

Aus der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Expression des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) beim Mammakarzinom

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2019

vorgelegt von
Clara Marie Unger
geboren am 21.09.1994 in Strasbourg, Frankreich

Tag der Promotion: 30.06.2020

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. I. Juhasz-Böss
Prof. Dr. S. Stilgenbauer
Prof. Dr. A. Hartkopf

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung und abstract	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Abstract: Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases	3
2. Einleitung	5
2.1. Das Mammakarzinom	5
2.1.1. Epidemiologie	5
2.1.2. Risikofaktoren	5
2.1.3. Histologische Merkmale des invasiven Mammakarzinoms	6
2.1.4. Lokalisation und Metastasierung	7
2.1.5. Stadieneinteilung	7
2.1.6. Diagnostik	10
2.1.7. Therapie	12
2.1.8. Prognosefaktoren	13
2.2. Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA)	15
2.2.1. Geschichte	15
2.2.2. Definition	15
2.2.3. Lokalisation im gesunden Gewebe	16
2.2.4. Funktionen	16
2.2.5. Das PSMA ist mit der Tumorprogression assoziiert	17
2.2.6. Die PSMA Expression bei Karzinomen	19
2.2.7. PSMA Bildgebung	21
2.2.8. PSMA Therapiemöglichkeiten	25
2.3. Die Neovaskularisation	27
2.3.1. Definitionen und Funktionen der Neovaskularisation	27
2.3.2. Die Angiogenese bei bösartigen Erkrankungen	29
2.3.3. Die Rolle der Angiogenese beim Mammakarzinom	29

2.3.4.	Die intratumorale Mikrogefäßdichte und das MVD (microvessel density)	30
2.3.5.	Antiangiogenetische Therapien am Beispiel des Avastins beim Mammakarzinom	31
2.4.	Zielsetzung der Arbeit	34
3.	Materialien und Methoden	35
3.1.	Patientinnenkollektiv und Einschlusskriterien	35
3.2.	Materialien und Reagenzien	36
3.2.1.	Reagenzien	36
3.2.2.	Lösungen	37
3.2.3.	Geräte	39
3.2.4.	Verbrauchsmaterialien	40
3.2.5.	Optische Geräte	40
3.2.6.	Programme	40
3.3.	Anfertigung der Paraffinschnitte	41
3.4.	Hämatoxylin-Eosin Färbung	41
3.5.	Immunhistochemie	43
3.6.	Immunfluoreszenz	50
3.7.	Statistische Methoden	54
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Patientinnenkollektiv und Tumormerkmale	56
4.1.1.	Altersverteilung	57
4.1.2.	Menopausenstatus	58
4.1.3.	Fernmetastasierung	58
4.2.	Tumormerkmale und –charakteristiken	59
4.3.	Medianes Überleben und rezidivfreies Überleben	60
4.4.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	60
4.4.1.	Die PSMA Färbung	61
4.4.2.	Die CD31 Färbung	66
4.4.3.	Das gesunde Brustdrüsengewebe – Kontrolle	67
4.4.4.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	69

4.4.5.	Vergleich der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der Primärtumorproben mit den klinikopathologischen Parametern _____	78
4.4.6.	Vergleich der erhobenen immunhistochemischen Parameter untereinander_	85
4.4.7.	Gesamt und rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von der PSMA-Expression	89
4.5.	Ergebnisse der Immunfluoreszenz _____	92
5.	Diskussion _____	97
6.	Literaturverzeichnis _____	109
	Abkürzungsverzeichnis _____	118
	Abbildungsverzeichnis _____	120
	Tabellenverzeichnis _____	122
	Publikationen _____	124
	Eigenanteil an den Publikationen und Vorträgen _____	124
	Poster und Publikation _____	124
	Danksagung _____	127
	Lebenslauf _____	129

1. ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT

1.1. ZUSAMMENFASSUNG

Das prostata-spezifische Membranantigen (PSMA) ist ein transmembranäres Glykoprotein, das beim Prostatakarzinom und weiteren Tumorentitäten bereits nachgewiesen wurde. Es wird insbesondere durch die Tumorneovaskulatur mehrerer unterschiedlicher Tumorentitäten exprimiert. Außerdem scheint das PSMA eine Rolle bei der Tumorprogression und Neubildung von Tumorgefäßen zu haben. Aus diesem Grund wurden bereits bildgebende und therapeutische Verfahren, welche das PSMA als Zielstruktur haben, entwickelt. Es gibt bis dato jedoch sehr uneinheitliche Ergebnisse bezüglich der PSMA Expression beim Mammakarzinom.

Hauptziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Expression des PSMA beim Mammakarzinom sowie dessen Lymphknoten- und Fernmetastasen nachzuweisen. Es wurde überprüft, ob das PSMA von der Tumorneovaskulatur und den Tumorzellen exprimiert wird und ob dessen Expression mit einigen klinikopathologischen Parametern sowie einem schlechteren Outcome assoziiert ist.

Es wurden immunhistochemische und Immunfluoreszenz Färbungen auf Schnitten von in Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Insgesamt wurden 72 Mammakarzinompatientinnen in diese Studie eingeschlossen, und diese wurden zusätzlich bezüglich einer Reihe an klinikopathologischen Parametern charakterisiert. Es konnten 70 Primärtumor-, 18 Lymphknotenmetastase- und 12 Fernmetastaseproben immunhistochemisch untersucht werden. Außerdem wurden 40 Proben gesunden Brustdrüsengewebes auf eine PSMA Expression hin untersucht.

Die Quantifizierung des PSMA in den Tumorzellen und in den Tumormikrogefäßen wurde mithilfe der immunhistochemischen PSMA-Färbungen, nach dem immunreaktiven Score von Remmele und Stegner (IRS) durchgeführt. Zur Bestimmung der Anzahl an PSMA-positiven Tumorgefäßen wurde eine immunhistochemische CD31 Färbung, welche spezifisch Endothelzellen nachweist, herangezogen. Diese Färbung wurde zusätzlich zur PSMA-Färbung angefertigt und stammte aus demselben Gewebepblock. Anhand dieser Färbung konnte die allgemeine Gefäßdichte (microvessel density, MVD) beurteilt werden. Im Verhältnis dazu konnte anschließend der Prozentsatz an PSMA-positiven Gefäßen berechnet und der immunreaktive Score der Tumorneovaskulatur (MVD-IRS) bestimmt werden.

PSMA wird sowohl an den Tumorzellen als auch an den Tumormikrogefäßen exprimiert. In den Tumorzellen wird in 71,4% der Primärtumore, 61,1% der Lymphknotenmetastasen und 75% der

Fernmetastasen PSMA exprimiert. Die Tumormikrogefäße exprimieren in 46,2% der Primärtumore, in 66,7% der Lymphknotenmetastasen und in 88,9% der Fernmetastasen PSMA. PSMA wird auch im gesunden Brustdrüsengewebe exprimiert (62,5%), hier jedoch nicht in den Gefäßen. Bei der Beurteilung der alleinigen PSMA-Expression in den Tumorzellen (ohne Gefäße) konnte eine signifikant erhöhte PSMA-Expression bei fernmetastasierten Patientinnen festgestellt werden ($p=0,009$). Die zeitgleiche PSMA-Expression an Tumorzellen und Tumormikrogefäßen unterscheidet sich signifikant in Abhängigkeit von unterschiedlicher Histologie (invasiv-duktales Karzinom vs. andere, $p=0,026$), Grading (G1 und G2 vs. G3, $p=0,002$) und Ki67-Level (<10% vs. 10-14% vs. >14%, $p=0,041$), nicht jedoch in Abhängigkeit von Alter, Menopausenstatus, TNM-Stadium, Rezeptorstatus und CA 15-3 Level. Zwischen der PSMA Expression in den Tumorzellen und der PSMA Expression in der Tumorneovaskulatur bei den Primärtumorproben besteht ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,001$), ebenfalls zwischen der PSMA Expression in den Tumorzellen der Primärtumorproben mit den Tumorzellen und mit der Tumorneovaskulatur der Lymphknotenmetastaseproben ($p=0,02$ bzw. $p=0,022$). Patientinnen mit einem PSMA positiven Tumor haben im Vergleich zu PSMA negativen Tumoren ein signifikant schlechteres Gesamt-Überleben ($p=0,027$), sofern die Expression in den Tumorzellen vorliegt.

Diese Arbeit zeigt, dass das PSMA sowohl im Primärtumor als auch bei dessen Lymphknoten- und Fernmetastasen von den Tumorzellen und den Tumormikrogefäßen exprimiert wird. Das Expressionsmuster des Primarius und dessen Metastasen war unterschiedlich, weswegen von der PSMA Expression im Primärtumor nicht auf dessen Expression in den Fernmetastasen geschlossen werden kann. Basierend auf den hier vorgestellten Ergebnissen lässt sich festhalten, dass das PSMA beim Mammakarzinom mit einem schlechteren onkologischen Outcome assoziiert ist. PSMA könnte nebst seiner hier gezeigten prognostischen Eigenschaft künftig zudem an Bedeutung gewinnen, da es zudem eine vielversprechende Zielstruktur für bildgebende Verfahren und neue Therapiemöglichkeiten zu sein scheint.

1.2. ABSTRACT: PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) EXPRESSION IN BREAST CANCER AND ITS METASTASES

The prostate specific membrane antigen (PSMA) is a transmembrane glycoprotein, which was proved to be expressed by prostate cancer and other tumors. In particular, it was found on the tumor neovasculature of a wide variety of tumors. Moreover, PSMA seems to play an important role for the tumor progression and the new formation of tumor vessels. That is why PSMA imaging and PSMA-specific therapies were developed. To this date, the knowledge about the expression of PSMA by breast cancer is limited and the results of previous studies concerning this topic are very inconsistent so far.

The aim of this study was to investigate the PSMA expression on breast cancer, its lymph node and distant metastasis. The PSMA expression was verified on the tumor cells and the tumor neovasculature. An association between the PSMA and clinicopathological parameter as well as an association to a worse outcome for breast cancer patients was examined.

Therefore, immunohistochemistry and immunofluorescence of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue was applied. 72 breast cancer patients have been included in this study and a few of their clinicopathological parameters were scrutinized. In total, 70 samples of primary tumor, 18 of lymph node metastasis and 12 of distant metastasis underwent an immunohistochemical staining. 40 samples of healthy breast tissue were stained and analyzed as well.

The PSMA expression in the tumor cells was quantified according to the immunoreactive score (IRS) of Remmele and Stegner. The application of an immunohistochemical stain of CD31, an endothelial marker, allowed to further assess the amount of PSMA-positive vessels. This stain was made on a separate slide of the same tissue as the PSMA stain. The microvessel density (MVD) was determined based on the CD31 stain. The percentage of PSMA-positive vessels compared to the total amount of vessels was calculated. This allowed determining the IRS of the tumor neovasculature (MVD-IRS).

The stained samples of the primary tumors, lymph nodes and distant metastasis showed an expression of the PSMA on tumor cells and tumor vessels. Regarding the tumor cells, PSMA is expressed by 71,4% of the primary tumors, 61,1% of the lymph node metastasis and 75% of the distant metastasis. The tumor microvessels express PSMA in 46,2% of the primary tumors, 66,7% of the lymph node metastasis and 88,9% of the distant metastasis. The PSMA was also found to be expressed by healthy breast tissue, but not in its vessels. The evaluation of the PSMA expression in the tumor cells alone (without microvessels) assessed a statistically significant increased PSMA expression on patients with distant metastasis ($p=0,009$). However,

it was possible to demonstrate a statistically significant relation between the following factors: histopathological tumor type (invasive ductal vs. other type, $p=0,026$), grading (G1 and G2 vs. G3, $p=0,002$) and Ki67-level (<10% vs. 10-14% vs. >14%, $p=0,041$), and the concurrent expression of PSMA in the cells and the neovasculature. The age, menopause status, TNM-stage, receptor status and CA 15-3 level didn't have a statistically significant relation with the concurrent expression of PSMA. There was also a statistically significant relation between the PSMA expression in the tumor cells and the tumor vessels of the primary tumors ($p=0,001$). A statistically significant relation between the PSMA expression in the tumor cells of the primary tumor with the PSMA expression of the tumor cells ($p=0,02$) and the tumor vessels ($p=0,022$) of the lymph nodes was demonstrated as well. Patients with more PSMA in the tumor cells had a statistically significant worse overall survival (OS) ($p=0,027$).

This study shows that the PSMA is expressed by breast cancer, its lymph node and distant metastases. The expression pattern of PSMA in the primary tumor and its metastasis was different. Therefore, it is not possible to deduce the PSMA expression of a metastasis from the pattern of the corresponding primary tumor. Based on the results presented here, it can be concluded that PSMA is associated with a worse oncological outcome in breast cancer. In addition to the prognostic properties shown here, PSMA could also become more important in the future, as it also appears to be a promising target structure for imaging procedures and new therapeutic options.

2. EINLEITUNG

2.1. DAS MAMMAKARZINOM

2.1.1. EPIDEMIOLOGIE

In Deutschland erkrankten im Jahre 2013 253 000 Männer und 230 000 Frauen an Krebs. Absolut hat sich die Zahl der an Krebs erkrankten Menschen in Deutschland seit Anfang der 1970er Jahre verdoppelt [46].

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei der Frau weltweit [94]. Die altersstandardisierte Rate für die europäische Union liegt in etwa bei 106,6/100 000 Frauen. Im Jahre 2013 erkrankten 71 600 Frauen und 700 Männer an einem Mammakarzinom in Deutschland. Von dieser Erkrankung sind nur 1% Männer betroffen. 2013 lebten 316 000 Frauen mit einem Mammakarzinom, der in den davorliegenden 5 Jahren diagnostiziert wurde. Die Inzidenz des Brustkrebses ist steigend, da heutzutage mehr Frauen kinderlos sind, ein höheres Alter bei der Austragung ihrer ersten Schwangerschaft haben, kürzer stillen und mehr Hormonersatztherapien in der Postmenopause eingenommen werden. Die Prognose für das Jahr 2020 wird bei 77 600 neuerkrankten Frauen in Deutschland geschätzt [46].

Das mittlere Erkrankungsalter bei den Frauen liegt bei 64,3 Jahren [46] [61].

Das Mammakarzinom ist gemischtgeschlechtlich nach dem Bronchialkarzinom die zweite Ursache eines Todesfalls durch eine Krebserkrankung [12]. Die Zahl der Sterbefälle betrug im Jahre 2013 in etwa ein Viertel der Neuerkrankungen. Generell hat sich die Sterblichkeit seit 1999 bei den Frauen, die jünger als 50 sind, um etwa ein Drittel vermindert, bei den 50- bis 69-jährigen, um etwa ein Viertel. Bei den über 70-jährigen Frauen ist diese jedoch unverändert [46]. Die relative 5-Jahres Überlebensrate liegt bei 87,4% [61].

2.1.2. RISIKOFAKTOREN

Das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken kann in modifizierbare und nicht-modifizierbare Risikofaktoren unterteilt werden.

Nicht modifizierbare Risikofaktoren sind: höheres Alter, eine genetische Prädisposition, eine positive Krebsanamnese in der Familie, die persönliche Brustanamnese (Risikoläsionen, Proliferationen oder Krebsvorläuferstufen wie beispielweise das duktales carcinoma in situ (DCIS)), die Brustdichte, den Zustand nach einer Thoraxbestrahlung und die Anzahl an Menstruationszyklen im Laufe des Lebens [47].

