber wurden in dem hier vorliegenden Kollektiv auch 12 % primär metastasierte Mammakarzinome, welche grundsätzlich mit einer schlechte Prognose einhergehen, untersucht.

Zur Primärdiagnostik von Mammakarzinomen gehört neben den Hormonrezeptor auch standardmäßig die Bestimmung des HER2-Status [63]. Eine Überexpression von HER2 geht mit einer schlechteren Prognose, einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit und einem aggressiveren Tumorverhalten einher [5, 49, 104]. Das konnte mithilfe des hier untersuchten Kollektivs untermauert werden. Die 117 (79 %) Patientinnen mit einem HER2-negativen Mammakarzinom zeigten eine mittlere Überlebenszeit von 150 Monaten gegenüber Patientinnen mit einem HER2-positiven Karzinom (21 %) mit einem durchschnittlichen Überleben von 122 Monaten. Onitilo et al. [78] beobachteten mit 18 % bzw. 82 % ein sehr ähnliches Verteilungsverhältnis zwischen HER2-positiven und -negativen Mammakarzinomen. Jedoch zeigte sich

eine deutliche Diskrepanz bei der 5-JÜR, insbesondere bei HER2-positiven Mammakarzinomen. Die 5-JÜR für Tumoren mit einem negativen HER2-Status betrug 89 % und mit einem positiven HER2-Status 85 % [78]. Im Vergleich dazu lag die 5-JÜR dieses Kollektivs hier nur bei 84 % für negative und bei 70 % für positive Mammakarzinome. Zurückführen lassen sich die insgesamt höheren Überlebensraten am ehesten auf unterschiedliche Zusammensetzungen der Kollektive. So wurden Mammakarzinome mit einem UICC-Stadium IV in der Publikation von Onitilo et al. [78] im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Die Tatsache, dass dieses Tumorstadium, dem alle primär metastasierten Mammakarzinome angehören, das Stadium mit der schlechtesten Prognose ist, stellt eine mögliche Erklärung dieser Differenz dar.

Bei 16,2 % der Patientinnen des Kollektivs wurde ein triple-negatives Mammakarzinom diagnostiziert, was mit dem Anteil in anderen Studien (13–19 %) übereinstimmt [80, 87, 112]. Dem steht eine Abweichung der mittleren Überlebenszeit der Patientinnen mit triple-negativen Mammakarzinom entgegen, denn diese überlebten in der vorliegenden Arbeit mit 120 Monaten deutlich länger als die Patientinnen in der Publikation von Rakha et al. mit nur 54 Monaten [87]. Der Hauptgrund dafür ist vermutlich der frühere Diagnosezeitraum (1986–1998) des Kollektivs von Rakha et al. [87], da im Vergleich dazu jetzt Mammakarzinome in früheren Tumorstadien entdeckt werden und die Patientinnen aufgrund besserer Therapiemöglichkeiten länger leben [14, 17, 58, 67]. Das spiegelt auch ein Vergleich weiterer Daten wider. In der selben Studie waren 50 % der Mammakarzinome gering differenziert und das mittlere Gesamtüberleben betrug nur 73 Monate [87]. Im Vergleich dazu lag bei nur 30 % der Karzinome dieser Arbeit ein G3-Stadium vor und die mittlere Überlebenszeit belief sich auf 145 Monate.

5.3 Nottingham-Prognose-Index

Der 1982 von Haybittle et al. erstmals beschriebene NPI gilt als prognostisch sehr aussagekräftig [46]. Das hier untersuchte Patientinnenkollektiv zeigte passend dazu einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) bezüglich des Überlebens der nach dem NPI eingeteilten Gruppen. Dabei lag die mittlere Überlebenszeit für Patientinnen der guten Prognosegruppe bei 170 Monaten und die der sehr schlechten Prognosegruppe nur bei 54 Monaten. Darüber hinaus konnten auch mehrere weitere Studien belegen, dass je höher der NPI ist, desto schlechter die Prognose und desto geringer die Überlebenswahrscheinlichkeit [16, 47, 64].

Eine gute Schätzung der 10-JÜR sowie die Zuordnung in die jeweiligen Prognosegruppen kann anhand des berechneten NPI und der von Blamey et al. erstellten Auswertungstabelle (siehe Tabelle 1.5) vorgenommen werden [16]. Über mehrere

Jahrzehnte hinweg hat sich die Verteilung der Patientinnen auf die einzelnen Prognosegruppen verändert, da Mammakarzinome aufgrund einer besser werdenden Diagnostik und zunehmenden Vorsorgeuntersuchungen immer früher mit geringerer Tumorgroße und besserer Prognose diagnostiziert werden. So gehörten laut der Studie von Blamey et al. 31 % der Patientinnen des Kollektivs von 1980–1986 in die Gruppe mit exzellenter bzw. guter Prognose. Der prozentuale Anteil an Patientinnen dieser Gruppen stieg in dem Kollektiv von 1990–1999 auf 36 % [16] und in dem hier vorliegenden Kollektiv von 1999–2006 auf 41 % an.

In dem nachfolgenden Absatz werden die von Blamey et al. ermittelten 10-JÜR der einzelnen prognostischen Gruppen mit denen des hier untersuchten Kollektivs verglichen [16], siehe Tabelle 1.5. Die hier ermittelten 10-JÜR für die exzellente, die gute und die mäßig I Prognosegruppe betragen 100 %, 97 % bzw. 80 %. Die 10-JÜR der Vergleichsstudie liegen mit 96 %, 93 % bzw. 81 % geringfügig darunter [16]. Ursächlich dafür könnten die sich weiterentwickelnden und besseren Therapiekonzepte in den Jahren 1990–1999 und 1999–2006. Die 10-JÜR der mäßig II und der sehr schlechten Prognosegruppe lag mit 53 % und 17 % deutlich unter der Vergleichsarbeit mit 74 % und 38 % [16]. Der Grund dafür sind vermutlich die Ausschlusskriterien der Arbeit von Blamey et al., denn Patientinnen älter als 70 Jahre und/oder einem Tumordurchmesser größer als 5 cm wurden, im Gegensatz zu dieser Arbeit, nicht berücksichtigt [16]. Als einziger Ausreißer präsentierte sich hier die schlechte Prognosegruppe, denn mit einer 10-JÜR von 69 % lag sie noch über der Prognosegruppe mäßig II. Damit reiht sich die schlechte Prognosegruppe weder in das hier untersuchte Kollektiv ein, noch stimmt sie mit der 10-JÜR von 55 % der Vergleichsstudie überein [16]. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Stichprobengröße, da das hier betrachtete Kollektiv 148 Fälle einschließt, welche auf 6 prognostische Gruppen verteilt unter Umständen nicht mehr repräsentativ sind. Im Gegensatz dazu umfasste das Vergleichskollektiv von Blamey et al. 2238 Patientinnen [16].

5.4 Neuronatin-Expression und die klinisch-pathologischen Faktoren

Im folgenden Abschnitt wird die NNAT-Expression hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz bezüglich der klinisch-pathologischen Parameter diskutiert. Die Ergebnisse zeigten signifikante Korrelationen zwischen der NNAT-Expression und anderen Parametern, beispielsweise dem Gesamtüberleben und dem NPI.

Allgemein konnte geschlussfolgert werden, dass eine gesteigerte NNAT-Expression mit einer fortgeschritteneren Tumorausdehnung und einer ungünstigeren Prognose

einhergeht. Eine Erklärung ist der Einflusses von NNAT auf den Ca^{2+} -Haushalt der Zelle. NNAT ist als Membranprotein [27] am Ca^{2+} -Haushalt beteiligt und kann über die Entleerung des Endoplasmatischen Retikulums zur Erhöhung des intrazytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels führen [100, 111]. Im Mammakarzinom ist die NNAT-Expression durch die miRNA-708 reguliert. Eine niedrige miRNA-708-Expression führt so zu erhöhter NNAT-Expression und damit zum Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} [96]. Eine gesteigerte Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma der Mammakarzinomzellen führt zu einer gesteigerten Zell-Proliferation, einer gesteigerten Zell-Migration und zu einer vermehrten Metastasenentstehung [129].