Brustkrebs entsteht durch eine Vielzahl an genetischen und epigenetischen Veränderungen. In 15 bis 20% der Fälle kann das Mammakarzinom als eine erbliche Erkrankung angesehen werden. Als hoch penetrante Gene gelten die breast cancer Gene 1 und 2 (BRCA1 und BRCA2). Bei einer BRCA1 Mutation liegt das Lebenszeitrisiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei 80% und bei einer BRCA2 Mutation bei 60-70% [94].

Unter den Risikofaktoren, die modifiziert werden können, versteht man: wenig stillen, ein BMI (body mass index) unter 18,5 und über 25, die Nahrungszusammensetzung, die Einnahme einer Hormontherapie, Alkohol- und Nikotinabusus, Schlafmangel, verminderte körperliche Aktivität und chemische Noxen während der fetalen oder der frühkindlichen Entwicklung [47].

Endoge und exogene Östrogene spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Mammakarzinomen. Somit haben Frauen, die nach dem 30. Lebensjahr ihre erste Schwangerschaft austragen, sowie Frauen mit einer frühen Menarche, einer späten Menopause oder einem hohen endogenen Östrogenspiegel in der Postmenopause ein höheres Risiko. Die Einnahme von exogenen Hormonen im Rahmen einer Hormonersatztherapie in der Postmenopause ist ebenfalls mit einem höheren Entartungsrisiko vergesellschaftet [10] [46].

2.1.3. HISTOLOGISCHE MERKMALE DES INVASIVEN MAMMAKARZINOMS

Am häufigsten liegen histologisch invasiv duktale Mammakarzinome vor (in 65 bis 80% der Fälle). Anschließend kommen invasiv lobuläre, tubuläre und muzinöse Karzinome vor (in 20 bis 30% der Fälle) [10]. Die wichtigsten Vorläuferläsionen sind das duktale carcinoma in situ (DCIS) und das lobuläre carcinoma in situ (LCIS), welche nicht infiltrativ wachsen [77].

Immunhistochemisch wird in jedem pathologischen Institut jede neu diagnostizierte invasive Läsion der Brust auf die Expression des Östrogen- und des Progesteronrezeptors hin untersucht [10]. Außerdem werden der Ki-67 Proliferationsindex (das Ki67 ist ein Protein, welches ausschließlich in sich teilenden Zellen exprimiert wird [94]), der histologische Grading und der Her2 (human epidermal growth factor receptor) bestimmt [111]. 12-32% der Mammakarzinome überexprimieren das Her2. Es ist ein transmembranärer Wachstumsfaktorrezeptor, welcher bei Überexpression zu vermehrter Mitose, Inhibition von Apoptose, Neoangiogenese, Tumorzellmigration und Invasion führt [94].

Anschließend kann man die Tumore in verschiedene molekulare Subtypen unterteilen:

- Die luminal-A-Karzinome, welche Hormonrezeptor positiv und Her2 negativ sind und einen niedrigen Ki67 haben
- Die luminal-B-Karzinome, die sich von den luminal-A-Karzinomen nur durch einen hohen Ki67 unterscheiden
- Die Her2-positiven Karzinome
- Die basal-like oder triple negativen Karzinome, welche Hormonrezeptor und Her2 negativ sind [94]

2.1.4. LOKALISATION UND METASTASIERUNG

Das Mammakarzinom befindet sich am häufigsten im oberen äußeren Quadranten (49%), gefolgt vom oberen inneren Quadranten (16%), der Mamille (17%), dem unteren äußeren (12%) und dem unteren inneren (6%) Quadranten [10].

Die häufigsten Metastasierungsorte des Mammakarzinoms sind die Lymphknoten, die Leber und die Lunge mit über 50%, anschließend werden die Nebenniere, die Haut, die Pleura und das Skelett oft befallen [10] [77].

2.1.5. STADIENEINTEILUNG

Das Mammakarzinom kann durch die TNM-Klassifikation oder die Union for International Cancer Control (UICC)-Stadieneinteilung untergliedert werden.

2.1.5.1. DIE TNM KLASSIFIKATION

Die TNM Klassifikation besteht aus 3 Teilen: der Primärtumorausdehnung und Invasion (T-Klassifikation), dem regionären Lymphknotenstatus (N-Klassifikation) und dem Vorhandensein einer Fernmetastasierung (M-Klassifikation) (siehe Tabelle 1 bis 3) [111]. Diese Einteilung wird meistens durch ein kleines p (pathologisch) ergänzt. Dabei bedeutet das p, dass es sich bei der darauffolgenden TNM Klassifikation um die histologische Beurteilung des Tumors durch einen Pathologen handelt.

T-Primärtumor:	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser
T1mi	Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger im größten Durchmesser
T1a	größer 0,1 cm bis maximal 0,5 cm im größten Durchmesser
T1b	größer 0,5 cm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser
T1c	größer 1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, soweit unter T4a–T4d beschrieben
T4a	Ausdehnung auf Brustwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel, jedoch nicht die Pektoralismuskulatur)
T4b	Ödem oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust
T4c	Kriterien 4a und 4b
T4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

TABELLE 1 T-KLASSIFIKATION

Tabelle adaptiert aus der Interdisziplinäre[n] S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [111].

Anmerkungen:

- Unter Carcinoma in situ versteht man eine hochgradig atypische Epithel- oder Zellveränderung ohne infiltratives Wachstum [77]
- Unter Mikroinvasion versteht man die Invasion von Tumorzellen über die Basalmembran hinaus, ohne dass der Invasionsherd größer als 0,1 Zentimeter (cm) ist [111]
- Charakteristisch für das inflammatorische Mammakarzinom ist eine erysipelartige Hautveränderung mit negativer Hautbiopsie und ohne anderem primären Herd [111]

N-Lymphknotenstatus	
pN1	Mikrometastasen; Metastase(n) in 1–3 ipsilateralen Lymphknoten und/oder mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der ipsilateralen Arteria (A.) mammaria interna (nicht klinisch erkennbar)
pN1mi	Mikrometastase(n) (> 0,2 Millimeter (mm) und/oder mehr als 200 Tumorzellen, aber nicht größer als 0,2 cm)
pN1a	1–3 axilläre Lymphknotenmetastase(n), mindestens eine > 2 mm
pN1b	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischer(en) Metastase(n)
pN1c	Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten und Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
pN2	Metastase(n) in 4–9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN2a	Metastasen in 4–9 axillären Lymphknoten, darunter mindestens eine > 2 mm
pN2b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen wie nachfolgend beschrieben:
pN3a	Metastase(n) in ≥10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (wenigstens eine > 2 mm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Untersuchung des/der Sentinellymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

TABELLE 2 N-KLASSIFIKATION

Tabelle adaptiert aus der Interdisziplinäre[n] S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [111]

Anmerkungen:

- Als klinisch erkennbar werden Lymphknotenmetastasen bezeichnet, die entweder durch die klinische Untersuchung oder durch bildgebenden Verfahren (außer der Lymphszintigraphie) diagnostiziert werden [111]
- Unter den regionären Lymphknoten versteht man die intramammären und interpektoralen, die ipsilateralen axillären, die supra- und intraklavikulären sowie die Lymphknoten der A. mammaria interna. Alle weiteren befallenen Lymphknoten sind als Fernmetastasen zu werten [111].

M-Fernmetastasierung	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

TABELLE 3 M-KLASSIFIKATION

Tabelle aus der Interdisziplinäre[n] S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [111]

2.1.5.2. DIE UICC-STADIENEINTEILUNG

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

TABELLE 4 DIE UICC-STADIENEINTEILUNG

Tabelle aus der Interdisziplinäre[n] S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [111]

2.1.6. DIAGNOSTIK

Um Brustkrebs zu diagnostizieren, kommen bildgebende und interventionelle Verfahren zum Einsatz. Außerdem besteht bei dieser Krebserkrankung die Möglichkeit zur Prävention.

Die Teilnahme am Nationalen Mammographie Screening wird zu Früherkennungszwecken bei Frauen zwischen dem 50. und dem 69. Lebensjahr empfohlen. Die betroffenen Frauen werden alle 2 Jahre schriftlich eingeladen und etwa 45% der Neuerkrankungen liegen in diesem Altersbereich [46]. Die Mammographie ist die einzige Methode, bei der eine Reduktion der Mortalität nachgewiesen wurde. Bei Frauen über dem 70 Lebensjahr wird die Mammographie nur bei einer Lebenserwartung, die 10 Jahre überschreitet, und bei entsprechender Risikokonstellation angeraten [111]. Bei den 50 bis 69-jährigen Frauen werden seit Einführung

des Früherkennungsprogramm (zwischen 2005 und 2009) in Deutschland vermehrt Tumore in den Frühstadien diagnostiziert (siehe Abbildung 1) [46]. Zu den Früherkennungmaßnahmen, die durchgeführt werden sollten, gehört auch eine monatliche Selbstuntersuchung der Brust durch die Patientin [47].

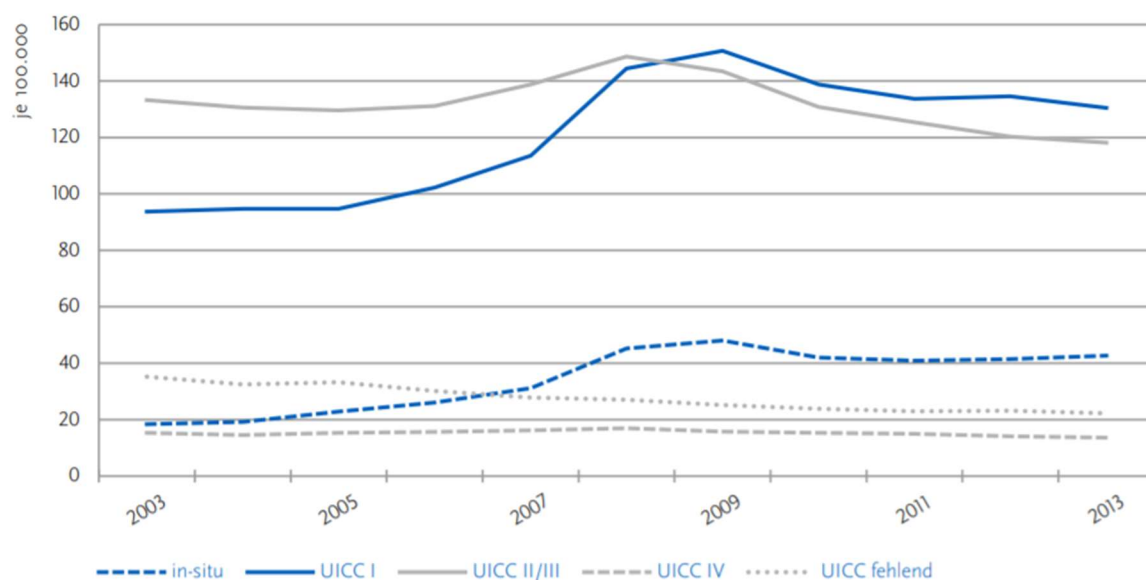


ABBILDUNG 1 ALTERSSTANDARDISIERTE NEUERKRANKUNGSRATEN FÜR FRAUEN AN BRUSTKREBS, INKLUSIVE IN-SITU KARZINOME 2003-2013

Grafik aus dem [Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016](#) vom Robert-Koch-Institut [46]

Bei auffälligem Befund in der Brust bei der Mammographie oder der Selbstuntersuchung der Brust durch die Patientin sollten einige Basisdiagnostikmaßnahmen durchgeführt werden: eine Anamnese mit klinischer Untersuchung der Brust und der Lymphabflusswege, eine Mammographie und eine sonographische Untersuchung der Brust. Falls diese Untersuchungen den Verdacht auf ein bösartiges Geschehen erhärten sollten, ist eine histologische Untersuchung durch Gewebeentnahme indiziert. Die Gewebeprobe sollte, unter bildgebender Kontrolle, stanz- oder vakuumbioptisch entnommen werden [111].

Die Diagnostik des Mammakarzinoms sollte dann von einem Ganzkörperstaging ergänzt werden, wenn ein UICC Stadium II mit Risikofaktoren oder ein Stadium III oder IV vorliegt. Außerdem sollte bei klinischem Verdacht auf eine Fernmetastasierung dieses Ganzkörperstaging ebenfalls durchgeführt werden. Dieses Ganzkörperstaging besteht aus einer kontrastverstärkten Computertomographie (CT) des Thorax, Abdomens und Beckens und einer Skelettszintigraphie. Eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET-CT) sollte nur bei dringendem Verdacht auf eine Fernmetastasierung ohne sicheren Ausschluss erfolgen [111].

Zum Staging gehört auch eine operative Diagnostik der Axilla. Dabei sollte bei sonographisch und klinisch unauffälligen Lymphknoten eine Sentinellymphknotenbiopsie durchgeführt werden. Falls operativ klinisch auffällige Lymphknoten vorhanden sein sollten, müssen diese zusätzlich zum Wächterlymphknoten entfernt werden. Von einer Axilladisektion kann bei Mikrometastasierung oder bei Patientinnen mit einem nicht fortgeschrittenen Mammakarzinom auch bei ein bis zwei befallenen Lymphknoten abgesehen werden. Falls therapeutisch eine Mastektomie geleistet wird oder keine der bereits genannten Kriterien zutreffen, ist eine Axilladisektion indiziert [111].

2.1.7. THERAPIE

Die Therapie des Mammakarzinoms umfasst vier Säulen: die operative, die Strahlen-, die systemische, und die endokrine Therapie.

Die operative Therapie kann brusterhaltend oder als Mastektomie erfolgen. Bei einem nicht fortgeschrittenen Mammakarzinom ist eine primäre operative Therapie mit tumorfreien Resektionsrändern (R0 Resektion) indiziert.

Aktuell wird in den meisten Fällen brusterhaltend operiert [48]. Eine Mastektomie wird bei Wunsch der Patientin, inflammatorischem Mammakarzinom, Kontraindikation gegen die nach der brusterhaltenden Therapie (BET) empfohlenen Strahlentherapie oder inkompletter Resektion des Tumors durchgeführt [111].

Nach einer BET sollte immer strahlentherapeutisch nachbehandelt werden. Bei fortgeschrittenem Karzinom oder mikroskopisch nicht tumorfreien Resektionsrändern (R1 Resektion) sollte auch nach der Durchführung einer Mastektomie bestrahlt werden. Die Strahlentherapie hat bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom auch einen großen Stellenwert bei der Behandlung von ossären Metastasen [111].

Eine (neo-)adjuvante Chemotherapie kann auch gegebenenfalls therapeutisch eingesetzt werden. Diese besteht meistens aus einem Anthrazyklin mit einem Taxan, alternativ kann auch eine Kombination aus Docetaxel und Cyclophosphamid gegeben werden. Bei Patientinnen mit einem positiven Her2 sollte eine Antikörpertherapie, zum Beispiel mittels Trastuzumab, erfolgen [111]. Die Entscheidung für eine systemische Therapie, die entweder prä- oder postoperativ erfolgt, wird nach unterschiedlichen patientenindividuellen Kriterien getroffen.

Falls der Tumor sich als Hormonrezeptor positiv erweisen sollte, ist eine adjuvante endokrine Therapie mit Tamoxifen bei postmenopausalen oder Aromatasehemmern bei prämenopausalen Patientinnen empfohlen. Diese sollte nach der Chemotherapie erfolgen, kann aber zeitgleich zur Strahlentherapie gegeben werden [111]. Die endokrine Therapie ist indiziert, sobald einer der Hormonrezeptoren sich als positiv erweist [94].