5.4.1 Neuronatin-Expression und Histologie

Im gesunden Brustdrüsenparenchym ließ sich eine NNAT-Expression zytoplasmatisch und membranös nachweisen. Zusätzlich fanden sich auch NNAT-positive Myoepithelzellen. Ein entsprechendes Expressionsmuster konnte ebenso bei Hautbiopsien in Hautanhangsdrüsen nachgewiesen werden [100]. Sowohl im Mammakarzinom, als auch im Adenokarzinom der Lunge [117], im extramammären Paget [29] und im Medullo- [105], sowie im Glioblastom [127] zeigten die Tumorzellen eine kräftige zytoplasmatisch und fokale membranöse Positivität für NNAT. Zwischen der NNAT-Expression im Brustdrüsenparenchym und der im Carcinoma in situ bzw. der im Mammakarzinom zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,001$). So lag der IRS vom Carcinoma in situ mit 9,5 und vom Karzinom mit 8,5 deutlich über dem des normalen Brustdrüsenparenchyms mit 5,9. Das heißt, dass die neoplastischen Zellen sowohl im Karzinom selbst als auch in der Präkanzerose eine viel höhere NNAT-Expression zeigten als normales Gewebe. Gründe dafür könnten sein, dass NNAT in proliferierenden Tumorzellen vermehrt exprimiert wird oder dass ein NNAT-Anstieg Ursache für eine gesteigerte Tumorzellproliferation ist. Dafür spricht, dass auch in Medulloblastomen und in Glioblastomen eine gesteigerte NNAT-Expression mit einer erhöhten Tumorzellproliferation in Verbindung gebracht wurde [105, 127]. Darüber hinaus legt die schon hohe NNAT-Expression im Carcinoma in situ nahe, dass die Ursache des NNAT-Anstiegs in der frühen Tumorgenese liegt.

Für die histologischen Typen ließ sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,314$) in der NNAT-Expression erkennen. Der mittlere IRS betrug für das Invasive Karzinom, kein spezieller Typ (NST) 8,6 und für das Invasiv lobuläre Karzinom 7,5. Die NNAT-Expression zeigte keinen relevanten Zusammenhang bezüglich der Prognose und der Überlebenswahrscheinlichkeit dieser beiden histologischen Typen. Daraus kann man schlussfolgern, dass NNAT unabhängig von der histologischen Entität exprimiert wird.

In gering differenzierten Mammakarzinomen war die NNAT-Expression am stärks-

ten. Der durchschnittliche IRS betrug 7,0 bei gut differenzierten Karzinomen und stieg auf 10,5 in gering differenzierten Tumoren an. Auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war ($p=0,067$), ließ sich ein deutlicher Anstieg der NNAT-Expression in gering differenzierten Mammakarzinomen erkennen. Analog dazu zeigte sich in einer Studie von Uchihara et al., dass auch in Adenokarzinomen der Lunge ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer gesteigerten NNAT-Expression und einem geringen Differenzierungsgrad besteht [117]. Glioblastome mit einem Grad IV zeigten ebenfalls einen deutlichen Anstieg in der NNAT-Expression gegenüber Tumoren mit einem Grad II oder III [127]. Das bedeutet, eine gesteigerte NNAT-Expression geht mit einer schlechten Prognose einher. Das konnte für die hier vorliegende Kohorte bestätigt werden, denn die 5-JÜR fiel von 100 % für G1-Tumoren auf 66 % für G3-Tumoren. Das heißt, die Überlebenswahrscheinlichkeit fällt mit ansteigender NNAT-Expression bzw. höherem Tumorgrad.

5.4.2 Neuronatin-Expression und Tumorstadium

Die Tumorgöße und das Tumorstadium, die bei jedem Mammakarzinom erhoben wurden, zeigten eine erkennbare Tendenz bezüglich der NNAT-Expression trotz fehlender Signifikanz. Mammakarzinome mit einem Durchmesser von ≤ 2 cm wiesen einen mittleren IRS von 7,8 auf, größere Karzinome hingegen zeigten einen IRS von 9,6 ($p=0,108$). Das heißt, mit steigender Tumorgöße stieg die NNAT-Expression. Das spiegelte sich auch in den Tumorstadien wider. Für das Stadium I betrug der IRS 7,3 und stieg bis 11,7 im Stadium IV an ($p=0,114$). Dass mit steigender Tumorgöße und fortgeschrittenem Tumorstadium und dem damit verbundenen Anstieg der NNAT-Expression eine ungünstigere Prognose einhergeht, kann mithilfe der mittleren Überlebenszeit belegt werden. Diese betrug beispielsweise 169 Monate für das UICC-Stadium I und nur 70 Monate für das UICC-Stadium IV. Auch in Adenokarzinomen der Lunge zeigte sich ein Anstieg der NNAT-Expression in Bezug auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium und einer begleitenden schlechteren Prognose [117].

5.4.3 Neuronatin-Expression und Metastasen

NNAT wurde im vorliegenden Untersuchungskollektiv sowohl in Mammakarzinomen mit synchronen als auch in Karzinomen mit metachronen Metastasen deutlich höher exprimiert als in Mammakarzinomen ohne Nachweis von Metastasen. Dabei war die Korrelation der NNAT-Expression mit metachronen Metastasen hochsignifikant ($p=0,001$), denn hier zeigte sich ein IRS von 8,4 bei Patientinnen ohne und von 13,1 bei Patientinnen mit metachroner Metastasierung. Die mit einem metastasierten Mammakarzinom einhergehende ungünstigere Prognose korrelierte mit der

ansteigenden NNAT-Expression und der von 162 Monaten auf 61 Monate verringerten Überlebenszeit für Patientinnen mit bzw. ohne metachrone Metastasen. Nahezu signifikant ($p=0,051$) war auch der Zusammenhang zwischen den synchronen Fernmetastasen und der NNAT-Expression. So betrug der mittlere IRS für nicht metastasierte Mammakarzinome 8,2 und stieg auf 11,6 für metastasierte Neoplasien merklich an. Auch hier zeigte die Überlebenswahrscheinlichkeit, korrespondierend zur gesteigerten NNAT-Expression, ein verringertes Überleben und somit eine ungünstigere Prognose.

Eine naheliegende Erklärung ist die gesteigerte Zell-Proliferation, die durch den Anstieg von NNAT hervorgerufen wird. So konnte sowohl in Medulloblastomen als auch in Glioblastomen mit einem Anstieg des Proteins NNAT eine signifikant gesteigerte Zell-Proliferation verzeichnet werden [105, 127]. In einer Studie von Jung et al. wurde mithilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 belegt, dass Mammakarzinome, die eine gesteigerte Zell-Proliferation zeigten, auch vermehrt Metastasen aufwiesen [57]. Abschließend kann man schlussfolgern, dass eine deutliche Erhöhung der NNAT-Expression mit einer gesteigerten Zell-Proliferation assoziiert ist und mit dem Auftreten von syn- bzw. metachronen Metastasen korreliert. Da NNAT in primären Mammakarzinomen, die zu einem späteren Zeitpunkt Fernmetastasen aufwiesen, stark exprimiert wurde, könnte NNAT als potenzieller Prognosemarker für eine mögliche metachrone Metastasierung in Frage kommen.

5.4.4 Neuronatin-Expression und Hormonrezeptorstatus

Der ER- und der PR-Status sind wichtige prognostische Faktoren. Beispielsweise haben Mammakarzinompatientinnen mit einem positiven Hormonrezeptorstatus eine bessere Prognose [49, 130]. NNAT zeigt, wie in der vorliegenden Dissertation dargestellt, eine höhere Expression in ER- und PR-negativen als in Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen. Daraus kann man schlussfolgern, dass eine höhere NNAT-Expression in Bezug auf die Hormonrezeptoren mit einer schlechteren Prognose korreliert.

Bei Mammakarzinompatientinnen ist ein positiver Hormonrezeptorstatus Indikator für eine endokrine Therapie [104]. So führt beispielsweise eine Tamoxifen-Therapie zu einer Reduktion der Rezidiv- bzw. Sterbewahrscheinlichkeit gegenüber Patientinnen ohne diese [41]. Entsprechend konnten Becker et al. zeigen, dass Tamoxifen-resistente Mammakarzinome eine deutlich erhöhte NNAT-Expression gegenüber Tamoxifensensitiven Karzinomen aufwiesen [11]. Auch in Bezug auf das Medulloblastom zeigten Therapie-resistenten Tumoren eine gesteigerte NNAT-Expression [105]. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass eine erhöhte NNAT-Expression mit einer vermehrten Therapieresistenz in malignen Tumoren und der damit verbundenen

ungünstigeren Prognose einhergeht.

5.4.5 Neuronatin-Expression und Nottingham-Prognose-Index

Der NPI ist eine sehr gute Möglichkeit, die Prognose von Patientinnen mit Mammakarzinomen anzugeben [16, 46]. Im vorliegenden Untersuchungskollektiv zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p=0,043$) zwischen dem NPI und der NNAT-Expression. Die niedrigsten NNAT-Expressionen mit einem IRS von 7,6 und 6,9 fanden sich in den Gruppen mit exzellenter bzw. guter Prognose. Die Expression von NNAT stieg mit sinkender Prognose, wobei der IRS für die sehr schlechte Prognosegruppe 11,3 betrug. Aufgrund der signifikanten Korrelation ist davon auszugehen, dass NNAT ein wichtiger Marker für die Prognose von Mammakarzinomen ist. Insgesamt kann man sagen, dass je höher die NNAT-Expression ist, desto ungünstiger ist die Prognose für die Mammakarzinompatientinnen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Prognose und der NNAT-Expression konnten auch die Studien von Uchihara et al. [117] und Xu et al. [127] zeigen. In der erstgenannten Studie konnte bei Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge eine deutlich schlechtere Prognose verzeichnet werden, wenn eine erhöhte NNAT-Expression vorlag [117], während derselbe Zusammenhang bei Patienten mit einem Glioblastom in der zweiten Studie festgestellt wurde [127].

5.4.6 Neuronatin-Expression und Überleben

Das rezidivfreie und das Gesamtüberleben sind prognostisch sehr aussagekräftige Angaben für Patientinnen mit einem Mammakarzinom. Letztere wurden in dem hier vorliegenden Kollektiv in Bezug auf die NNAT-Expression hin untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass eine hohe NNAT-Expression im Gegensatz zu einer niedrigen Expression signifikant mit einem kürzeren rezidivfreien bzw. kürzeren Gesamtüberleben mit entsprechend schlechterer Prognose einhergeht.

Das Gesamtüberleben korrelierte hochsignifikant ($p < 0,001$) mit der NNAT-Expression. Hier ergab sich in der Gruppe mit einer geringen NNAT-Expression (< 14) ein Gesamtüberleben von durchschnittlich 164 Monate und in der Gruppe mit einer hohen NNAT-Expression (≥ 14) von nur 81 Monaten. Ebenfalls signifikant verhielt sich die 5- und 10-JÜR gegenüber der NNAT-Expression. Mammakarzinome mit einer niedrigen NNAT-Expression (< 14) hatten ein 5-JÜR von 92 % bzw. 10-JÜR von 88 %. Demgegenüber fiel die 5-JÜR auf 49 % und die 10-JÜR auf 38 % für Karzinome mit einer hohen NNAT-Expression (≥ 14). Dass die NNAT-Expression signifikant mit dem Gesamtüberleben korreliert, zeigte auch eine Studie an Adenokarzinomen der Lunge. Dort lag die 5-JÜR bei fehlender NNAT-Expression ($< 5\%$) mit

85 % deutlich über der 40 %-igen 5-JÜR der Adenokarzinome mit NNAT-Expression ($> 5\%$) [117]. In der Publikation von Xu et al. zeigten Glioblastome mit einer niedrigen NNAT-Expression ($\leq 30\%$) eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit und ein längeres Überleben von durchschnittlich 19 Monaten gegenüber Glioblastomen mit einer hohen NNAT-Expression ($> 30\%$), die nur im Mittel 11 Monate überlebten [127].

Analog zum Gesamtüberleben zeigte das rezidivfreie Überleben mit einer mittleren Überlebenszeit von 160 Monaten für niedrig exprimierende und mit 102 Monaten für hoch exprimierende Mammakarzinome eine signifikante Korrelation ($p = 0,003$) zu der NNAT-Expression. Für die 3- bzw. 5-JÜR ergab sich derselbe Zusammenhang mit folgenden Daten. Die Patientinnen mit Mammakarzinomen mit geringer NNAT-Expression (< 14) wiesen eine rezidivfreie 3-JÜR von 92 % bzw. eine rezidivfreie 5-JÜR von 87 % auf. Bei einer hohen NNAT-Expression (≥ 14) betrugen die 3-JÜR bzw. die 5-JÜR für das rezidivfreie Überleben nur 70 % bzw. 61 %. Vergleichbare Studien bezüglich des Zusammenhangs zwischen des rezidivfreien Überlebens und der NNAT-Expression fanden sich nicht.

Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass die NNAT-Expression einen guten Indikator für das rezidivfreie und das Gesamtüberleben darstellt.

5.5 Neuronatin-Expression und therapeutische Ansätze

In den Abschnitten 1.2.3 und 1.2.4 wurde dargestellt, dass eine gesteigerte NNAT-Expression zu einer Erhöhung der Menge an zytoplasmatischem Ca^{2+} und zur Endoplasmatischen Retikulum-Stressreaktion führt [100]. Ein gestörter Ca^{2+} -Haushalt der Zelle und persistierender Endoplasmatischer Retikulum-Stress tragen zur Karzinomentstehung bei [123]. Dabei stellt die miRNA-708 einen therapeutischen Ansatzpunkt dar. In einer Studie an Mammakarzinomzell-Linien konnte gezeigt werden, dass miRNA-708 NNAT supprimiert. Dadurch fällt der zytoplasmatische Ca^{2+} -Spiegel ab und die Zellmigration und die Metastasenentstehung werden gehemmt [96]. Angelehnt an diese Studie wurden iProstatakarzinomzell-Linien mit Metformin behandelt, was zum Anstieg der miRNA und zum Abfall des NNAT-Spiegels führte [128]. Dass Metformin auch als mögliche Therapieoption für Mammakarzinome in Frage kommt, zeigt eine Studie von Alimova et al. [2]. Dazu wurden Mammakarzinomzellen in vitro mit Metformin behandelt. Dies hatte den Effekt, dass die Tumorzellproliferation gehemmt wurde, indem diese Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verblieben [2].

Da der dauerhafte Endoplasmatische Retikulum-Stress an der Karzinomentstehung

beteiligt ist [123], wurden aufbauend darauf zahlreiche Studien mit unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen durchgeführt [99]. Die Ursachen für die Endoplasmatische Retikulum-Stressreaktion sind vielfältig [50, 61, 119] und stellen die Grundlage für viele Ansatzpunkte von verschiedensten Therapiemöglichkeiten dar. In der Übersichtsarbeit von Schönthal wurden mehrere pharmakologische Substanzen aufgeführt, die bei gestörtem Ca^{2+} -Haushalt Wirkung zeigen [99]. Diese wurden sowohl in vitro als auch in vivo getestet und führen zu einer Eskalation der persistierenden Endoplasmatischen Retikulum-Stressreaktion in Tumorzellen und leiten damit die Apoptose der Zelle ein. Da NNAT Einfluss auf den Ca^{2+} -Spiegel der Zelle hat, ergeben sich daraus mögliche therapeutische Ansätze, die weiter erforscht werden müssen.

Abschließend sollte erwähnt werden, dass dies nur therapeutische Ansätze sind, die trotz potenzieller Therapierelevanz nicht allein eingesetzt werden würden, sondern eher Bestandteile einer multimodalen Therapie wären.