2.1.8. PROGNOSEFAKTOREN

Generell kann man zwischen prognostischen und prädiktiven Faktoren unterscheiden. Ein prognostischer Faktor liegt zu einem bestimmten Zeitpunkt vor und korreliert mit dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben ohne Therapie. Ein prädiktiver Faktor kann das Ansprechen auf eine Therapie abschätzen [47].

Vor einigen Jahren waren vor allem die Tumorgröße und der Lymphknotenbefall prognostisch relevant. Heutzutage nehmen molekularbiologische Faktoren bei der Prognoseabschätzung immer mehr an Bedeutung zu [94].

Laut der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO), haben Tumorgröße, Lymphknotenstatus, das Vorliegen von Fernmetastasen, der histologische Subtyp, das Grading, das Alter der Patientin und die Bestimmung der Hormonrezeptoren und des Her2 nach einer neoadjuvanten Chemotherapie den höchsten prognostischen Wert und wurden mit „++“ bewertet. Ebenfalls prognostisch bedeutsam, jedoch mit einem einzigen „+“ gekennzeichnet worden, sind der Einbruch in Lymph- und/oder Blutgefäßen, ein BMI über 30kg/m², der Resektionsstatus, die Expression der Hormonrezeptoren und des Her2, das Ki67 assoziiert mit den Hormonrezeptoren als Marker für die bereits erläuterten molekularen Subtypen, das Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp / Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ I (uPA/PAI-1) bei nicht befallenen Lymphknoten und der Ki67 Proliferationsindex [47].

Der Hormonrezeptorstatus hat vor allem eine prädiktive Bedeutung. Auch wenn Patientinnen mit einem Östrogenrezeptor positiven Tumor ein besseres rezidivfreies und Gesamtüberleben haben und Östrogenrezeptor negative Tumore häufiger nachteilig fernmetastasieren (in Leber und Gehirn, statt dem Skelett bei Östrogenrezeptor positiven Tumoren), kann vor allem bei einer endokrinen Therapie die Mortalität um 31% gesenkt werden. Die Bedeutung der Her2 Überexpression ist umstritten. Patientinnen, deren Tumore das Her2 überexprimieren haben ein erniedrigtes rezidivfreies Überleben. Diese Tumore sprechen schlechter auf das Tamoxifen an. Das Her2 ist jedoch ein wichtiger prädiktiver Faktor da Her2 positive Karzinome von einer Anti-Her2-Therapie mit Trastuzumab gezielt angegriffen werden [94].

Zu den neueren prognostischen Faktoren gehören die Genexpressionsanalysen. Dabei können systematische Untersuchungen mehrerer Gene eine Aussage über das rezidivfreie und Gesamtüberleben machen. Sie sind ebenfalls als prädiktive Faktoren verwertbar, da einige dieser Tests ebenfalls das Ansprechen von einigen systemischen Therapien evaluieren können. Ein Beispiel dafür ist das MammaPrint®, welches 70 verschiedene Gene untersucht. Es ist von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassen [94]. Außerdem können das uPA und das PAI-1 bestimmt werden. Es sind Proteolysefaktoren, welche tumorassoziiert sind und am Abbau der Basalmembran teilhaben. Somit tragen sie zur Invasions- und Metastasierungsfähigkeit von Tumoren bei. Ein höheres uPA und PAI-1 ist nicht nur mit einer

erhöhten Metastasierung und einem niedrigeren Gesamtüberleben assoziiert, sondern auch mit einem besseren Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie. Tumordinfiltrierende Lymphozyten können auch bei Her2 positivem oder triple negativem Brustkrebs bestimmt werden. Bei über 50 bis 60% Lymphozyten im Tumorstroma ist das rezidivfreie und Gesamtüberleben signifikant verbessert [94]. In der S3-Leitlinie ist die Bestimmung von Tumormarkern nur zur Metastasendiagnostik empfohlen [111]. Allerdings korrelieren die präoperativen Cancer-Antigen 15-3 (CA 15-3) Spiegel mit der Rezidivwahrscheinlichkeit und dem Gesamtüberleben [94]. Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark und zirkulierende Tumorzellen im Blut können ebenfalls eine prognostische Relevanz haben. Mehrere Studien konnten dies bereits nachweisen. Die Untersuchung der zirkulierenden Tumorzellen im Blut ist unmissverständlich zugänglicher als die der Tumorzellen in Knochenmark. Derzeit kann aus der Bestimmung jener Marker keine Empfehlung geschlossen werden, welche zu einer Therapieentscheidung verhelfen kann [94].

Zusammenfassend sind eine Vielzahl an verschiedenen prognostischen und prädiktiven Markern bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom verfügbar. Die Wertigkeit dieser Marker ist oft umstritten und eine standardisierte Bestimmung vieler dieser Parameter wird noch nicht durchgeführt.

2.2. DAS PROSTATASPEZIFISCHE MEMBRANANTIGEN (PSMA)

2.2.1. GESCHICHTE

Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) wurde zuerst auf der *Lymph Node Carcinoma of the Prostate* (LNCaP) Zelllinie lokalisiert, welche im Jahre 1980 aus der Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms entwickelt wurde [39], um das Prostatakarzinom sowohl in vitro als auch in vivo weitgehend untersuchen zu können. Dabei wurde der 7E11 Antikörper aus einer mit LNCaP Zellen immunisierten Maus isoliert [40], der das PSMA bindet.

2.2.2. DEFINITION

Das PSMA wird auch Glutamat Carboxypeptidase II (GCP II), Folat Hydrolase I (FOLH1) oder N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate peptidase I (NAALADase I) genannt. Es ist ein 100 Kilodalton (kDa) schweres Protein (vor den posttranslationalen Veränderungen wiegt es 84 kDa), welches hoch glykosyliert ist. Dieses Typ II transmembranäre Membranprotein besteht aus 750 Aminosäuren. Ein Typ II transmembranäres Membranprotein ist dadurch charakterisiert, dass sich der Amino-Terminus des Proteins intrazellulär befindet und das Carboxylende extrazellulär ist [66]. Das PSMA kann in drei Arealen unterteilt werden: 19 Aminosäuren befinden sich intrazellulär, 24 transmembranös und 707 extrazellulär (siehe Abbildung 2) [7]. Es liegt auf dem Chromosom 11, in der Region 11p11. Es wurde ebenfalls auf 11q14 beschrieben [65]. Das PSMA hat eine 54% Homologie zur Gensequenz des humanen Transferrinrezeptors [41].

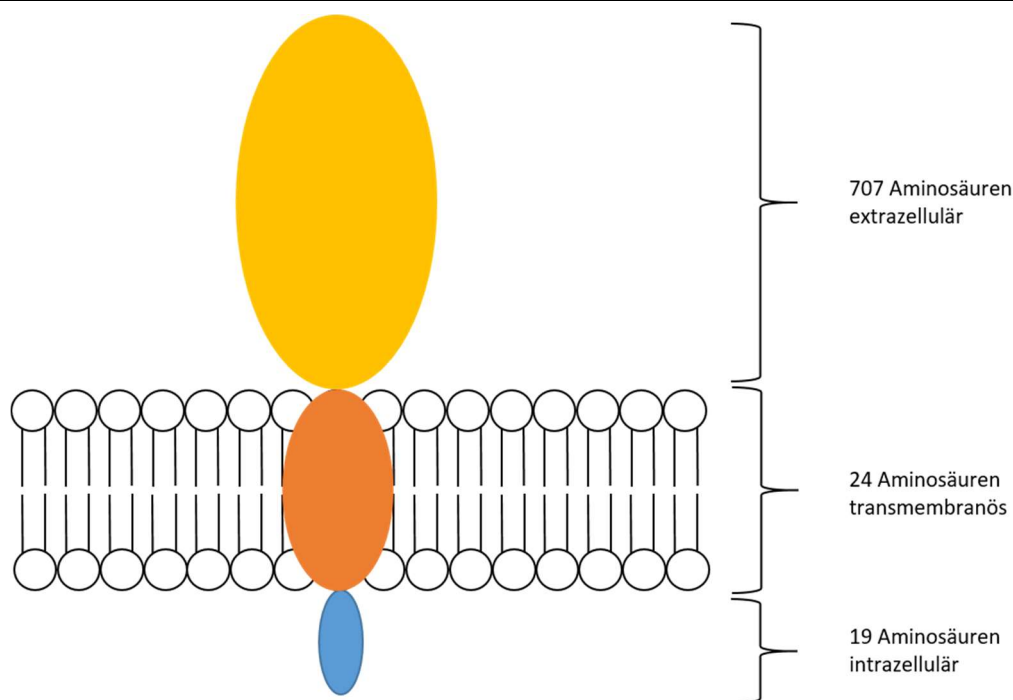


ABBILDUNG 2 STRUKTUR DES PSMAS

2.2.3. LOKALISATION IM GESUNDEN GEWEBE

Das PSMA wird von einer Mehrzahl an verschiedenen nicht-bösartigen Geweben exprimiert. Wie der Name dieses Proteins es bereits besagt, ist dieses Antigen hauptsächlich im benignen Prostataepithel aufzufinden. Es ist außerdem in weiteren Geweben vorhanden, wie beispielsweise in der Niere, der Blase, dem Ovar, den Speicheldrüsen oder dem Duodenum [45] [85] [105]. Das PSMA wurde ebenfalls auf der Neovaskulatur von nicht-neoplastischem reparativem Gewebe beschrieben, wie beispielsweise dem proliferierenden Endometrium oder bei Granulationsgewebe [31].

2.2.4. FUNKTIONEN

Das PSMA hat verschiedene enzymatische Aktivitäten. Es hat die Funktion einer Folathydrolase und der NALAADase I.

Als Folathydrolase spaltet das PSMA Polyglutamatketten von Folsäure ab. Dies spielt vor allem in den luminalen Dünndarmzellen eine große Rolle. Diese exprimieren das PSMA und können durch dessen enzymatische Funktion verbessert Folsäure aus der Nahrung aufnehmen.

Folsäure befindet sich in der Nahrung sowohl in mono- als auch in polyglutamylierter Form. Es handelt sich dabei hauptsächlich um die polyglutamylierte Form. Um die luminalen Zellmembran des Dünndarms schneller passieren zu können, ist jedoch eine Entfernung dieser

Glutamatketten notwendig. Die Bioverfügbarkeit der Folsäure ist somit hauptsächlich in der monoglutamylierten Form gegeben. Da die enzymatische Aktivität der Folathydrolase ebendiese Polyglutamylierung bei der Folsäure spaltet, kann anschließend eine Aufnahme dieses Moleküls aus der Nahrung in den Dünndarmzellen erfolgen [24] [37].

Das PSMA besitzt nicht nur im Dünndarm sondern auch bei Prostatakarzinomzellen die Funktion der Folathydrolase [70]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Prostatakarzinomzellen, die das PSMA exprimieren, in Gegenwart von polyglutamylierter Folsäure vermehrt wachsen [107]. Außerdem konnten *Tomaszewki et al.* zeigen, dass ein höherer Folsäurespiegel im Serum bei Prostatakarzinompatienten mit einem höheren Folsäurespiegel in Prostatakarzinomzellen assoziiert ist. Dieser höhere Folsäurespiegel ist ebenfalls signifikant mit einem höheren Ki67 Index vergesellschaftet ($p=0,0001$). Somit scheint Folsäure eine Rolle bei der Wachstumsgeschwindigkeit des Prostatakarzinoms zu spielen [93]. Die Spaltung der Glutamatketten von der Folsäure durch das PSMA könnte somit zu einem Überlebensvorteil für Prostatakarzinomzellen führen. Dies könnte biochemisch dadurch erklärbar sein, dass die Tumorzellen durch das vermehrte Vorhandensein von Folsäure über mehr Substrate für die DNA Synthese verfügen, da Folsäure Kohlenstofflieferant bei der Purinbiosynthese ist [52].

Im zentralen Nervensystem entspricht das PSMA der NAALADase I [16]. Diese katabolisiert extrazelluläres N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) in N-acetyl-Aspartat (NAA) und Glutamat [89]. Die NAALADase I hat im Gehirn eine Vielzahl an Lokalisationen, wie zum Beispiel im Kortex, Hypothalamus oder im Kleinhirn [89]. Die Bedeutung der NAALADase im zentralen Nervensystem ist von großem Interesse, da eine vermehrte Stimulation durch Glutamat in den Neuronen zu neurobiologischen oder Erkrankungen wie zum Beispiel neurodegenerativen Erkrankungen, oder einem Schlaganfall führen kann. Es wurden niedermolekulare NAALADase Inhibitoren entwickelt, die die Umwandlung von NAAG in NAA und Glutamat verhindern. Mit diesen Substanzen können die neurobiologischen Erkrankungen selbst oder deren verheerende Folgen vermindert oder sogar verhindert werden [86] [109].

2.2.5. DAS PSMA IST MIT DER TUMORPROGRESSION ASSOZIIERT

Das PSMA ist sowohl beim Prostatakarzinom [59] als auch beim Mammakarzinom [102] mit einem schlechteren Tumorstadium assoziiert. Somit scheint das PSMA eine Rolle bei der Tumorprogression zu haben.

Eine Erklärung dafür, könnte die Assoziation zwischen dem mouse double minute 2 (MDM2) und dem PSMA sein.

Es ist bereits bekannt, dass das MDM2 die Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 inhibiert [67]. Das p53 ist für ein Arrest der Zellreplikation nach einer DNA Schädigung zuständig. Es

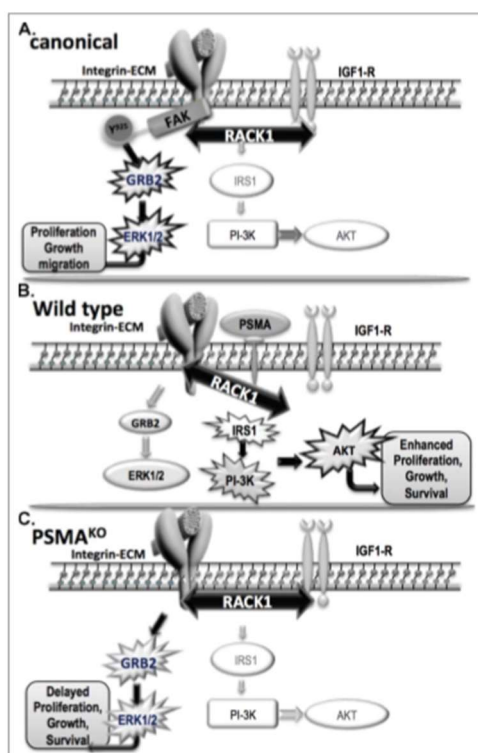
induziert ebenfalls über verschiedene Mechanismen die Apoptose einer geschädigten Zelle [52]. Darum verhindert das p53 Tumorsuppressorprotein unter anderem die maligne Entartung von Zellen. Durch Inhibition des p53 ist das MDM2 für das Entstehen von bösartigen Zellen verantwortlich.

Sowohl bei Prostata- [106] als auch bei Brustkrebszelllinien führt das Inaktivieren des MDM2-Gens zu einer Verminderung des PSMA und umgekehrt. Die MDM2 und PSMA knockdown-Zellen weisen dabei eine Verminderung im Wachstum, der Adhäsion, Migration und Zellinvasibilität, wobei die genaue Wechselwirkung zwischen dem MDM2 und dem PSMA bisher noch unklar ist. Diese Feststellung wurde durch das gestörte Expressionsmuster von verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen (MMP2, MMP3, MMP10 und MMP13) erklärt, welche eine Hauptrolle im Zellverhalten spielen [9].

Zudem zeigten *Bacich et al.* in einem Mausmodell, dass Wildtyp-Mäuse größere und mehr vaskularisierte Tumore entwickeln als Mäuse, bei denen das PSMA Gen herunterreguliert wurde [8].

Eine andere Theorie von *L. Caromile* und *L. Shapiro* besagt, dass das PSMA beim Prostatakarzinom eine wichtige zelleigene Überlebenskomponente zu Verfügung stellt, welches das Tumorwachstum begünstigt. Diese Aussage stützte sich auf den Nachweis dieser Arbeitsgruppe, dass PSMA-positive Tumore auch in größerer Entfernung von Gefäßen überleben können.

Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das PSMA sich beim Prostatakarzinom, mit dem Rezeptor für aktivierte C Kinasen 1 (RACK1) assoziiert. Aus diesem Grund wird der Signalweg zwischen dem β 1-Integrin und dem Typ 1 Insulin growth factor (IGF-1R) unterbrochen und dadurch findet der Phosphatidylinositol- 3 Kinase (PI3K)/ Protein-Kinase B (AKT) anstelle des growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)/ extrazelluläre signal-regulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2) Signalweges statt. Dies führt zu einer vermehrten Proliferation von Tumorzellen und somit zu einem stärkeren Wachstum des Tumors (siehe Abbildung 3) [15].



(A) normaler Signalweg: ein stabiler Komplex aus dem IGF-1R, RACK1 und β 1 Integrin aktiviert die focal adhesion kinase (FAK) indem eine Phosphorylierung des Tyrosins-925 stattfindet. Dies führt zu einer Aktivierung des GRB2-ERK1/2 Signalwegs, welcher die Proliferation, das Wachstum und die Migration von Tumorzellen fördert.

(B) Wildtyp – das PSMA ist vorhanden: Das PSMA assoziiert mit dem RACK1. Somit ist die Signaltransduktion zwischen dem β 1-Integrin und dem IGF-1R unterbrochen. Aus diesem Grund wird der PI3K-AKT anstatt des GRB2-ERK1/2 Signalweges aktiviert.

(C) Wenn das PSMA-Gen herunterreguliert wurde (PSMA-knockout) bildet sich der Komplex bestehend aus IGF-1R, RACK1 und dem β 1-Integrin. Dieser aktiviert den GRB2-ERK1 Signalweg. Dies führt zu einem verzögerten Wachstum, Überleben und Proliferation der Tumorzellen. Die Tumore werden somit kleiner.

ABBILDUNG 3 DIE PSMA-ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION BEIM PROSTATAKARZINOM

Abbildung übernommen aus [PSMA redirects MAPK to PI3K-AKT signaling to promote cancer progression](#), Leslie Ann Caromile and Linda Shapiro [15].

Ghosh *et al.* konnten jedoch in einem in vitro Modell nachweisen, dass die Invasivität von PSMA-negativen Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zu denen, die PSMA-positiv sind, reduziert ist. Das Herunterregulieren des PSMA Gens auf der LNCaP Zelllinie erhöhte sogar 5-fach dessen Invasionskapazität [29].

Somit bleibt die Rolle, die das PSMA bei der Tumorprogression und –invasivität hat, unklar.

2.2.6. DIE PSMA EXPRESSION BEI KARZINOMEN

2.2.6.1. DIE PSMA EXPRESSION IM PROSTATAGEWEBE UND BEIM PROSTATAKARZINOM

Das PSMA befindet sich auf gesundem sowie auf bösartigem Prostatagewebe. Adenokarzinome der Prostata haben eine höhere PSMA Expression als benignes Gewebe. Das PSMA wird ebenfalls in den Lymphknotenmetastasen sowie in den Fernmetastasen des Prostatakarzinoms exprimiert [69]. Die Expression des PSMA ist in den Lymphknotenmetastasen des Prostatakarzinoms ausgeprägter als im Primarius [69]. Eine höhere PSMA Expression ist signifikant mit einem höheren Tumorstadium und Gleason Score, [59] sowie mit der Hormon-Refraktärität des Prostatakarzinoms assoziiert [75]. Außerdem haben Patienten mit einer höheren PSMA Expression ein höheres präoperatives prostataspezifisches Antigen (PSA) im

Serum und ein höheres Risiko für einen erneuten PSA-Anstieg nach der operativen Therapie [59] [69].

2.2.6.2. ANDERE SOLIDE KARZINOME

Das PSMA ist jedoch nicht nur bei Prostatakarzinomzellen aufzufinden. Tumorzellen einer Vielzahl an anderer Tumorentitäten exprimieren ebenfalls dieses Antigen. Das Urothel-, das kolorektale und das Lungenkarzinom sind beispielsweise PSMA-positiv [45] [96].

Was das Mammakarzinom angeht, wurden bisher sehr unterschiedliche Ergebnisse publiziert. Während *Kinoshita et al.* in einem Fall eines invasiv duktales Mammakarzinoms eine PSMA-Positivität nachweist [45], wurde in der Studie von *Wernicke et al.* in 92 Fällen keine Expression des Proteins in den Tumorzellen gefunden [102]. Weitere Studien sind indiziert um dies weitergehend zu untersuchen.

2.2.6.3. DIE PSMA EXPRESSION IN DER TUMORNEOVASKULATUR

Das PSMA wird in der Neovaskulatur von vielen verschiedenen bösartigen Tumorentitäten exprimiert, wie zum Beispiel dem Nierenzellkarzinom [18], Magenkarzinom, kolorektalen Karzinom [36], Glioblastom multiforme, Lungenkarzinom [96] und dem Urothelkarzinom [18]. Dabei ist die PSMA Expression restriktiv auf der Tumorneovaskulatur aufzufinden und nicht auf den Gefäßen des gesunden Gewebes [19] [64] [96].

Nomura et al. konnten in Ihren Untersuchungen nachweisen, dass die Mikrogefäße von gesunden Gehirnpräparaten keine PSMA Expression aufweisen. Nur <5% der Neuronen waren PSMA-positiv. Diese waren von einer intakten Blut-Hirn-Schranke umgeben. Im Gegensatz dazu hatte die Neovaskulatur von Grad IV Gliomen eine starke PSMA Expression. In den untersuchten Gehirnmetastasen eines Mammakarzinoms war ebenfalls PSMA in der Tumorneovaskulatur aufzufinden. Die Expression war in den Metastasen jedoch niedriger als im Primarius [64].

Daraus kann man schließen, dass das PSMA eine spezifische Zielstruktur der Neovaskulatur von Brustkrebsmetastasen in das Gehirn sein könnte. Da nur eine niedrige Patientenzahl untersucht wurde (n=4), könnten weitere Studien diesen Verdacht untermauern.

Eine weitere Studie von *Wernicke et al.* hat aus diesem Grund die PSMA Expression in der Tumorneovaskulatur bei Brustkrebspatienten untersucht. Dabei wurden sowohl der Primärtumor als auch Gehirnmetastasen begutachtet. In 98% der Fälle waren nur die Tumormikrogefäße PSMA-positiv und keine Gefäße des gesunden Brustdrüsengewebes. 74% der Primärtumorproben und 100% (14/14) der Gehirnmetastasen zeigten eine positive PSMA-Expression in den Gefäßen. Dabei war eine höhere PSMA Expression mit schlechteren Prognosefaktoren signifikant assoziiert: insbesondere die größeren, triple negativen Tumore mit einem höheren Ki-67 Level hatten eine starke PSMA Expression [102]. Dies bestätigt *Nomura*

et al.'s Verdacht, dass das PSMA für das Mammakarzinom sowie dessen Gehirnmetastasen eine mögliche Zielstruktur für eine antiangiogenetische Therapie wäre.

Weitere Studien bestätigten ebenfalls die PSMA Expression in den Mikrogefäßen des Brustkrebses [18] [92]. In den immunhistochemischen Untersuchungen von *Tolkach et al.* korrelierten verschiedene klinikopathologische Parameter mit der PSMA Expression auf der Tumorneovaskulatur. Bei einem höheren Grading, invasiv duktalem und Her2Neu oder triple negativen Karzinomen war die Intensität der Anfärbung des PSMA auf den Endothelzellen signifikant höher [92].

Das Vorhandensein des PSMA in der Neovaskulatur könnte ebenso von besonderem Interesse für andere bösartige gynäkologische Erkrankungen darstellen. Es wurde bereits mit niedrigen Fallzahlen für das Ovarial-, Endometrium-, Vulva- und das Zervixkarzinom untersucht. Es zeigte sich eine starke PSMA Expression, vor allem bei den Ovar- und Endometriumkarzinomen. Dabei war von besonderem Interesse, dass alle Ovarialmetastasen das gleiche Expressionsmuster des PSMA in jeder Lokalisation hatten [103].

Das PSMA scheint also nicht nur für das Mammakarzinom von besonderem Interesse zu sein, denn einige weitere Tumorentitäten könnten auch in der Gynäkologie von einer spezifischen antiangiogenetischen PSMA-Therapie profitieren.

2.2.7. PSMA BILDGEBUNG

Das PSMA ist ein Epitop, welches spezifisch für eine Vielzahl an malignen Erkrankungen ist. Daher wird es bereits als Zielstruktur zur diagnostischen Bildgebung verwendet.

2.2.7.1. PSMA BILDGEBUNG BEIM PROSTATAKARZINOM

Da beim Prostatakarzinom die PSMA Expression gesteigert ist und dieses Protein an der Zelloberfläche zu finden ist, ist es eine geeignete Zielstruktur, um Prostatakarzinomzellverbände in der Bildgebung darzustellen.

Die PET-CT Untersuchung wird bei Patienten, die an einem Prostatakarzinom erkrankt sind durchgeführt, um ein Rezidiv des Tumors darstellen zu können. Hierfür stehen verschiedene Marker zu Verfügung, welche jedoch oft inadaptiert sind oder diagnostische Lücken haben. Das ¹⁸F-Fluorodesoxyglucose-PET-CT beispielsweise ist nicht sehr sensitiv, da das Uptake vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen abhängig ist [104]. Aktuell werden in den Richtlinien der European Association of Urology (EAU) die diffusionsgewichtete Magnetresonanztomographie (MRT) und die CT Untersuchung bei Patienten mit einem niedrigen Risiko aufgrund einer zu niedrigen Sensitivität nicht empfohlen [110]. Daraus resultiert die Notwendigkeit neuerer Methoden.

Für die Darstellung des PSMA in der PET-CT Untersuchung wurden verschiedene Strukturen entwickelt, die das PSMA spezifisch binden. Hierfür können PSMA-Antikörper oder sogenannte small molecules, also niedermolekulare Verbindungen verwendet werden.

Es existieren unterschiedliche PSMA-Antikörper. In diesem Abschnitt werden zwei verschiedene Antikörper, die ein anderes Epitop des PSMA binden und zur PSMA-Bildgebung verwendet wurden, erläutert.

Zu aller erst wurde das *capromab pendetide* oder ProstaScint® entwickelt. Hier ist der Antikörper 7E11 radioaktiv markiert und wird an gamma-ausstrahlendem Indium-111 (¹¹¹In) gekoppelt. Diese Bildgebung zeigte vielversprechende Ergebnisse. Eine große multizentrische Studie, die diese Bildgebung bei 2154 Patienten durchführte, zeigte eine Anreicherung durch das ProstaScint® bei 80,1% an Prostatakarzinom-erkrankten Patienten, deren Erkrankung noch nicht therapiert wurde. Bei 146 dieser Patienten war ein CT Bild zum Vergleich verfügbar. In 107 Fällen, also 73,3%, waren diese CT-Bilder falsch negativ und Lymphknotenmetastasen wurden allein durch die PSMA-Bildgebung entdeckt. Bei Patienten mit einer stark fortgeschrittenen Tumorerkrankung war der positiv prädiktive Wert sogar bei 81% [87].

Der Antikörper 7E11 erkennt jedoch nur die intrazelluläre, zytoplasmatische Domäne des PSMA (siehe Abbildung 4). Antikörper sind hydrophil und können Zellmembranen nicht passieren. Dies führt zu einer diagnostischen Lücke, da dieser Antikörper die Zellmembran nicht passieren kann und das ProstaScint® sich aufgrund dessen hauptsächlich in nekrotischen Zellen mit zerstörter Plasmamembran anreichert. Im Gegensatz dazu konnten Antikörper, die gegen die extrazelluläre Domäne des PSMA gerichtet waren, intakte Tumorzellen binden [104].

Der Antikörper J591 zum Beispiel ist spezifisch für die extrazelluläre Domäne des PSMA (siehe Abbildung 4). Aufgrund dessen wurde dieser Antikörper ebenfalls verwendet für bildgebende Untersuchungen verwendet [68]. Dadurch konnten ebenfalls intakte PSMA-exprimierende Tumorzellen dargestellt werden. Der Antikörper J591 wird ebenfalls für PSMA-gerichtete Therapien bei anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Nierenzellkarzinom verwendet [68].

Antikörperbasierte diagnostische Radiopharmazeutika sind jedoch durch ihre lange Halbwertszeit und deren reduzierte Tumorpenetrabilität (insbesondere in Knochenmetastasen) limitiert [26].

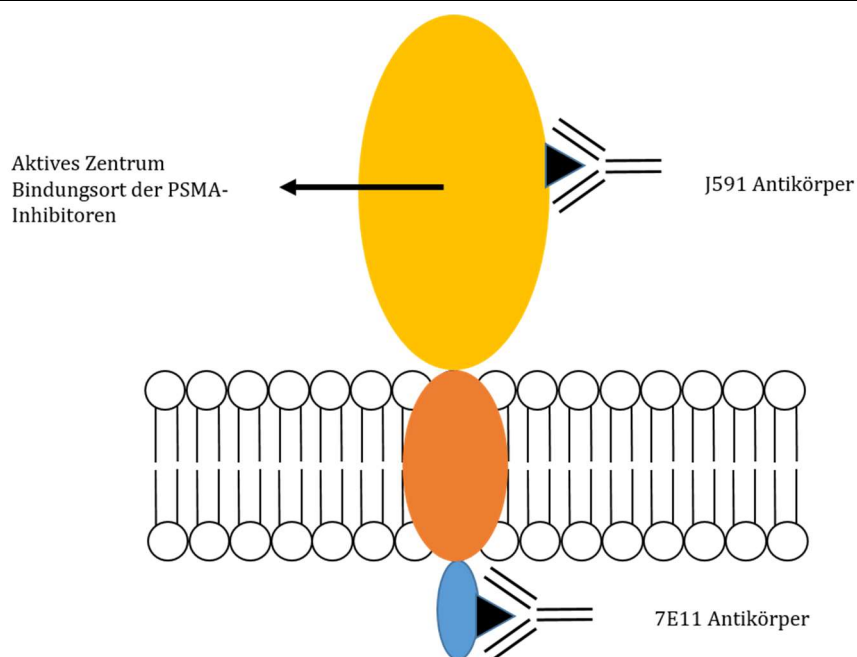


ABBILDUNG 4 BINDUNG DER LIGANDEN BEI DER PSMA BILDGEBUNG

Adaptiert aus Current use of PSMA-PET in prostate cancer management, *Thomas Maurer et al.* [54].

Aus diesem Grund wurden zur spezifischen Darstellung des PSMA in der Bildgebung außerdem sogenannte „small molecules inhibitors“, also niedermolekulare Verbindungen, zunutze gemacht. Da das PSMA im Gehirn die Funktion der NALAADase hat, wurden viele niedermolekulare Verbindungen entwickelt, die ebendieses Enzym hemmen. Für die Bildgebung werden diese small molecules wiederum an radioaktive Liganden gebunden, um sie in der PET Bildgebung darstellen zu können. Durch ihre niedrige molekulare Masse kann eine rasche Eliminierung aus der Blutbahn erfolgen, die zu einer niedrigeren Gesamtstrahlung für die bildgebende Untersuchung führt. Dies ist ein Vorteil gegenüber den Antikörper-basierten bildgebenden Untersuchungen [104].