5.6 Kritische Betrachtung der Relevanz der Neuronatin-Expression

Die in dieser Dissertation durchgeführte immunhistochemische Untersuchung der NNAT-Expression, welche anhand des unter 3.2.1 beschriebenen IRS ausgewertet wurde, ist ein semiquantitatives Verfahren. Das heißt, dass zwischen den ermittelten Scorewerten kein definierter Größenbezug vorliegt, was unter Umständen die Aussagekraft dieses Verfahrens einschränken könnte. Um die immunhistochemische NNAT-Expression zu bestätigen, ist auch die Durchführung einer Western Blot Analyse denkbar. Mithilfe dieses Verfahrens wurden sowohl bei Glioblastomen als auch bei Adenokarzinomen der Lunge zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung die relative Menge des Proteins NNAT mit entsprechender Korrelation bestimmt [117, 127]. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass selbst der IRS nach Remmele [89], der für die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus angewendet wird, ein semiquantitatives Verfahren ist. Dieser konnte sich aufgrund therapeutischer Relevanz etablieren und gehört nun zur Routinediagnostik. Aufgrund des in Abschnitt 5.5 angedeuteten Potenzials für therapeutische Ansätze könnte NNAT in Zukunft für die Diagnostik in Frage kommen.

Die NNAT-Expression stellte sich in der vorliegenden Arbeit als ein sehr aussagekräftiger Proliferationsmarker für Patientinnen mit einem Mammakarzinom dar. Dennoch wird er nicht allein für die Prognoseabschätzung ausreichen, da bereits, wie in Abschnitt 1.1.4 aufgeführt, zahlreiche gute Prognosefaktoren etabliert sind. Einige dieser Faktoren, wie beispielsweise der NPI, verursachen zudem keine zu-

sätzlichen Kosten. Die immunhistochemische Analyse der NNAT-Expression hingegen würde Mehrkosten mit sich bringen. Zusätzlich bzw. in Kombination mit den bereits routinemäßig erhobenen Prognoseparametern könnte die NNAT-Expression von Nutzen sein. Beispielsweise könnte für bestimmten Untergruppen die Aussagekraft der NNAT-Expression für eine differenzierte Prognoseabschätzung weiter erforscht werden, wie im nachstehenden Absatz dargelegt wird.

Zum einen könnte die NNAT-Expression genutzt werden, um in der Gruppe der primär metastasierten Mammakarzinome, welche nach neuesten Statistiken nur noch 5 % aller Mammakarzinome ausmacht [6], eine weitere Prognosedifferenzierung vorzunehmen. Die Patientinnen mit synchron metastasierten Mammakarzinomen haben grundsätzlich eine schlechte Prognose [69, 77, 90] und könnten unter Umständen anhand der NNAT-Expression weiter in verschiedene Prognosegruppen unterteilt werden. Zum anderen könnte die immunhistochemische Analyse von NNAT bei triple-negativen Mammakarzinomen angewendet werden. Diese Tumorgruppe zeigt ebenfalls eine ungünstige Prognose [30, 87] und umfasst neuesten Studien zufolge 13–19 % aller Mammakarzinome [80, 112]. Hier ist ebenfalls eine detailliertere Prognoseeinteilung anhand der NNAT-Expression denkbar. Die Expression von NNAT könnte weiterhin auch in Bezug auf die einzelnen Tumorstadien angewendet werden. So könnte die ohnehin gute Prognose der Mammakarzinompatientinnen, die ein Tumorstadium pT1 (bundesweit 53 % [58]) aufweisen [97], durch die zusätzliche Bestimmung der NNAT-Expression präziser abgeschätzt werden. Uchiyama et al. konnten bereits, abhängig von der NNAT-Expression, einen signifikanten Unterschied in der 5-JÜR von Patienten mit Adenokarzinomen der Lunge im Tumorstadium I feststellen. Die Patienten mit einer erhöhten NNAT-Expression zeigten dabei ein deutlich kürzeres Gesamtüberleben [117].

Für eine genauere Prognoseabschätzung sollten für die einzelnen Untergruppen noch gesonderte Studien durchgeführt werden, da die Subgruppen in dem hier untersuchten Kollektiv teilweise keine repräsentative Größe aufwiesen. Auf diese Weise könnten auch spezifischere Fragestellungen wie das Verhältnis zwischen der NNAT-Expression im Primärtumor und Metastasen erörtert werden.

5.7 Neuronatin als unabhängiger Prognoseparameter für das Mammakarzinom

Eine gesteigerte NNAT-Expression korrelierte hochsignifikant mit einem kürzeren rezidivfreien und kürzeren Gesamtüberleben in dem in dieser Dissertation untersuchten Patientinnenkollektiv. In der multivariaten Analyse konnte die NNAT-Expression in Mammakarzinomen als stärkster unabhängiger Prognosefaktor für das

rezidivfreie und das Gesamtüberleben identifiziert werden. Dies steht in Übereinstimmung mit der Publikation von Xu et al. zu Glioblastomen, in der eine hohe NNAT-Expression als unabhängiger Prognosefaktor für ein kürzeres Gesamtüberleben ermittelt wurde [127]. Neben einer hohen NNAT-Expression konnte in dieser Arbeit das Vorliegen von metachronen Metastasen ebenfalls als unabhängiger prognostisch ungünstiger Faktor nachgewiesen werden.

In Abschnitt 5.4.1 wurde bereits gezeigt, dass eine gesteigerte NNAT-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Hier zeigten Mammakarzinome mit einem geringen Differenzierungsgrad, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem größeren Tumordurchmesser, vorhandenen synchronen Fernmetastasen und einem negativen ER- bzw. PR-Status eine hohe NNAT-Expression, passend zu der damit verbundenen ungünstigeren Prognose.

Neben dem Hauptresultat dieser Arbeit, der Identifikation der NNAT-Expression als starken unabhängigen Prognosefaktor, stellt sich diese auch als vielversprechender Indikator für das Auftreten von metachronen Metastasen dar. Diese Nutzung sowie die in Abschnitt 5.5 diskutierte Entwicklung therapeutischer Ansätze stellen Möglichkeiten für weitere Forschungsarbeit dar.

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist weltweit der häufigste maligne Tumor der Frau. Es gibt mehrere prädiktive und prognostische Parameter, die Auskunft über den Krankheitsverlauf geben. Neuronatin ist ein Protein, das hauptsächlich im neonatalen Gehirn während der neuronalen Entwicklung exprimiert wird. In wenigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Neuronatin-Expression in malignen Tumoren prognostisch signifikant ist. Ziel dieser Dissertation war es, die prognostische Relevanz der Neuronatin-Expression speziell für das Mammakarzinom zu evaluieren.

Zu diesem Zweck wurden immunhistochemische Analysen an Mammakarzinomen von 148 Patientinnen (1999–2006) durchgeführt und die Neuronatin-Expression auf Korrelation mit diversen klinisch-pathologischen Faktoren sowie dem rezidivfreien und dem Gesamtüberleben hin untersucht.

Die Expression von Neuronatin konnte sowohl im Mammakarzinom als auch im Carcinoma in situ und im normalen Brustdrüsenparenchym beobachtet werden. Dabei wies das Carcinoma in situ die stärkste Expression auf, gefolgt vom invasiven Karzinom. Das normale Brustdrüsenparenchym exprimierte Neuronatin nur in geringem Maße. Ein signifikanter Anstieg von Neuronatin konnte bei jedem der folgenden Parameter nachgewiesen werden: einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer steigenden Tumorgroße, einem geringeren Differenzierungsgrad, einem negativen Hormonrezeptorstatus sowie bei vorliegender Metastasierung. Unter Betrachtung des Nottingham-Prognose-Index korrelierte eine niedrige Neuronatin-Expression mit einer guten und eine hohe Expression mit einer schlechten Prognose. Darüber hinaus zeigten Patientinnen mit einer gesteigerten Neuronatin-Expression ein kürzeres rezidivfreies sowie ein kürzeres Gesamtüberleben.

Ein wichtiges Resultat der Arbeit ist die Feststellung, dass die Neuronatin-Expression ein von den anderen klinisch-pathologischen Faktoren unabhängiger Prognosefaktor für das Mammakarzinom ist. Somit präsentiert sich dieser als möglicher ergänzender Prognoseparameter. Schließlich stellt die Neuronatin-Expression in Mammakarzinomen aufgrund der intrazytoplasmatischen Funktion von Neuronatin eine potenzielle Grundlage neuer therapeutischer Ansätze und weiterführender Forschung dar.

Literatur

- [1] Y. Adachi, J. Ishiguro, H. Kotani, T. Hisada, M. Ichikawa et al. *Comparison of clinical outcomes between luminal invasive ductal carcinoma and luminal invasive lobular carcinoma*. In: *BMC Cancer* 16.1 (2016), S. 1–9.
- [2] I. N. Alimova, B. Liu, Z. Fan, S. M. Edgerton, T. Dillon et al. *Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro*. In: *Cell Cycle* 8.6 (2009), S. 909–915.
- [3] D. C. Allred. *Issues and updates: evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer*. In: *Modern Pathology* 23 (2010), S. 52–59.
- [4] D. C. Allred, J. M. Harvey, M. Berardo und G. M. Clark. *Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis*. In: *Modern Pathology* 11.2 (1998), S. 155–168.
- [5] A. S. AlZaman, S. A. Mughal, Y. S. AlZaman und E. S. AlZaman. *Correlation between hormone receptor status and age, and its prognostic implications in breast cancer patients in Bahrain*. In: *Saudi Medical Journal* 37.1 (2016), S. 37–42.
- [6] American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta: American Cancer Society. 2016.
- [7] F. Andre, K. Slimane, T. Bachelot, A. Dunant, M. Namer et al. *Breast Cancer With Synchronous Metastases: Trends in Survival During a 14-Year Period*. In: *Journal of Clinical Oncology* 22.16 (2004), S. 3302–3308.
- [8] A. Antoniou, P. D. P. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord et al. *Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies*. In: *The American Journal of Human Genetics* 72.5 (2003), S. 1117–1130.

-
- [9] R. Arriagada, M. G. Le, A. Dunant, M. Tubiana und G. Contesso. *Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period.* In: *Cancer* 106.4 (2006), S. 743–750.
 - [10] D. P. Bartel. *MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.* In: *Cell* 116.2 (2004), S. 281–297.
 - [11] M. Becker, A. Sommer, J. R. Krättschmar, H. Seidel, H.-D. Pohlenz et al. *Distinct gene expression patterns in a tamoxifen-sensitive human mammary carcinoma xenograft and its tamoxifen-resistant subline MaCa 3366/TAM.* In: *Molecular Cancer Therapeutics* 4.1 (2005), S. 151–170.
 - [12] L. Bernstein, A. V. Patel, G. Ursin, J. Sullivan-Halley, M. F. Press et al. *Lifetime recreational exercise activity and breast cancer risk among black women and white women.* In: *Journal of the National Cancer Institute* 97.22 (2005), S. 1671–1679.
 - [13] M. J. Berridge. *The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle.* In: *Cell Calcium* 32.5 (2002), S. 235–249.
 - [14] D. A. Berry, K. A. Cronin, S. K. Plevritis, D. G. Fryback, L. Clarke et al. *Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer.* In: *New England Journal of Medicine* 353.17 (2005), S. 1784–1792.
 - [15] C. Biesheuvel, S. Weige und W. Heindel. *Mammography Screening: Evidence, History and Current Practice in Germany and Other European Countries.* In: *Breast Care* 6.2 (2011), S. 104–109.
 - [16] R. W. Blamey, I. O. Ellis, S. Pinder, A. Lee, R. D. Macmillan et al. *Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990–1999.* In: *European Journal of Cancer* 43.10 (2007), S. 1548–1555.
 - [17] A. Bleyer und H. G. Welch. *Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence.* In: *New England Journal of Medicine* 367.21 (2012), S. 1998–2005.
 - [18] H. J. G. Bloom und W. W. Richardson. *Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.* In: *British Journal of Cancer* 11.3 (1957), S. 359–377.
 - [19] S. Bustreo, S. Osella-Abate, P. Cassoni, M. Donadio, M. Airolidi et al. *Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up.* In: *Breast Cancer Research and Treatment* 157.2 (2016), S. 363–371.

-
- [20] M. C. U. Cheang, S. K. Chia, D. Voduc, D. Gao, S. Leung et al. *Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer*. In: *Journal of the National Cancer Institute* 101.10 (2009), S. 736–750.
 - [21] K. Chu und M.-J. Tsai. *Neuronatin, a Downstream Target of BETA2/NeuroD1 in the Pancreas, Is Involved in Glucose-Mediated Insulin Secretion*. In: *diabetes* 54.4 (2005), S. 1064–1073.
 - [22] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer and others. *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease*. In: *The Lancet* 358.9291 (2001), S. 1389–1399.
 - [23] D. J. Dabbs, S. J. Schnitt, F. C. Geyer, B. Weigelt, F. L. Baehner et al. *Lobular neoplasia of the breast revisited with emphasis on the role of E-cadherin immunohistochemistry*. In: *The American Journal of Surgical Pathology* 37.7 (2013), S. 1–11.
 - [24] S. Dawood, K. Broglio, A. U. Buzdar, G. N. Hortobagyi und S. H. Giordano. *Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review*. In: *Journal of Clinical Oncology* 28.1 (2010), S. 92–98.
 - [25] R. De Angelis, M. Sant, M. P. Coleman, S. Francisci, P. Baili et al. *Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE-5 — a population-based study*. In: *The Lancet Oncology* 15.1 (2014), S. 23–34.
 - [26] T. Decker, D. Hungermann und W. Böcker. *Prognostische und prädiktive Faktoren invasiver Mammakarzinome*. In: *Der Pathologe* 30.1 (2009), S. 49–55.
 - [27] D. Dou und R. Joseph. *Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome-20q11.2–12: the deduced protein is a novel ‘proteolipid’*. In: *Brain Research* 723.1 (1996), S. 8–22.
 - [28] D. Dou und R. Joseph. *Structure and Organization of the Human Neuronatin Gene*. In: *Genomics* 33.2 (1996), S. 292–297.
 - [29] L. Dugu, M. Takahara, G. Tsuji, Y. Iwashita, X. Liu et al. *Abundant expression of neuronatin in normal eccrine, apocrine and sebaceous glands and their neoplasms*. In: *The Journal of Dermatology* 37.9 (2010), S. 846–848.
 - [30] A. Elkhany, V. J. Suman, V. Cafourek, J. A. Gilbert, J. N. Ingle et al. *Abstract P5-02-11: Triple negative breast cancer: The role of classic histological and prognostic factors on disease free survival*. In: *Cancer Research* 75.9 Supplement (2015).

-
- [31] I. O. Ellis, M. Galea, N. Broughton, A. P. Locker, R. W. Blamey et al. *Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up.* In: *Histopathology* 20.6 (1992), S. 479–489.
 - [32] C. W. Elston und I. O. Ellis. *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.* In: *Histopathology* 19.5 (1991), S. 403–410.
 - [33] M. J. Engstrøm, S. Opdahl, A. I. Hagen, P. R. Romundstad, L. A. Akslen et al. *Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients.* In: *Breast Cancer Research and Treatment* 140.3 (2013), S. 463–473.
 - [34] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers et al. *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.* In: *International Journal of Cancer* 136.5 (2015), S. 359–386.
 - [35] M. Filipits, M. Rudas, R. Jakesz, P. Dubsy, F. Fitzal et al. *A New Molecular Predictor of Distant Recurrence in ER-Positive, HER2-Negative Breast Cancer Adds Independent Information to Conventional Clinical Risk Factors.* In: *Clinical Cancer Research* 17.18 (2011), S. 6012–6020.
 - [36] M. H. Galea, R. W. Blamey, C. W. Elston und I. O. Ellis. *The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer.* In: *Breast Cancer Research and Treatment* 22.3 (1992), S. 207–219.
 - [37] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab et al. *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.* In: *The Journal of Immunology* 133.4 (1984), S. 1710–1715.
 - [38] J. I. Goldberg und P. I. Borgen. *Breast cancer susceptibility testing: past, present and future.* In: *Expert Review of Anticancer Therapy* 6.8 (2006), S. 1205–1214.
 - [39] A. Goldhirsch, J. H. Glick, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann et al. *Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005.* In: *Annals of Oncology* 16.10 (2005), S. 1569–1583.
 - [40] A. Goldhirsch, W. C. Wood, A. S. Coates, R. D. Gelber, B. Thürlimann et al. *Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.* In: *Annals of Oncology* 22.8 (2011), S. 1736–1747.