Es wurden mehrere small molecules entwickelt, die spezifisch auf das PSMA gerichtet sind. Hierfür wurden PSMA-Inhibitoren synthetisiert, die eine hohe Affinität zum PSMA haben und von diesem Protein internalisiert werden [25]. Ein Beispiel hierfür ist das (S)-2-(3-((S)-1-carboxy-S((4-(¹²³I-iodobenzyl)amino)pentyl)ureido)pentanedioic acid (MIP). In der Bildgebung wird dieses Molekül beispielsweise als ¹²³I-MIP-1072 und als ¹²³I-MIP-1095 verwendet [26]. Diese Struktur hat eine hohe Affinität zum PSMA. Es wurden jedoch weitere Verbindungen entwickelt, deren Affinität noch gesteigert ist. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass das aktive Zentrum des PSMA aus zwei Teilen besteht: einer davon wird durch die Harnstoff-basierten Inhibitoren gehemmt, der andere ist eine lipophile Tasche. Ebendiese lipophile Tasche wird zusätzlich durch das N,N'-bis[2-hydroxy-5-(carboxyethyl)-benzyl]ethylenediamineN,N'-diacetic acid (HBED-CC) gebunden [25]. Das HBED-CC bindet dabei nicht nur das durch Harnstoff-basierte Inhibitoren gebundene aktive Zentrum, sondern auch ebendiese lipophile Tasche. Dies führt zu einer

vermehrten Affinität dieser Verbindung zum PSMA. Dadurch ist das HBED-CC ein vielversprechendes Molekül, welches zur PSMA-Bildgebung verwendet werden kann und bereits verwendet wird [25].

Bildgebende PET-Untersuchungen mit dem HBED-CC wurden bereits bei großen Patientenkollektiven (n=319) durchgeführt. Diese Studie zeigte bei Prostatakarzinompatienten eine Sensitivität von 88,1%, denn bei allen histologisch untersuchten Läsionen waren 30 falsch negativ. Die 416 anderen Läsionen wurden richtig-positiv oder richtig negativ durch das PET-CT erkannt. Es gab keine falsch-positiven Stellen. Das HBED-CC akkumuliert bei der Bildgebung außerdem in den Speicheldrüsen, der Leber, der Milz, dem Dünndarm und den Harnwegen [2].

Die vielversprechenden Ergebnisse der PSMA-Bildgebung können von großem Nutzen sein. Die in der Bildgebung dargestellten positiven Läsionen, zeigen die Anzahl an Strukturen, bei denen sich eine therapeutische Wirkung entfalten könnte.

2.2.7.2. PSMA BILDGEBUNG BEIM MAMMAKARZINOM

Die Möglichkeit einer PSMA-spezifischen bildgebenden Untersuchung ist nicht nur für das Prostatakarzinom von erheblichem Interesse, sondern wird ebenfalls bereits bei Mammakarzinompatienten angewendet.

Daher wurde die ⁶⁸Ga-PSMA-HBED-CC Verbindung zur PET-Bildgebung bei Brustkrebspatienten getestet. Nach einem Fallbericht eines im Jahre 2015 durchgeführten ⁶⁸Ga PSMA PET-CTs bei einer 33-jährigen Patientin, die an einem metastasierten Mammakarzinom erkrankt war, wurde diese Diagnostik im Jahre 2017 bei einer größeren Patientenkohorte (n=19) wiederholt. Diese Untersuchung zeigte in den ersten Studien vielversprechende Ergebnisse. *Sathekge et al.* konnten durch das PET-CT bei 84% (n=81) der zuvor identifizierten Tumorkläsionen eine PSMA Positivität im HBED-CC PET/CT nachweisen [89].

Somit scheint die PSMA-spezifische Bildgebung auch für Brustkrebspatienten eine neue Untersuchung zu diagnostischen Zwecken sein zu können.

2.2.8. PSMA THERAPIEMÖGLICHKEITEN

Liganden des PSMA werden, nach Bindung mit diesem Protein, mit ihm nach intrazellulär befördert über sogenannte „clathrin coated pits“ [Clathrin beschichtete Gruben] und akkumulieren anschließend in den intrazellulären Endosomen [50]. Dadurch ist das PSMA eine geeignete Zielstruktur für eine Therapie mit Radionukliden. Hier werden Strahlen mit einer möglichst geringen Eindringtiefe eingesetzt, die durch die spezifische Bindung eines Liganden gezielt eingesetzt werden können. Somit binden in diesem Beispiel die injizierten Stoffe direkt an den PSMA-tragenden Zellen und die radioaktive Strahlung kann auf den bösartigen Zellen direkt ihren zytotoxischen Effekt ausüben [43].

Für jene spezifische Therapie des Prostatakarzinoms wurden bereits unterschiedliche Liganden entwickelt, wie zum Beispiel das ^{131}I -MIP-1095 oder das vom deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) entwickelten ^{177}Lu -PSMA-DKFZ-617 [3] [74] [108]. Vor Beginn der Therapie erfolgte eine PSMA-PET Untersuchung, um das Andocken des Liganden darstellen und nachweisen zu können. Dies ist von großem Vorteil, da prätherapeutisch, anhand der Anzahl an PSMA-positiven Läsionen, das Ansprechen der geplanten Therapie bereits evaluiert werden kann.

Das ^{131}I -MIP-1095 zum Beispiel, führte bei Anwendung bei Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom in 60,7% der Fälle zu einer Verminderung des PSA-Levels über die Hälfte des Ausgangswertes. Außerdem wurden die durch die Metastasierung induzierten Knochenschmerzen in 84,6% der Fälle erheblich reduziert [108]. Eine große deutsche multizentrische Studie, bei der diese spezifische Therapie bei 145 Patienten, die ebenfalls an einem metastasierten Prostatakarzinom erkrankt waren, angewendet wurde, zeigte eine Verminderung des PSAs im Serum in 99 (68%) Fällen. Während der gesamten Nachkontrollzeit hatten 45 dieser 99 Patienten (45%) eine dauerhafte biochemische Remission mit einer $\geq 50\%$ Verminderung des PSAs [74].

Direkt nach der Injektion der Therapie hatten die Patienten keine Nebenwirkungen bis auf Übelkeit. Langfristig führte es zu keiner gravierenden Hepato- oder Nephrotoxizität. In einigen Fällen konnte eine hämatotoxische Wirkung beobachtet werden [3] [108] [74]. Da die Speicheldrüsen im Rahmen dieser Therapie eine starke Anreicherung hatten, berichteten die Patienten nach der Therapie über Mundtrockenheit [3] [108]. Ansonsten zeigte diese Therapie keine gravierenden Nebenwirkungen und scheint gut verträglich zu sein.

Insgesamt ist die PSMA-gerichtete Radionuklidtherapie vielversprechend. Aus diesem Grund wird sie bereits in mehreren Kliniken angeboten. Diese Therapie ist jedoch noch nicht zugelassen.

Weitere Therapieansätze, die keine radioaktive Strahlung, sondern Chemotherapeutika verwenden, werden ebenfalls erforscht. Hier wird sich die spezifische Bindung des

Harnstoffbasierten 2-[3-(1,3-dicarboxypropyl)-ureido]pentanedioic acid]] (DUPA) an das PSMA zunutze gemacht. Das DUPA wird in einer Studie aus dem Jahr 2018 direkt an das Chemotherapeutikum Paclitaxel über Disulfidbrücken gekoppelt, um eine gerichtete zytotoxische Wirkung des Paclitaxels an den PSMA exprimierenden Zellen erzielen zu können. Die DUPA-Paclitaxel Verbindung wird über das PSMA durch Endozytose in die Tumorzellen aufgenommen. Somit kann das Therapeutikum seine Wirkung gezielt in den bösartigen Zellen ausüben. Dies zeigte in vitro bei Prostatakarzinomzellen eine Verminderung der Überlebensfähigkeit der bösartigen, PSMA-tragenden Zellen [53].

Zusammenfassend werden PSMA-gerichtete spezifische Therapien vor allem für das metastasierte Prostatakarzinom, bereits erforscht und weiterentwickelt. Es könnte sich jedoch daraus auch ein Nutzen für weitere Tumorentitäten ziehen, die ebenfalls eine starke PSMA Expression an ihrer Zelloberfläche aufweisen.

Ein Fallbericht führte aufgrund dessen sogar zwei Zyklen einer PSMA-basierten ¹⁷⁷-Lu-Radioliganden Therapie bei einer Patientin, die an einem metastasierten, triple negativen Mammakarzinom erkrankt war. Die Patientin hatte keine Nebenwirkungen von der Therapie. Der Ligand zeigte eine gute Akkumulation im bösartigen Gewebe. Leider fand trotz Therapie eine weitere Tumorprogression statt [92].

Weitere Studien könnten diesen Therapieansatz bei anderen Patientinnen weiterverfolgen.

2.3. DIE NEOVASKULARISATION

2.3.1. DEFINITIONEN UND FUNKTIONEN DER NEOVASKULARISATION

Die Neovaskularisation umfasst drei unterschiedliche Begriffe: die Vaskulogenese, die Arteriogenese und die Angiogenese [90].

Die Vaskulogenese ist für die fetale Entwicklung unabdingbar. Sie findet nicht im Erwachsenenalter statt. Bei der Vaskulogenese handelt es sich um eine de novo Formation von Blutgefäßen aus Angioblasten, also Endothelvorläuferzellen aus dem Mesoderm [72] [90] [101].

Die Arteriogenese entsteht nach Stenosierung eines Gefäßes. Sie wird hauptsächlich durch die Scherkräfte getriggert, die nach einer Stenosierung durch die Perfusionsdruckunterschiede entstehen. Bei der Arteriogenese entstehen neue Kollaterale aus präexistierenden Arteriolen [90].

Die Angiogenese ist durch die Entwicklung von neuen Blutgefäßen aus schon vorhandenen Gefäßen definiert. Dies kann durch Sprossung oder Teilung (auch Intussusception genannt) der präexistierenden Gefäßen erfolgen und wird erst durch Proliferation von Endothelzellen möglich [72] [101].

Für das Sprießen neuer Gefäße ist vor allem der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor [growth faktor] (VEGF) für die Degradation der Basalmembran des präexistierenden Gefäßes und die Proliferation der Endothelzellen, die anschließend ein neues Lumen bilden, verantwortlich [1].

Die Intussusception, oder intusszeptives mikrovaskuläres Wachstum, ist ein ökonomischerer Vorgang als das Sprießen von Gefäßen. Dabei werden präexistierende Gefäße in zwei geteilt. Dies kommt dadurch zustande, dass durch Protrusion eine Kontaktzone zwischen zwei gegenüberliegenden Kapillarwände geschaffen wird. Anschließend wird diese zelluläre Doppelschicht perforiert, um das Penetrieren von Wachstumsfaktoren zu ermöglichen (siehe Abbildung 5). Zuletzt kommt es zu einer Invasion von Myofibroblasten und Perizyten, die das Grundgerüst für die neu entstandene Kapillarwand sind [49].

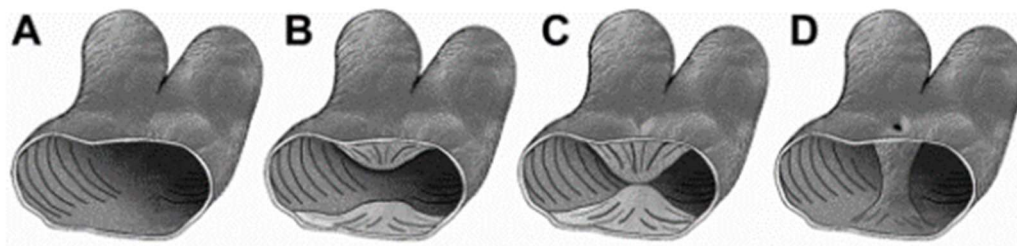


ABBILDUNG 5 DIE INTUSSUSCEPTION

Protrusion der gegenüberliegenden Kapillarwand ins Lumen (A und B), Schaffung einer Kontaktzone zwischen den Endothelzellen (C). Nach einer zentralen Perforation der zellulären Doppelschicht, formieren die fusionierten Endothelzellen eine transmurale Manschette, die später durch Myofibroblasten und Perizyten invadiert wird.

Abbildung übernommen aus Angiogenesis and Vascular Remodeling by Intussusception: From Form to Function, von Kurz et al. [49].

Bei Erwachsenen ist die Neovaskularisation für eine Vielzahl an Prozessen notwendig, wie beispielsweise die Wundheilung, und die Vorgänge in den weiblichen Reproduktionsorganen wie die Ovulation oder die Follikelreifung [90].

Es gibt verschiedene Reize für die Bildung von neuen Blutgefäßen: sowohl eine gesteigerte metabolische Aktivität als auch Hypoxie können diesen Prozess triggern [1].

Der „angiogenetische switch“ beschreibt die Wechselwirkung zwischen proangiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren. Sobald eine Störung in diesem Gleichgewicht stattfindet, die beispielsweise durch metabolischen oder mechanischen Stress entstehen kann, kommt es zu einem Überwiegen der proangiogenetischen Faktoren. Dies führt zu einer Überproliferation von Gefäßen, die beispielsweise zur Tumorprogression beitragen kann. Bei einem Ungleichgewicht spricht man von einem „ausgeschalteten angiogenetischen switch“ [14] [90].

Der wichtigste und heutzutage am besten untersuchte proangiogenetische Faktor ist dabei das VEGF. Das VEGF ist ein endothelzellspezifischer Wachstumsfaktor und ist für das Überleben von Gefäßen und Endothelzellen unverzichtbar [72]. Der hauptsächliche Sezernierungsreiz des VEGF ist Hypoxie [90]. Der Hypoxie-induzierter Faktor 1 ist für die Expression des VEGF verantwortlich [1] [14]. Es sind außerdem noch viele weitere Moleküle an dem Wachstum neuer Gefäße beteiligt, wie beispielsweise Fibroblasten Wachstumsfaktoren [90].

Zusammenfassend ist die Neubildung von Gefäßen ein komplexer Prozess, an dem viele unterschiedliche Faktoren beteiligt sind und der verschiedene Funktionen im menschlichen Körper hat.

2.3.2. DIE ANGIOGENESE BEI BÖSARTIGEN ERKRANKUNGEN

Die Rolle der Angiogenese für das Tumorwachstum wurde schon vor vielen Jahren entdeckt. Judah Folkman formulierte im Jahre 1971 die Hypothese, dass das Tumorwachstum und dessen Metastasierung von der Neubildung von Blutgefäßen abhängig ist [28]. Es werden Sauerstoff und Nährstoffe benötigt, um das Wachstum des Tumors zu ermöglichen [14] [72]. Ohne Angiogenese werden Tumore nekrotisch oder apoptotisch [14]. Dadurch könnte die Tumorneoangiogenese ein Therapieangriffsziel sein.

Bei bösartigen Erkrankungen kann die Angiogenese durch Wachstum und Teilung von präexistierenden Gefäßen erfolgen oder sich zirkulierende Endothelvorläuferzellen aus dem Knochenmark zunutze machen [14]. Das Sprießen von neuen Blutgefäßen aus schon vorhandenen Gefäßen ist hier von großer Bedeutung. Es wurde zuerst in den späten siebziger Jahren von *Ausprunk* und *Folkman* beschrieben [6]. Andererseits können Tumore auch präexistierende Gefäße mitbenutzen. Dafür ist der Begriff des „*co-option*“ ausgewählt worden [72].

Tumorblutgefäße haben eine Defizienz an perivaskulären Zellen. Sie bestehen meist aus einer Mischung aus Endothel- und Tumorzellen. Dadurch ist der Blutfluss in Tumoren sehr variabel. Die Gefäße eines Tumors sind im Vergleich zu normalem Gewebe chaotisch angeordnet und haben eine geschlängeltere Form. Dies führt zu einem ungeordneten Blutfluss und Hypoxie in einigen Tumorarealen. Die Hypoxie selber ist auch ein Reiz für die Bildung neuer Gefäße und führt zu einer Selektion von bösartigeren Zellen, die auch in einer hypoxischen und sauren Umgebung nicht apoptotisch werden. Außerdem führt dies zu einer niedrigeren Wirksamkeit von einigen Therapiemöglichkeiten. Chemotherapien können aufgrund des niedrigen Blutflusses weniger intratumoral wirken und eine Radiotherapie ist bei hypoxischen Zuständen weniger effektiv [14] [72].

Somit ist die Bildung von neuen Gefäßen nicht nur bei physiologischen Vorgängen unverzichtbar, sondern auch für die Progression von bösartigen Erkrankungen. Aus diesem Grund werden heutzutage viele Therapien entwickelt, die ebendiese Gefäßneubildung verhindern sollen.

2.3.3. DIE ROLLE DER ANGIOGENESE BEIM MAMMAKARZINOM

Beim Mammakarzinom hat die Bildung von neuen Blutgefäßen ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Tumorphathogenese.

Schon im Jahre 1945 zeigten *Algire et al.*, dass wenn Mammakarzinome in Mäuse transplantiert werden, sich bereits nach drei Tagen neue Gefäße zur Versorgung des bösartigen Gebildes

ausbilden [5]. Nach dieser initialen Neoangiogenese fingen die Tumore an zu wachsen. Nach bereits sieben Tagen war die Gefäßdichte in den Mammakarzinomen doppelt so hoch wie in dem umgebenden gesunden Gewebe [5]. Das Risiko der Entstehung bösartiger Läsionen bei Patientinnen mit einer fibrozystischen Mastopathie steigt mit der Anzahl an Gefäßen im Gewebe [35].

In der Studie von *Guidi et al.* konnte nachgewiesen werden, dass die Neoangiogenese bereits in sehr frühen Stadien abläuft, da bereits DCIS Läsionen von einer gesteigerten Anzahl an Gefäßen umgeben sind [34].

Die Bildung neuer Blutgefäße ist also auch für die Entstehung einer bösartigen Läsion der Brust unverzichtbar.

2.3.4. DIE INTRATUMORALE MIKROGEFÄßDICHTEN UND DAS MVD (MICROVESSEL DENSITY)

Die Bildung von neuen Blutgefäßen in Tumoren ist ein dynamischer Prozess. Die Gefäße in den soliden Tumoren sind ungleichmäßig verteilt, sie befinden sich hauptsächlich in den Randbereichen [91]. Daher ist die Quantifizierung der Neovaskulatur eines Tumors eine Herausforderung.

In vivo können verschiedene nicht-invasive bildgebende Verfahren, wie beispielsweise das MRT, der Doppler Ultraschall oder das PET-CT über die Vaskularisation eines Tumors Aufschluss geben [73]. Leider kann dies nicht die Anzahl an Mikrogefäßen auf mikroskopischer Ebene darstellen. Aus diesem Grund sind Methoden erforderlich, die dies quantifizieren können.

Um eine Systematik in der Quantifizierung an Gefäßen herzustellen, wurde die sogenannte microvessel density (MVD) entwickelt. Um diesen Wert zu bekommen, werden, nach der Methode von *Weidner et al.* aus dem Jahre 1995 [99] „hot spots“, also Areale, die in immunhistochemischen Gefäßfärbungen mikroskopisch besonders stark vaskularisiert sind, identifiziert. Anschließend werden alle Gefäße gezählt.

Der MVD ist in einer Vielzahl an Tumorentitäten, wie beispielsweise das Prostatakarzinom [98] oder das Zervixkarzinom [11] als Prognosefaktor geeignet oder mit einem schlechteren Tumorstadium assoziiert.

In seinem Review aus dem Jahre 1998 fasste Noel Weidner drei Theorien zusammen, die eine Erklärung für den Zusammenhang zwischen dem MVD und der Aggressivität eines Tumors lieferten: einerseits metastasieren Tumore mit einem höheren MVD schneller, andererseits kann durch eine höhere Gefäßdichte das Tumorstroma besser ernährt werden und somit schneller wachsen. Zuletzt korreliert die Anzahl an Gefäßen in einem Tumor mit der Anzahl an Möglichkeiten für ihn zu streuen [100].

Leider stößt man auf erhebliche Unterschiede bei der Färbemethodik (verschiedene Antikörper oder Antigen Retrieval Methoden werden angewendet) und bei der Bestimmung der sogenannten „hot spots“. Dadurch sind die Studien, die sich mit der Zählung des MVDs befassen, schwer miteinander zu vergleichen [63].

2.3.4.1. DER MVD BEIM MAMMAKARZINOM

Der MVD hat sich beim Mammakarzinom in mehreren Studien als ein guter prognostischer Faktor erwiesen. Ein höherer MVD ist mit einem kürzeren rezidivfreien- und Gesamtüberleben assoziiert. In der multivariaten Analyse von *Jacquemier et al.* hat sich der MVD sogar als der aussagekräftigste Prognosefaktor für das Gesamtüberleben herausgestellt [42]. Außerdem wurden Zusammenhänge zwischen dem MVD und aggressiveren Mammakarzinomen gefunden: das Auftreten von Lymphknotenmetastasen und von Fernmetastasen [97] korreliert mit einem höheren MVD. *Weidner et al.* zeigten im Jahre 1991 [97], dass es für jeden Anstieg an 10 Mikrogefäßen pro 200x Feld ein 1,17-höheres Risiko für eine Fernmetastasierung bei Brustkrebspatientinnen gibt ($p=0.029$). Das höhere Risiko für eine Fernmetastasierung wurde ebenfalls von *McCulloch et al.* untersucht. Sie konnten nachweisen, dass Mammakarzinome mit einem höheren MVD mehr Tumorzellen während einer Tumoroperation ausschütten [55].

Zusammenfassend sind aggressivere Mammakarzinome mit einem höheren MVD und somit mit einer stärkeren Neoangiogenese assoziiert. Die neugebildeten Gefäße sind nicht nur für die Entstehung eines Mammakarzinoms unverzichtbar, sondern sind auch mit dem Voranschreiten der Erkrankung und einer schlechteren Prognose assoziiert. Die Verursacher oder Marker der Gefäße eines Mammakarzinoms könnten aus diesem Grund ein gutes Therapieziel sein.

2.3.5. ANTIANGIOGENETISCHE THERAPIEN AM BEISPIEL DES AVASTINS BEIM MAMMAKARZINOM

Die Neoangiogenese scheint für Tumorwachstum unabdingbar zu sein. Aus diesem Grund sind heutzutage eine Vielzahl an antiangiogenetischen Tumortherapien verfügbar, welche durch Inhibition des Gefäßwachstums den Krankheitsprozess verhindern. Da das VEGF-A eine zentrale Rolle in dem Gefäßwachstum spielt, zielen viele Therapien bei verschiedenen Tumorentitäten auf die Inhibition dieses Mediators.

Zur Inhibition des VEGF-A wird heutzutage zum Beispiel das Bevacizumab, oder Avastin® eingesetzt. Es ist ein rekombinanter monoklonaler Antikörper, der gegen das VEGF gerichtet ist. Das Bevacizumab bindet das VEGF und verhindert somit dessen Bindung an den VEGF Rezeptor. Dadurch wird die VEGF-abhängige Neoangiogenese eines Tumors unterbunden [94]. Dieses Medikament ist für unterschiedliche Patientengruppen zugelassen. Patienten mit einem

metastasiertem Kolorektalkarzinom, einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom oder einem Zervixkarzinom werden beispielsweise mit Avastin® behandelt [27].

Das Avastin® ist auch für die First-line Behandlung von Patientinnen mit einem Her2Neu-negativen, metastasierten Mammakarzinom in Kombination mit Paclitaxel zugelassen [27]. Die bessere Wirksamkeit des Wirkstoffes Bevacizumab in Kombination mit Paclitaxel im Vergleich zur Paclitaxel Monotherapie wurde in einer randomisierten Phase-III Studie, der E2100 Studie, nachgewiesen (für das Design der Studie, siehe Abbildung 6). Diese Studie wurde von der Eastern Cooperative Oncology Group im Jahre 2007 durchgeführt. Dabei wurde das progressionsfreie Überleben der Patienten in der Gruppe, die die Kombinationstherapie erhalten hatten signifikant verlängert (der Median der Gruppe, die die Kombinationstherapie erhalten hatten war bei 11,3 Monaten und bei der Gruppe, die die Paclitaxel Monotherapie erhalten hatte bei 5,8 Monaten). Dies erfolgte unabhängig vom Hormonrezeptorstatus der Tumore [57]. Die Ergebnisse wurden anschließend in einem unabhängigen Review bestätigt [33]. Diese Therapiemöglichkeit wird aktuell von der S3-Leitlinie aus dem Jahr 2018 immer noch empfohlen, mit dem Empfehlungsgrad 0 und dem „Level of Evidence“ 1a [111].

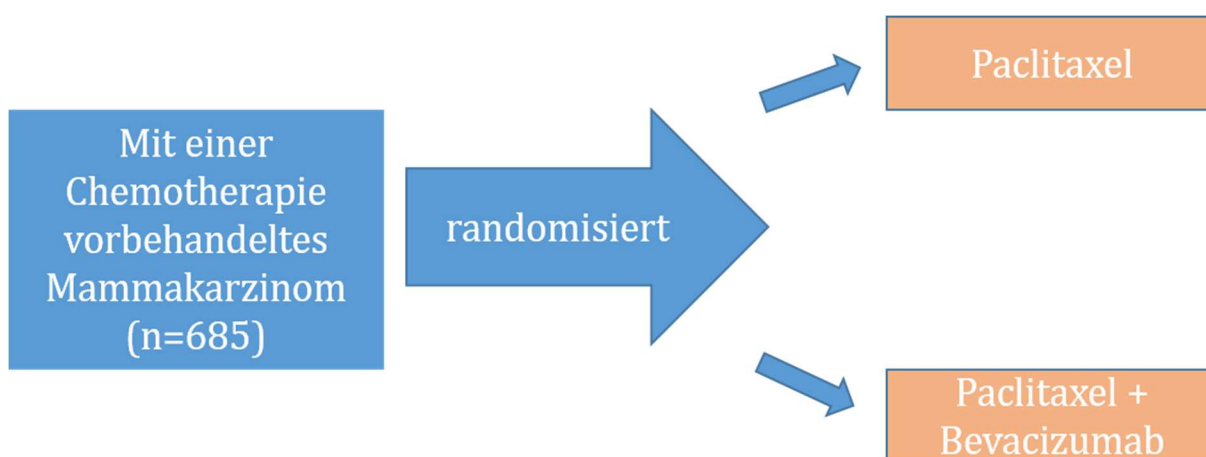


ABBILDUNG 6 DESIGN DER E2100 STUDIE

Adaptiert aus Independent Review of E2100: A Phase III Trial of Bevacizumab Plus Paclitaxel Versus Paclitaxel in Women With Metastatic Breast Cancer, *R.Gray et al.* [33]

Für die E2100 Studie wurden die 685 eingeschlossenen Patientinnen, randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Patientengruppe erhielt eine Paclitaxel Monotherapie, während der anderen Gruppe das Paclitaxel in Kombination mit Bevacizumab verabreicht wurde [57].

Die darauffolgenden Studien, die die Wirkung des Bevacizumab bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom untersuchen wollten (die AVADO Studie 2010 [71], die RIBBON-1 Studie 2011 [78] und die AVEREL Studie 2013 [30]) konnten nur einen Vorteil für das progressionsfreie Überleben bei vermehrten Nebenwirkungen nachweisen. Durch die Bevacizumab Therapie kam

es bei den Patientinnen vermehrt zu einer Hypertonie, Proteinurie, febriler Neutropenie, gastrointestinaler Perforationen, Kardiotoxizität oder Leukenzephalopathie.

Aus diesem Grund zog die FDA im Jahre 2011 die Zulassung für das Avastin zurück [17]. In Deutschland besteht die Zulassung weiterhin.

Zusammenfassend bestätigen diese Studien den Nutzen von antiangiogenetischen Therapien bei Patienten mit einem Mammakarzinom. Die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab geht jedoch mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen einher. Daher besteht die Notwendigkeit neuerer Therapieansätze.

2.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Ziel dieser Studie ist es, die Expression des PSMA bei Mammakarzinom und dessen Lymphknoten- und Fernmetastasen zu charakterisieren. Das Expressionsmuster des Primärs und dessen Metastasen soll verglichen werden. Außerdem soll untersucht werden, ob die Expression des PSMA mit Tumor- oder Patientenmerkmalen assoziiert ist und ob es als Prognosefaktor für Brustkrebs-Patientinnen geeignet ist.

Gewebeproben des Primärtumors, dessen Lymphknoten- und Fernmetastasen sollen anhand von immunhistochemischen Färbungen semi-quantitativ untersucht werden. Sowohl die Tumorzellen als auch die Gefäße sollen dabei bewertet werden. Die Expression des PSMA in den Gefäßen wird in Relation zur allgemeinen Gefäßdichte gesetzt. Hierzu wird die Anzahl an PSMA-positiven Gefäßen mit der Gesamtzahl an Gefäßen verglichen. Zur Bestätigung der Expression des PSMA soll eine Immunfluoreszenz durchgeführt werden, um die exakte Lokalisation des PSMA auf Tumormikrogefäßen zu überprüfen.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. PATIENTINNENKOLLEKTIV UND EINSCHLUSSKRITERIEN

In dieser Studie wurden die Gewebeproben von 72 Patientinnen mit histologisch gesichertem invasiven Mammakarzinom ausgewertet. Eingeschlossen wurden Patientinnen, bei denen: das primäre Mammakarzinom histologisch gesichert und invasiv wachsend war, keine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde, keine andere Tumorentität in der Eigenanamnese eruierbar war, deren Tumorgewebe im Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes verfügbar war (Primärtumor und/oder Lymphknoten- und/oder Fernmetastase) und bei denen eine schriftliche Einwilligung vorlag. Die klinischen Daten wurden retrospektiv erhoben. Als Stichtag für die Überlebensdaten wurde der 01. Februar 2017 festgesetzt.

Als Proben wurden Resektate genommen, die im Rahmen einer Operation am Universitätsklinikum des Saarlandes entnommen und im Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie archiviert wurden.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (*Referenznummer: 207/10*). Die Patientinnen wurden über das Thema dieser Arbeit und die Weiterverwendung Ihres Gewebes aufgeklärt. Sie unterschrieben diesbezüglich eine Einverständniserklärung.