-
- [41] E. B. C. T. C. Group et al. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. In: *The Lancet* 365.9472 (2005), S. 1687–1717.
 - [42] T. Gu, X. Su, S. Zhao und C. Li. *Methylation differences of the neuronatin gene promoter region in liver between normal and cloned pigs*. In: *Animal Genetics* 45.1 (2014), S. 122–124.
 - [43] A. Guerrero-Hernandez und A. Verkhatsky. *Calcium signalling in diabetes*. In: *Cell Calcium* 56.5 (2014), S. 297–301.
 - [44] M. E. Hammond, D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerty et al. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer*. In: *Journal of Clinical Oncology* 28.16 (2010), S. 2784–2795.
 - [45] M. E. Hammond, D. F. Hayes und A. C. Wolff. *Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer*. In: *Journal of Clinical Oncology* 29.15 (2011), S. 458.
 - [46] J. L. Haybittle, R. W. Blamey, C. W. Elston, J. Johnson, P. J. Doyle et al. *A prognostic index in primary breast cancer*. In: *British Journal of Cancer* 45.3 (1982), S. 361–366.
 - [47] B. J. Hearne, M. D. Teare, M. Butt und L. Donaldson. *Comparison of Nottingham Prognostic Index and Adjuvant Online prognostic tools in young women with breast cancer: review of a single-institution experience*. In: *BMJ Open* 5.1 (2015), S. 1–8.
 - [48] D. E. Henson, L. Ries, L. S. Freedman und M. Carriaga. *Relationship Among Outcome, Stage of Disease, and Histologic Grade for 22,616 Cases of Breast Cancer. The Basis for a Prognostic Index*. In: *Cancer* 68.10 (1991), S. 2142–2149.
 - [49] W. J. Howat, F. M. Blows, E. Provenzano, M. N. Brook, L. Morris et al. *Performance of automated scoring of ER, PR, HER2, CK5/6 and EGFR in breast cancer tissue microarrays in the Breast Cancer Association Consortium*. In: *The Journal of Pathology: Clinical Research* 1.1 (2015), S. 18–32.
 - [50] M. Høyer-Hansen und M. Jäättelä. *Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium*. In: *Cell Death & Differentiation* 14.9 (2007), S. 1576–1582.

-
- [51] J. Hubertus, F. Zitzmann, F. Trippel, J. Muller-Hocker, M. Stehr et al. *Selective Methylation of CpGs at Regulatory Binding Sites Controls NNAT Expression in Wilms Tumors*. In: *PLoS ONE* 8.6 (2013), S. 1–8.
 - [52] E. C. Inwald, M. Klinkhammer-Schalke, F. Hofstädter, F. Zeman, M. Koller et al. *Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry*. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 139.2 (2013), S. 539–552.
 - [53] M. V. Iorio, M. Ferracin, C.-G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo et al. *MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer*. In: *Cancer Research* 65.16 (2005), S. 7065–7070.
 - [54] S. H. Javid, B. L. Smith, E. Mayer, J. Bellon, C. D. Murphy et al. *Tubular carcinoma of the breast: results of a large contemporary series*. In: *The American Journal of Surgery* 197.5 (2009), S. 674–677.
 - [55] M. K. Joe, H. J. Lee, Y. H. Suh, K. L. Han, J. H. Lim et al. *Crucial roles of neuronatin in insulin secretion and high glucose-induced apoptosis in pancreatic β -cells*. In: *Cellular Signalling* 20.5 (2008), S. 907–915.
 - [56] R. Joseph, D. Dou und W. Tsang. *Molecular cloning of a novel mRNA (neuronatin) that is highly expressed in neonatal mammalian brain*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201.3 (1994), S. 1227–1234.
 - [57] S.-Y. Jung, W. Han, J. W. Lee, E. Ko, E. Kim et al. *Ki-67 Expression Gives Additional Prognostic Information on St. Gallen 2007 and Adjuvant! Online Risk Categories in Early Breast Cancer*. In: *Annals of Surgical Oncology* 16.5 (2009), S. 1112–1121.
 - [58] P. Kaatsch et al. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausg. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2015.
 - [59] M. Kiderlen, A. Ponti, M. Tomatis, P. G. Boelens, E. Bastiaannet et al. *Variations in compliance to quality indicators by age for 41,871 breast cancer patients across Europe: A European Society of Breast Cancer Specialists database analysis*. In: *European Journal of Cancer* 51.10 (2015), S. 1221–1230.
 - [60] N. Kikyo, C. M. Williamson, R. M. John, S. C. Barton, C. V. Beechey et al. *Genetic and functional analysis of neuronatin in mice with maternal or paternal duplication of distal Chr 2*. In: *Developmental Biology* 190.1 (1997), S. 66–77.
 - [61] J. Krebs. *The role of calcium in apoptosis*. In: *BioMetals* 11.4 (1998), S. 375–382.

-
- [62] J. Krebs, L. B. Agellon und M. Michalak. *Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460.1 (2015), S. 114–121.
- [63] R. Kreienberg und O. des Leitlinienprogramms Onkologie. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms: Langversion 3.0, Aktualisierung 2012, AWMF-Register-Nummer: 032-045OL*. Zuckschwerdt, 2012.
- [64] F. Kurshumliu, L. Gashi-Luci, S. Kadare, M. Alimehmeti und U. Gozalan. *Classification of patients with breast cancer according to Nottingham Prognostic Index highlights significant differences in immunohistochemical marker expression*. In: *World Journal of Surgical Oncology* 12.1 (2014), S. 1–5.
- [65] M. Lacroix und G. Leclercq. *The “portrait” of hereditary breast cancer*. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 89.3 (2005), S. 297–304.
- [66] S. R. Lakhani, I. O. Ellis, S. J. Schnitt, P. Hoon Tan und M. J. van de Vijver. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. International Agency for Research on Cancer, 2012.
- [67] T. Lehtimäki, M. Lundin, N. Linder, H. Sihto, K. Holli et al. *Long-term prognosis of breast cancer detected by mammography screening or other methods*. In: *Breast Cancer Research* 13.6 (2011), S. 1–11.
- [68] C. I. Li, D. J. Uribe und J. R. Daling. *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*. In: *British Journal of Cancer* 93.9 (2005), S. 1046–1052.
- [69] M.-T. Liu, W.-T. Huang, A.-Y. Wang, C.-C. Huang, C.-Y. Huang et al. *Prediction of outcome of patients with metastatic breast cancer: evaluation with prognostic factors and Nottingham prognostic index*. In: *Supportive Care in Cancer* 18.12 (2010), S. 1553–1564.
- [70] M. W. J. Louwman, M. Vriezen, M. W. van Beek, M. C. Nolthenius-Puylaert, M. J. van der Sangen et al. *Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands*. In: *International Journal of Cancer* 121.1 (2007), S. 127–135.
- [71] M. Malvezzi, P. Bertuccio, T. Rosso, M. Rota, F. Levi et al. *European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women*. In: *Annals of Oncology* 26.4 (2015), S. 779–786.
- [72] S. Ménard, A. Balsari, P. Casalini, E. Tagliabue, M. Campiglio et al. *HER-2-positive breast carcinomas as a particular subset with peculiar clinical behaviors*. In: *Clinical Cancer Research* 8.2 (2002), S. 520–525.