3.2. MATERIALIEN UND REAGENZIEN

3.2.1. REAGENZIEN

Material	Artikelnummer	Hersteller
AlexaFluor® 488 <i>Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz</i>	R-37116	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
AlexaFluor® 568 <i>Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz</i>	A-11019	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V)	9048-46-8 (CAS-Nummer)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CD31-Primärantikörper <i>für die Immunhistochemie</i>	JC70A	Dako, Carpinteria, USA
CD31-Primärantikörper <i>für die Immunfluoreszenz</i>	ab28364	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse	K5005	Dako, Carpinteria, USA
Destilliertes Wasser	3451364	B.Braun, Melsungen, Deutschland
EDTA	E5134	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Entellan®Neu	107961	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y solution 0,5% wässrig	109844	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 99% pH=8,3	7004	Caesar&Lorenz GmbH, Hilden, Deutschland
Ethanol 99% , vergällt mit MEK	-	Liquid Production, Flintsbach, Deutschland
Hemalum acid nach Mayer <i>Hämatoxylin für die Hämatoxylin-Eosin Färbung</i>	2E-038	Waldeck GmbH&Co KG, Münster, Deutschland
Hematoxylin solution, Mayer's <i>für die Immunhistochemie</i>	MHS1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	-	Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Deutschland
PBS-Puffer	P4417	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Prolong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI	P36966	ThermoFischer scientific, Waltham, USA
PSMA-Primärantikörper	3E6	Dako, Carpinteria, USA

Salzsäure	-	Apotheke des Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg, Deutschland
Target retrieval solution 10-fach konzentrierter Zitratpuffer, pH=6,0	S1699	Dako, Carpinteria, USA
Trizma ® Base	RDD008	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	1330-20-7 (CAS-Nummer)	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland

TABELLE 5 REAGENZIEN

3.2.2. LÖSUNGEN

3.2.2.1. PUFFER UND LÖSUNGEN

Lösung	Stoffe	Menge
PBS Puffer pH=7,4	Phosphate buffered saline tablet	1
	destilliertes Wasser	200 ml
PBS/BSA 3%	BSA	0,3 g
	PBS Puffer	100 ml
PBS/BSA 1%	PBS/BSA 3%	3,3 ml
	PBS Puffer	3,7 ml
Retrieval Puffer für die Immunhistochemie	destilliertes Wasser	225 ml
	Target retrieval solution	25 ml
Tris-EDTA Puffer 10 mM Tris Base, 1mM EDTA pH=9,0	destilliertes Wasser	1000 ml
	Tris	1,21 g
	Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	0,37 g

TABELLE 6 PUFFER UND LÖSUNGEN

3.2.2.2. ANTIKÖRPERLÖSUNGEN

Alle Primärantikörper wurden in einer 1% PBS/BSA Lösung verdünnt.

Clone	Hersteller	Herstellungsart	Spezies	Verdünnung, Immun- histochemie	Verdünnung, Immun- fluoreszenz
3E6	Dako, Carpinteria	Monoclonal	Maus	1:25	1:20

TABELLE 7 PSMA-PRIMÄRANTIKÖRPER UND VERDÜNNUNGEN

Der PSMA Antikörper wurde 1:25 für die Immunhistochemie und 1:20 verdünnt für die Immunfluoreszenz verwendet (siehe Tabelle 7). Dabei wurde der Antikörper in die 1% PBS/BSA Lösung gegeben.

Um die möglichst besten Antikörper auszuwählen, wurde ein Review der in der Immunhistochemie bisher verwendeten Antikörper evaluiert [95]. Dabei hat sich herausgestellt, dass der Clone 3E6 von DAKO oft in der Literatur verwendet wurde. Insbesondere wurde dieser bereits an Brustkrebsgewebe und dessen Fernmetastasen getestet [64] [102]. Daher wurde entschieden, in dieser Studie ebenfalls diesen Antikörper zu verwenden.

Für die Darstellung des CD31 in der Immunhistochemie wurde der JC70A Antikörper von Dako 1:200 verdünnt verwendet. Für die Immunfluoreszenz wurde der ab28364 Antikörper von Abcam angewendet (siehe Tabelle 8).

Clone	Hersteller	Herstellungsart	Spezies	Verdünnung, Immun- histochemie	Verdünnung, Immun- fluoreszenz
JC70A	Dako, Carpinteria	monoclonal	Maus	1:200	keine Anwendung
ab28364	Abcam, Cambridge	polyclonal	Hase	keine Anwendung	1:40

TABELLE 8 CD31 PRIMÄRANTIKÖRPER UND VERDÜNNUNGEN

Außerdem wurden für die Immunfluoreszenz ausgewählte Sekundärantikörper zur Darstellung der Primärantikörper verwendet (siehe Tabelle 9).

Name	Artikelnummer	Hersteller	Herstellungsart	Spezies	Verdünnung	zur Darstellung des Primärantikörpers
Alexa Fluor® 568	A-11019	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA	polyclonal	Ziege-anti-Maus	1:1000	PSMA
Alexa Fluor® 488	R-37116	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA	polyclonal	Ziege-anti-Hase	1:1000	CD31

TABELLE 9 SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ UND VERDÜNNUNGEN

3.2.3. GERÄTE

Bezeichnung	Material	Hersteller
Färbeautomat für die Hämatoxylin-Eosin Färbung	Tissue Stainer COT 20	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Kühlplatte	Tissue Tek Cryo-Console	Miles Scientific, Newark
Mikrotom	Rotary 3003	pfm medical, Nonnweiler, Deutschland
pH-Messgerät	FiveEasy™ F20	Mettler Toledo, Columbus, USA
Reiskocher	Clatronic RK2925	Clatronic, Kempen, Deutschland
Thermometer	Thermometer 620-1638	Research park, Haasrode, Leuven, Belgien
Wärmeschrank	Heraeus Brutschrank Typ B6060 und Typ B5060E	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Wasserbad <i>Temperatur: 50°C</i>	HI 1210	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

TABELLE 10 GERÄTE

3.2.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Material	Hersteller
Deckgläschen (24x60mm, 24x50mm, 24x32mm ; Glasdicke 0,13-0,16mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Objektträger SUPERFROST® Plus, 25x75x1,0mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen (200µl, 20µl, 1000µl)	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland

TABELLE 11 VERBRAUCHSMATERIALIEN

3.2.5. OPTISCHE GERÄTE

Material	Hersteller	Verwendung
AxioCam MRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	Kamera zur Auswertung der Immunhistochemie
Axioskop 40 Durchlichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	Mikroskop zur Auswertung der Immunhistochemie
BX53 Upright Microscope	Olympus, Shinjuku, Japan	Mikroskop zur Auswertung der Immunfluoreszenz
Farbkamera XC30	Olympus, Shinjuku, Japan	Kamera zur Auswertung der Immunfluoreszenz
U-FUNA FL Filterwürfel U-FBNA FL Filterwürfel U-FGNA FL Filterwürfel	Olympus, Shinjuku, Japan	Filter zur Auswertung der Immunfluoreszenz
X-Cite®, 120 PC Q	EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Kanada	Lichtquelle für die Immunfluoreszenz

TABELLE 12 OPTISCHE GERÄTE

3.2.6. PROGRAMME

Material	Hersteller	Verwendung
Axiovision	Zeiss, Oberkochen, Deutschland	Anfertigung der Fotografien der Immunhistochemie
Cellsens standard, August 2014	Olympus, Shinjuku, Japan	Anfertigung der Fotografien der Immunfluoreszenz sowie Auswertung der Immunfluoreszenz und der Immunhistochemie

TABELLE 13 PROGRAMME

3.3. ANFERTIGUNG DER PARAFFINSCHNITTE

Paraffinblöcke von Formalin-fixiertem Gewebe des Instituts für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg wurden für das Patientinnenkollektiv identifiziert. Dabei wurden die für die weiteren Versuche geeigneten Blöcke mithilfe von den entsprechenden Hämatoxylin-Eosin (HE)-Präparaten ausgewählt. Dafür wurden die Präparate von einem Pathologen befundet. Dabei wurde darauf geachtet, dass dieser Tumorabschnitt repräsentativ war, um eine umfassende Aussage über die Charakteristika des malignen Geschehens treffen zu können. Ebenso in den Schnitten, wo das physiologische Brustdrüsengewebe untersucht wurde, musste darauf geachtet werden, dass genügend Material in den Schnitten vorhanden war.

Die Paraffinblöcke wurden für mindestens eine Stunde auf der Kühlplatte bei 0 Grad Celsius (°C) vorgekühlt. Danach konnten die Blöcke in das Rotationsmikrotom eingespannt und mehrere 4 Mikrometer (μm) dicke Schnitte angefertigt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die gesamte Fläche des Gewebestücks angeschnitten wurde und, dass die Schnitte möglichst aufeinanderfolgend auf die Objektträger (SUPERFROST® Plus) aufgezogen wurden, um annähernd die gleichen Tumoranteile bei der immunhistochemischen Färbung analysieren zu können. Die Gewebeschnitte wurden anschließend auf einem Wasserbad bei 50°C appliziert. Dadurch konnten sich die Schnitte ausdehnen und eine Faltenbildung vermieden werden. In einem weiteren Schritt wurden die Schnitte auf die Objektträger aufgezogen und diese mit Bleistift beschriftet. Es mussten immer ein Schnitt für die HE-Färbung, zwei Schnitte für die immunhistochemische Färbung und ein Reserveschnitt gemacht werden.

3.4. HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde nach 1-stündiger Einschmelzung des Paraffins bei 50°C im Wärmeschrank begonnen. Hierfür wurde die Objektträger in das Färbeautomat von Medite eingespannt. Anschließend wurden die Paraffinschnitte automatisiert gefärbt. Die Schnitte blieben immer 1 Minute und 30 Sekunden in jeder Färbestation und wurden anschließend 6 Sekunden lang abgetropft. Die Färbung wurde dem folgenden Protokoll durchgeführt (siehe Tabelle 14).

Färbstation Nr.	Lösung
1	Xylol
2	Xylol
3	Xylol
4	Ethanol
5	Ethanol
6	Ethanol
7	Hämatoxylin
8	Hämatoxylin
9	Hämatoxylin
10	fließendes Wasser
11	fließendes Wasser
12	Eosin und 3 Tropfen Essigsäure
13	Eosin
14	destilliertes Wasser
15	Ethanol
16	Ethanol
17	Ethanol
18	Xylol
19	Xylol
20	Xylol

TABELLE 14 FÄRBEPROTOKOLL DER HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG IM FÄRBEAUTOMAT

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate in Entellan® eingedeckt und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.5. IMMUNHISTOCHEMIE

3.5.1. GRUNDPRINZIP

Ziel der Immunhistochemie ist es, mithilfe einer Antigen-Antikörperreaktion spezifische Proteine nachzuweisen. Dabei wird die Morphologie des untersuchten Gewebes erhalten.

3.5.2. ENTPARAFFINIERUNG UND REHYDRIERUNG

Am Tag vor der Färbung wurden zur Einschmelzung des Paraffins die Schnitte in den Wärmeschrank bei 37°C über Nacht gelassen.

Daraufhin mussten die Schnitte entparaffiniert werden. Hierfür wurden sie 3-mal 15 Minuten in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in absolutem- (2-mal), 98%-, 90%- und 80% Ethanol) gegeben. Die Schnitte wurden anschließend 3-mal in destilliertem Wasser und 2-mal in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)-Puffer gespült.

3.5.3. ANTIGENDEMASKIERUNG

Die Formalin-Fixierung führt zu Verbindungen zwischen dem Formaldehyd und Aminogruppen [60]. Diese veränderte Struktur kann dazu führen, dass die Antigen-Antikörperbindung beeinträchtigt wird und die immunhistochemische Färbung nicht gelingt [60]. Aufgrund dessen muss zur adäquaten Vorbereitung der Schnitte eine Antigendemaskierung erfolgen, um die Antigene für die Antikörper wieder zugänglich zu machen [60]. Dazu werden zwei gängige Methoden angewendet: Hitze [60] („*heat-induced epitope retrieval*“ (HIER)) und proteolytische Vorbehandlung („*protease-induced epitope retrieval*“ (PIER)). In dieser Studie wurde die HIER Methode angewendet.

Demnach wurde die Antigendemaskierung in einem kochenden Wasserbad in einem Reiskocher durchgeführt. Hierfür wurde eine, mit retrieval Puffer gefüllte, gedeckelte Kunststoffküvette in ebendiesem Wasserbad auf 95°C erhitzt. Sobald die Temperatur erreicht wurde, konnten die Schnitte in den Wasserbad gegeben werden. Die Proben wurden 30 Minuten in dem Wasserbad gelassen.

3.5.4. INKUBATION DER MONOKLONALEN PRIMÄRANTIKÖRPER

Nach einer 30-minütigen Abkühlung auf unter 50°C bei Raumtemperatur wurden die Schnitte 3-mal in PBS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte in eine feuchte Färbekammer gegeben und es erfolgte die 30-minütige Inkubation mit 200 Mikroliter (μl) 3% PBS-BSA Lösung pro Schnitt. Die feuchte Kammer verhindert ein Austrocknen der Schnitte. Ohne einen weiteren Waschschrift wurde diese Lösung ausgeschüttet. Dann fand eine Inkubation mit dem primären Antikörper, der das cluster of differentiation (CD) 31 oder das PSMA bindete, eine Stunde im Brutschrank bei 37°C, statt.

3.5.5. VISUALISIERUNG

Anschließend wurden die Schnitte erneut drei Mal in PBS-Puffer gewaschen. Hier ist besondere Sorgfalt notwendig, um die ungebundenen Primärantikörper abzutragen. Damit werden unspezifische Farbreaktionen verhindert.

Zur Visualisierung der gebundenen Primärantikörper wurde das Dako REAL™ Detection System verwendet. Dieses beruht auf der indirekten Streptavidin-Biotin Methode, der labeled Streptavidin Biotin Methode (LSAB) (siehe Abbildung 7).

Bei dieser Technik wird nach der Inkubation mit dem Primärantikörper ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt. Dieser ist für den Fc-Teil des Primärantikörpers spezifisch. Danach werden die Schnitte mit an Streptavidin gebundener alkalischer Phosphatase inkubiert [60].

Das Streptavidin wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnen. Es besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin und hat somit eine große Affinität für dieses Molekül. Daraus resultiert die hohe Sensitivität des Verfahrens. Zum Schluss erfolgt die Darstellung durch Zugabe eines farblosen Chromogens. Das Chromogen ist das Substrat der alkalischen Phosphatase und wird durch dieses Enzym zu einem Farbkomplex umgewandelt [60].

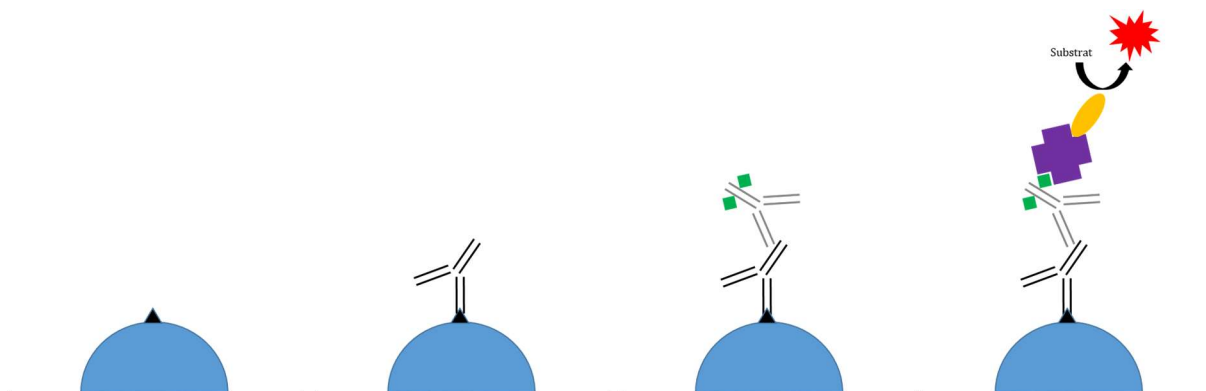


ABBILDUNG 7 DIE INDIREKTE STREPTAVIDIN-BIOTIN METHODE (LSAB: LABELED STREPTAVIDIN BIOTIN METHOD) ZUR VISUALISIERUNG DER AM ANTIGEN GEBUNDENEN PRIMÄRANTIKÖRPER



Das Dako REAL™ Detection System wurde gemäß Bedienungsanleitung bei Raumtemperatur angewendet. Dabei wurden hintereinander der biotinylierte Sekundärantikörper und die an Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase inkubiert. Die Inkubation dauerte jeweils 30 Minuten. Danach erfolgten jeweils drei Waschgänge mit PBS-Puffer.