-
- [73] Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman et al. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. In: *Science* 266.5182 (1994), S. 66–71.
 - [74] C. Navarre, M. Ghislain, S. Leterme, C. Ferroud, J.-P. Dufour et al. *Purification and Complete Sequence of a Small Proteolipid Associated with the Plasma Membrane H^+ -ATPase of *Saccharomyces cerevisiae**. In: *Journal of Biological Chemistry* 267.9 (1992), S. 6425–6428.
 - [75] P. A. Newcomb, A. Trentham-Dietz, J. M. Hampton, K. M. Egan, L. Titus-Ernstoff et al. *Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer*. In: *Cancer* 117.9 (2011), S. 1946–1956.
 - [76] K. M. O’Brien, C. Fei, D. P. Sandler, H. B. Nichols, L. A. DeRoo et al. *Hormone therapy and young-onset breast cancer*. In: *American Journal of Epidemiology* 181.10 (2015), S. 799–807.
 - [77] I. A. Olivotto, B. Chua, S. J. Allan, C. H. Speers, S. Chia et al. *Long-term survival of patients with supraclavicular metastases at diagnosis of breast cancer*. In: *Journal of Clinical Oncology* 21.5 (2003), S. 851–854.
 - [78] A. A. Onitilo, J. M. Engel, R. T. Greenlee und B. N. Mukesh. *Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival*. In: *Clinical Medicine & Research* 7.1-2 (2009), S. 4–13.
 - [79] S. Paik, S. Shak, G. Tang, C. Kim, J. Baker et al. *A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer*. In: *The New England Journal of Medicine* 351.27 (2004), S. 2817–2826.
 - [80] C. A. Parise und V. Caggiano. *Breast cancer survival defined by the ER/PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers*. In: *Journal of Cancer Epidemiology* 2014 (2014), S. 1–11.
 - [81] D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay und P. Pisani. *Global cancer statistics, 2002*. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55.2 (2005), S. 74–108.
 - [82] W. Paulus, G. Klöppel, W. Remmele, H. H. Kreipe und J. M. Schröder. *Pathologie: Neuropathologie*. 3. Aufl., S. 504–517. Springer-Verlag, 2012.
 - [83] K. Pearson. *On the Criterion that a given System of Deviations from the Probable in the Case of a Correlated System of Variables is such that can be reasonably supposed to have arisen from Random Sampling*. In: *Philosophical Magazine* 50 (1900), S. 157–175.

-
- [84] M. E. Pérez-López, J. García-Gómez, M. T. Alves, A. Paradela, J. García-Mata et al. *Ki-67 is a prognostic marker for hormone receptor positive tumors*. In: *Clinical and Translational Oncology* 18.10 (2016), S. 996–1002.
- [85] B. C. Pestalozzi, D. Zahrieh, E. Mallon, B. A. Gusterson, K. N. Price et al. *Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials*. In: *Journal of Clinical Oncology* 26.18 (2008), S. 3006–3014.
- [86] E. A. Rakha, S. Martin, A. H. Lee, D. Morgan, P. D. Pharoah et al. *The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma*. In: *Cancer* 118.15 (2012), S. 3670–3680.
- [87] E. A. Rakha, M. E. El-Sayed, A. R. Green, A. H. Lee, J. F. Robertson et al. *Prognostic markers in triple-negative breast cancer*. In: *Cancer* 109.1 (2007), S. 25–32.
- [88] G. Reeves, K. Pirie, J. Green, D. Bull und V. Beral. *Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis*. In: *British Journal of Cancer* 100.3 (2009), S. 538–544.
- [89] W. Remmele und H. Stegner. *Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe*. In: *Der Pathologe* 8.3 (1987), S. 138–140.
- [90] Z. Ren, Y. Li, O. Hameed, G. P. Siegal und S. Wei. *Prognostic factors in patients with metastatic breast cancer at the time of diagnosis*. In: *Pathology – Research and Practice* 210.5 (2014), S. 301–306.
- [91] M. Román, S. Sakshaug, S. Graff-Iversen, S. Vangen, E. Weiderpass et al. *Postmenopausal hormone therapy and the risk of breast cancer in Norway*. In: *International Journal of Cancer* 138.3 (2016), S. 584–593.
- [92] J. Rosenberg, Y. L. Chia und S. Plevritis. *The effect of age, race, tumor size, tumor grade, and disease stage on invasive ductal breast cancer survival in the US SEER database*. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 89.1 (2005), S. 47–54.
- [93] B. Rosner, A. H. Eliassen, A. T. Toriola, S. E. Hankinson, W. C. Willett et al. *Short-term weight gain and breast cancer risk by hormone receptor classification among pre-and postmenopausal women*. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 150.3 (2015), S. 643–653.
- [94] J. S. Ross. *Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy*. In: *Drug News & Perspectives* 22.2 (2009), S. 93–106.

-
- [95] C. Rusner, K. Wolf, U. Bandemer-Greulich, J. Engel, C. Stegmaier et al. *Risk of contralateral second primary breast cancer according to hormone receptor status in Germany*. In: *Breast Cancer Research* 16.5 (2014), S. 1–7.
 - [96] S. Ryu, K. McDonnell, H. Choi, D. Gao, M. Hahn et al. *Suppression of miRNA-708 by Polycomb Group Promotes Metastases by Calcium-Induced Cell Migration*. In: *Cancer Cell* 23.1 (2013), S. 63–76.
 - [97] S. Saadatmand, R. Bretveld, S. Siesling und M. M. Tilanus-Linthorst. *Influence of tumour stage at breast cancer detection on survival in modern times: population based study in 173797 patients*. In: *BMJ* 351, h4901 (2015), S. 1–9.
 - [98] J. C. Salmen. “Der Progesteronrezeptor und andere Prognosefaktoren beim Mammakarzinom-eine multizentrische Kohortenstudie”. Diss. Ulm, Universität Ulm, Diss., 2014, 2015.
 - [99] A. H. Schönthal. *Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer*. In: *Biochemical Pharmacology* 85.5 (2013), S. 653–666.
 - [100] J. Sharma, D. Mukherjee, S. N. Rao, S. Iyengar, S. K. Shankar et al. *Neuronatin-mediated Aberrant Calcium Signaling and Endoplasmic Reticulum Stress Underlie Neuropathology in Lafora disease*. In: *Journal of Biological Chemistry* 288.13 (2013), S. 9482–9490.
 - [101] J. Sharma, S. N. Rao, S. K. Shankar, P. Satishchandra und N. R. Jana. *Lafora disease ubiquitin ligase malin promotes proteasomal degradation of neuronatin and regulates glycogen synthesis*. In: *Neurobiology of Disease* 44.1 (2011), S. 133–141.
 - [102] L. Shema, L. Ore, M. Ben-Shachar, M. Haj und S. Linn. *The association between breastfeeding and breast cancer occurrence among Israeli Jewish women: a case control study*. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 133.8 (2007), S. 539–546.
 - [103] T. Z. Shokouh, A. Ezatollah und P. Barand. *Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes: Retrospective-Observational Analytical Study*. In: *Medicine* 94.32 (2015), S. 1–6.
 - [104] S. Siadati, M. Sharbatdaran, N. Nikbakhsh und N. Ghaemian. *Correlation of ER, PR and HER-2/Neu with other Prognostic Factors in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast*. In: *Iranian Journal of Pathology* 10.3 (2015), S. 221–226.

-
- [105] I.-M. Siu, R. Bai, G. L. Gallia, J. B. Edwards, B. M. Tyler et al. *Coexpression of neuronatin splice forms promotes medulloblastoma growth*. In: *Neuro-Oncology* 10.5 (2008), S. 716–724.
 - [106] I. Soerjomataram, W. Louwman, M. van der Sangen, R. Roumen und J. Coebergh. *Increased risk of second malignancies after in situ breast carcinoma in a population-based registry*. In: *British Journal of Cancer* 95.3 (2006), S. 393–397.
 - [107] M. Solak, F. P. Turkoz, O. Keskin, S. Aksoy, T. Babacan et al. *The lymph node ratio as an independent prognostic factor for non-metastatic node-positive breast cancer recurrence and mortality*. In: *JBUON* 7 (2014), S. 737–745.
 - [108] Y. J. Song, S. H. Shin, J. S. Cho, M. H. Park, J. H. Yoon et al. *The role of lymphovascular invasion as a prognostic factor in patients with lymph node-positive operable invasive breast cancer*. In: *Journal of Breast Cancer* 14.3 (2011), S. 198–203.
 - [109] M. Stauber und T. Weyerstahl. *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*. S. 375, Abb. C-1.19. Georg Thieme Verlag, 2007.
 - [110] C. Strand, M. Bak, S. Borgquist, G. Chebil, A.-K. Falck et al. *The combination of Ki67, histological grade and estrogen receptor status identifies a low-risk group among 1,854 chemo-naïve women with N0/N1 primary breast cancer*. In: *SpringerPlus* 2.1 (2013), S. 1–10.
 - [111] Y. H. Suh, W. H. Kim, C. Moon, Y. H. Hong, S.-Y. Eun et al. *Ectopic expression of Neuronatin potentiates adipogenesis through enhanced phosphorylation of cAMP-response element-binding protein in 3T3-L1 cells*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337.2 (2005), S. 481–489.
 - [112] J. Sun, C. Chen, W. Wei, H. Zheng, J. Yuan et al. *Associations and indications of Ki67 expression with clinicopathological parameters and molecular subtypes in invasive breast cancer: A population-based study*. In: *Oncology Letters* 10.3 (2015), S. 1741–1748.
 - [113] M. Tada. *Molecular structure and function of phospholamban in regulating the calcium pump from sarcoplasmic reticulum*. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 671.1 (1992), S. 92–103.
 - [114] V. Tadic, T. Prell, J. Lautenschlaeger und J. Grosskreutz. *The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis*. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (2014), S. 1–17.

-
- [115] P. Tai, E. Yu, R. Shiels, J. Pacella, K. Jones et al. *Short-and long-term cause-specific survival of patients with inflammatory breast cancer*. In: *BMC Cancer* 5.1 (2005), S. 1–10.
 - [116] R. Tashima, R. Nishimura, T. Osako, Y. Nishiyama, Y. Okumura et al. *Evaluation of an Optimal Cut-Off Point for the Ki-67 Index as a Prognostic Factor in Primary Breast Cancer: A Retrospective Study*. In: *PLoS ONE* 10.7 (2015), S. 1–10.
 - [117] T. Uchihara, C. Okubo, R. Tanaka, Y. Minami, Y. Inadome et al. *Neuronatin Expression and its Clinicopathological Significance in Pulmonary Non-small Cell Carcinoma*. In: *Journal of Thoracic Oncology* 2.9 (2007), S. 796–801.
 - [118] T. M. Ulbright, M. B. Amin, B. Balzer, D. M. Berney, J. I. Epstein et al. *WHO Classification of of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Hrsg. von H. Moch, P. A. Humphrey, T. M. Ulbright und V. E. Reuter. 2016.
 - [119] H. Urrea, E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera und C. Hetz. *When ER stress reaches a dead end*. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833.12 (2013), S. 3507–3517.
 - [120] H. Usui, K. Morii, R. Tanaka, T. Tamura, K. Washiyama et al. *cDNA cloning and mRNA expression analysis of the human neuronatin*. In: *Journal of Molecular Neuroscience* 9.1 (1997), S. 55–60.
 - [121] S. Volinia, M. Galasso, M. E. Sana, T. F. Wise, J. Palatini et al. *Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.8 (2012), S. 3024–3029.
 - [122] S. Walters, C. Maringe, J. Butler, B. Rachet, P. Barrett-Lee et al. *Breast cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK, 2000-2007: a population-based study*. In: *British Journal of Cancer* 108.5 (2013), S. 1195–1208.
 - [123] W.-A. Wang, J. Groenendyk und M. Michalak. *Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer*. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843.10 (2014), S. 2143–2149.
 - [124] C. Wittekind und H.-J. Meyer. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Aufl., 3. korr. Nachdr., S. 169–179. John Wiley & Sons, 2011.

- [125] A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, J. N. Schwartz, K. L. Hagerty, D. C. Allred et al. *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. In: *Journal of Clinical Oncology* 25.1 (2006), S. 118–145.
- [126] R. Wooster, S. L. Neuhausen, J. Mangion, Y. Quirk, D. Ford et al. *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13*. In: *Science* 265.5181 (1994), S. 2088–2090.
- [127] D. S. Xu, C. Yang, M. Proescholdt, E. Brundl, A. Brawanski et al. *Neuronatin in a Subset of Glioblastoma Multiforme Tumor Progenitor Cells Is Associated with Increased Cell Proliferation and Shorter Patient Survival*. In: *PLoS ONE* 7.5 (2012), S. 1–7.
- [128] J. Yang, J. Wei, Y. Wu, Z. Wang, Y. Guo et al. *Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer*. In: *Oncogenesis* 4.6 (2015), S. 1–8.
- [129] S. Yang, J. J. Zhang und X.-Y. Huang. *Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis*. In: *Cancer Cell* 15.2 (2009), S. 124–134.
- [130] Y.-Z. Zheng, L. Wang, X. Hu und Z.-M. Shao. *Effect of tumor size on breast cancer-specific survival stratified by joint hormone receptor status in a SEER population-based study*. In: *Oncotarget* 6.26 (2015), S. 22985–22995.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. T. Kalinski für die Bereitstellung des interessanten Themas und die sachkundige und erfahrene Unterstützung danken. Darüber hinaus bin ich PD. Dr. N. Naß für die hilfreichen Anregungen und wertvollen Hinweisen sehr dankbar.

Großer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen Dr. K. Frauenschläger, Dr. A. Lemke, W. Lessel, Dr. S. Siedentopf und V. Schöder, die mir mit einem offenen Ohr, motivierenden Worten und vieler übernommener Arbeit den Rücken frei gehalten haben. Insbesondere möchte ich mich herzlich bei Prof. D. Jechoreck für ihre Mühe und Zeit danken, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich außerdem den Mitarbeiterinnen des immunhistochemischen Labors C. Kügler, C. Miethke und J. Zajontz für ihre fachkundige Unterstützung und ihre hervorragende Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Matthias, meinen Kindern Lukas und Hannah sowie meinen Eltern Dagmar und Georg, die immer für mich da sind, mir Rückhalt geben und mich sowohl im Studium als auch bei der Promotion unterstützt und ermutigt haben. Die größte Stütze und eine unersetzbare Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit war mein liebevoller Ehemann, dem ich für sein unendliches Verständnis überaus dankbar bin.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Prognostische Relevanz der Neuronatin-Expression in Mammakarzinomen

am Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. Thomas Kalinski und PD Dr. Norbert Naß

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 26. Februar 2017

Sarah Walter

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sarah Walter, geb. Naumann
Geburtsdatum: 22.06.1985
Geburtsort: Gardelegen
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung

09/1992–09/1996 Grundschohle Letzlingen
09/1996–07/2005 **Abitur**, *Geschwister Scholl Gymnasium* Gardelegen
09/2002–08/2003 **Highschool-Abschluss**, Austauschjahr an der
Newark Highschool, Newark, DE, USA

Studium

10/2005–09/2007 **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**,
Studium der Humanmedizin an der *Otto-von-Guericke-Universität* Magdeburg
10/2007–11/2011 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**,
Studium der Humanmedizin an der *Otto-von-Guericke-Universität* Magdeburg

Beruflicher Werdegang

seit 06/2012 Ärztin in Weiterbildung am Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Magdeburg
08/2014–07/2015 Elternzeit
seit 12/2016 Elternzeit

Magdeburg, den 26. Februar 2017

Sarah Walter