Anschließend wurde die Chromogenlösung hergestellt. Dafür wurde in 750µl Dako REAL™ AP Substrate Buffer nacheinander 30µl aus den Chromogenflaschen eins, zwei und drei zugegeben. Die Inkubation mit der Chromogenlösung dauerte 15 Minuten. Dies löste die Farbreaktion aus. Daraufhin wurden die Schnitte drei Mal in destilliertem Wasser gespült.

3.5.6. GEGENFÄRBUNG UND DEHYDRIERUNG

Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte sieben Minuten in Hämatoxylin gegeben, danach ein Mal in destilliertem Wasser gespült. Es folgte eine weitere Spülung unter laufendem, kaltem Leitungswasser drei Minuten lang. Nach einer weiteren Spülung in destilliertem Wasser erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 80%-, 90%-, 98%- und zwei Mal in absolutem Ethanol). Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate in Entellan® eingedeckt und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.5.7. KONTROLLEN

In jedem Färbedurchgang wurden zur Überprüfung der Spezifität eine Negativkontrolle und zur Überprüfung der Sensitivität eine Positivkontrolle mitgeführt.

Zur Positivkontrolle des PSMA wurden Schnitte aus Prostatakarzinomgewebeblöcken, die zuvor mithilfe eines Pathologen identifiziert worden waren, verwendet. Um eine positive Farbreaktion auch sicher als solche identifizieren zu können, wurde dasselbe Prostatagewebe mit der PSMA-Antikörperlösung benetzt. Da die Prostata physiologisch das PSMA exprimiert [45], konnte, bei vorhandener Farbreaktion, sicher von einer erfolgreichen Färbung ausgegangen werden.

Zur Positivkontrolle des CD31 und zur Bestimmung der Verdünnung des CD31-Antikörpers, wurde bei der Etablierung des Verfahrens Tonsillengewebe verwendet.

Bei der Negativkontrolle wurde kein Primärantikörper, sondern 1% PBS/BSA Lösung auf das Gewebe gegeben. Ansonsten wurde die Färbung wie in dem Färbeprotokoll beschrieben durchgeführt (siehe 3.5.2.-3.5.6.).

Wenn sowohl die Positivkontrolle positiv, als auch die Negativkontrolle negativ war, konnte der Färbedurchgang ausgewertet werden.

Die immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden von einem Pathologen ohne Angabe der klinischen Daten der Patientinnen durchgemustert und ausgewertet. Alle Proben wurden unter einem Lichtmikroskop begutachtet.

3.5.8. MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG

3.5.8.1. AUSWERTUNG DER PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORZELLEN

Zuerst wurden die Schnitte auf die PSMA Expression in den Tumorzellen hin untersucht. Dafür wurde nach der Methode von Remmele und Stegner [76] vorgegangen, um den immunreaktiven Score (IRS) auszurechnen. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch und semiquantitativ.

Es wurde dabei ermittelt, wie viel Prozent der Zellen PSMA positiv gefärbt waren. Dafür wurde eine Punktzahl von 0 bis 4 vergeben. Anschließend wurde die Intensität der Färbung der Tumorzellen beurteilt. Diese erhielt eine Punktzahl von 0 bis 3 (siehe Tabelle 15). Der immunreaktive Score (IRS) ergibt sich aus der Multiplikation beider Werte. Dementsprechend können Werte von 0 bis 12 erreicht werden.

Anteil gefärbter Zellen		Färbeintensität	
keine	0	keine Reaktion	0
<10%	1	schwache Reaktion	1
10-50%	2	mäßige Reaktion	2
51-80%	3	starke Reaktion	3
>80%	4		

TABELLE 15 ZUSAMMENSTELLUNG DES IMMUNREAKTIVEN SCORE (IRS)

Der IRS wird anschließend nach der folgenden Tabelle interpretiert (siehe Tabelle 16).

IRS	
0-2	negativ
3-4	schwach positiv
6-8	mäßig positiv
9-12	stark positiv

TABELLE 16 INTERPRETATION DES IMMUNREAKTIVEN SCORE (IRS)

3.5.8.2. BESTIMMUNG DES MVD

Zur Bestimmung der MVD wurden die mit dem gegen CD31 gerichteten Primärantikörper gefärbten Gewebeschnitte verwendet.

Das CD31, oder platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) ist ein 130-kDa transmembranäres Glykoprotein, welches auf Monozyten, neutrophile Granulozyten und Thrombozyten zu finden ist. Es ist ein Teil der endothelialien interzellulären Verbindung und wird von allen Gefäßen exprimiert [4]. Das CD31 ist nicht auf der Oberfläche von Brustkrebszellen aufzufinden [22] [23].

Zur Darstellung von Gefäßen in der Immunhistochemie stehen mehrere Antigene zu Verfügung, wie beispielsweise dem von Willebrand-Faktor, CD34, CD105 oder das CD31 [63]. In dieser Studie wurde das Antigen CD31 ausgewählt, da es sich gezeigt hat, dass das CD31 einer der sensitivsten Marker für die Tumorneovaskulatur in Paraffinschnitten ist [63]. Es hat sich bereits zur Bestimmung des MVD in Mammakarzinomproben bewiesen [42].

Bei der Bestimmung des MVD wurde nach der Methode von Noel Weidner [99] vorgegangen. Das CD31 wird in Endothelzellverbänden exprimiert [4] und kann daher zum Aufschluss der Gesamtanzahl an Gefäßen in den Gewebeschnitten herangezogen werden.

Die Proben wurden zuerst ohne Angabe der klinischen Daten der Patientinnen bei niedriger Vergrößerungsstufe (x10) durchgemustert. Dabei wurden jene Tumoreale identifiziert, die am stärksten vaskularisiert sind. Es wurden in jedem Schnitt fünf dieser sogenannten „hot spots“ zur

weiteren Beurteilung ausgewählt. Ein Foto dieser Gebiete wurde in höherer Vergrößerung (x20) angefertigt (siehe Abbildung 8).

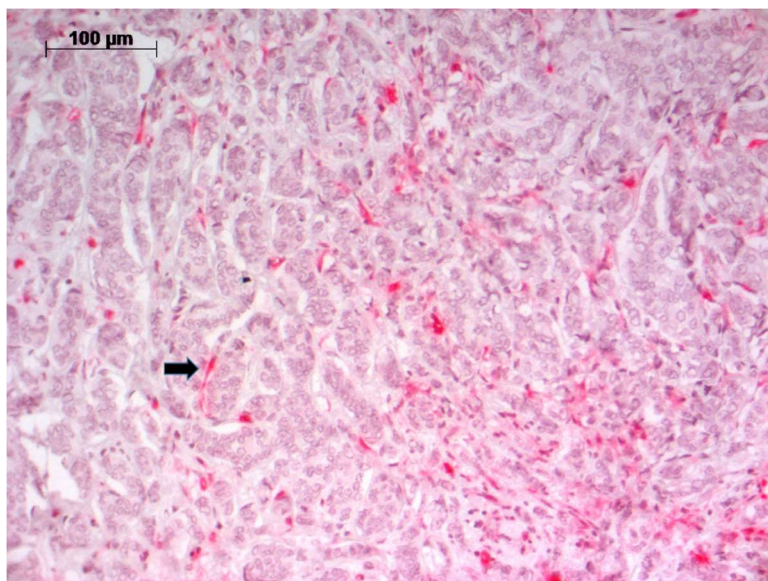


ABBILDUNG 8 CD31 FÄRBUNG EINES MAMMAKARZINOMGEWEBESCHNITTES IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Durch den Pfeil angezeigt ist ein Mikrogefäß.

Diese Fotos wurden verwendet, um den MVD zu bestimmen. Hierzu mussten alle Mikrogefäße gezählt werden. Als Mikrogefäß wurde jede CD31 positive Struktur identifiziert, die sich von anderen Strukturen abzeichnete. Auch Endothelzellverbände, die eventuell aus dem gleichen Gefäß, das sich im Gewebeschnitt windet, stammten, wurden als getrennte Mikrogefäße gezählt. Erythrozyten und größere Gefäße, die ein Lumen aufwiesen, wurden aber nicht als Mikrogefäß gewertet. Das Programm Cellsens Standard wurde verwendet, um die als Mikrogefäß eingestuftten Gefäße zu markieren und auszuzählen.

Anschließend wurde ein Mittelwert aus der Anzahl an Mikrogefäßen in jedem Foto berechnet. Dieser Wert entspricht dem MVD.

Außerdem wurde die CD31-Färbung in ihrer Intensität beurteilt. Hierfür wurde der Intensität der immunhistochemischen Färbereaktion analog zum IRS eine Punktzahl von 0 bis 3 vergeben.

3.5.8.3. DIE PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN

3.5.8.3.1. PROZENTZAHL AN PSMA EXPRIMIERENDEN TUMORMIKROGEFÄßEN

Der in 3.5.8.2. erläuterte Vorgang zur Bestimmung des MVDs wurde ebenfalls in den mit dem PSMA Antikörper gefärbten Schnitten durchgeführt. Die PSMA exprimierenden Mikrogefäße mussten hierzu identifiziert werden. Dabei wurde jede Struktur als PSMA exprimierendes Mikrogefäß gewertet, welche morphologisch einem Mikrogefäß entsprach und durch die immunhistochemische Färbung eine rote Farbe aufwies.

Da das mit der CD31-Färbung berechnete MVD die Gesamtanzahl der Mikrogefäße in den Tumorarealen berücksichtigt hatte, konnte die Anzahl der PSMA exprimierenden Tumormikrogefäße prozentual zu allen Mikrogefäßen berechnet werden. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$\begin{aligned} & \text{Prozentzahl an PSMA exprimierenden Tumorgefäße} \\ & = \left(\frac{\text{Mittelwert der Anzahl an Mikrogefäße, die PSMA exprimieren}}{MVD} \right) \times 100 \end{aligned}$$

Es wurde ebenfalls für die Prozentzahl an gefärbten Gefäßen, analog zur Bestimmung des IRS, eine Punktzahl von 0 bis 4 vergeben.

3.5.8.3.2. FÄRBEINTENSITÄT DER PSMA EXPRIMIERENDEN MIKROGEFÄßEN

Zudem wurde die Färbeintensität der PSMA exprimierenden Mikrogefäße ausgewertet. Dabei wurde analog zur Bestimmung des IRS (siehe Tabelle 15) eine Punktzahl von 0 bis 3 vergeben.

3.5.8.3.3. DER MVD IRS

Aus der Multiplikation der Punktzahl, die für den Prozentsatz an PSMA-positiven Gefäßen vergeben wurde, und der Punktzahl für die Färbeintensität der Gefäße wurde ein Score, analog zur Bestimmung des IRS (siehe Tabelle 15), ermittelt. Dieser Score wurde für der statistischen Auswertung der *MVD-IRS* genannt. Er wurde analog zum IRS für die Tumorzellen interpretiert (siehe Tabelle 16).

3.6. IMMUNFLUORESZENZ

Die Immunfluoreszenz wurde durchgeführt, damit die genaue Kolo-kalisation des CD31 und des PSMA nachgewiesen werden konnte. Hierzu wurden sechs unterschiedliche Fälle der bereits durchgeführten Immunhistochemie ausgewählt und untersucht. Dabei handelte es sich um vier Fälle (2 M0 und 2 M1), die in der immunhistochemischen Färbung eine positive und zwei Fälle (1 M0 und 1 M1), die keine positive PSMA Färbung zeigten. Die bereits vorbereiteten Paraffinschnitte wurden verwendet.

Bei den fermetastasierten Fällen wurde zusätzlich zu den Primärtumorproben auch Gewebeschnitte der Lymphknoten- und Fernmetastasen gefärbt und ausgewertet. Somit wurden zwei Lymphknotenmetastaseproben und drei Fernmetastaseproben untersucht. Bei den Fernmetastaseproben handelte es sich um zwei Gehirn- und einer Knochenmetastase. Demnach wurden insgesamt 11 Proben untersucht.

In dieser Studie wurde indirekte Immunfluoreszenz angewendet. Da eine Doppelfärbung durchgeführt wurde, ermöglichte dies die Darstellung von zwei Antigenen im gleichen Gewebe. Es wurden beide Primärantikörper auf den gleichen Schnitt gegeben. Dabei wurden die Primärantikörper in einem zweiten Inkubationsschritt durch fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper gebunden. Diese waren gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet. Da hier zwei unterschiedliche Wirtsspezies für den Primärantikörper (Maus für den PSMA Antikörper und Hase für den CD31 Antikörper) ausgewählt wurden, ist eine Visualisierung mit Sekundärantikörpern möglich, die spezifisch die Spezies des Primärantikörpers binden. Jeder Sekundärantikörper verfügte über ein spezifisches Emissionsspektrum. Anschließend wurde der fluoreszierende Farbstoff durch Licht angeregt. Die emittierte Fluoreszenz befand sich in einem bestimmten Wellenlängenbereich. Durch die Verwendung von Sperrfiltern in der entsprechenden Wellenlänge konnte das erzeugte Farbsignal getrennt voneinander visualisiert werden [60] (siehe Abbildung 9).

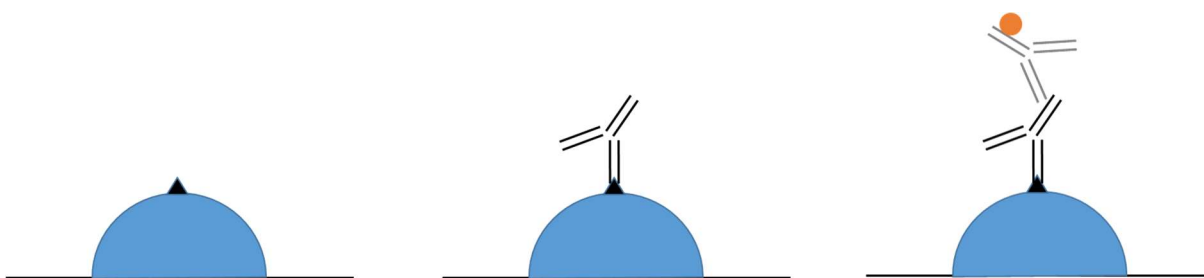
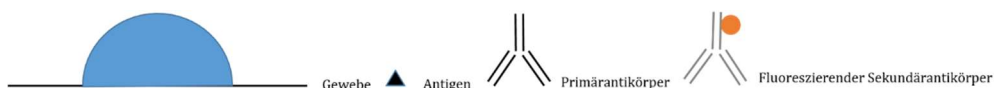


ABBILDUNG 9 GRUNDPRINZIP DER INDIREKTEN IMMUNFLUORESCENZ



3.6.1. ENTPARAFFINIERUNG UND REHYDRIERUNG:

Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe, wie in dem Abschnitt 3.5.2. geschildert.

3.6.2. ANTIGENDEMASKIERUNG

Dieser Schritt dient, wie in dem Abschnitt 3.5.3. bereits erläutert wurde, der Freilegung von Epitopen, die durch die Formalin-Fixierung verändert wurden.

Die Antigendemaskierung wurde in einem kochenden Wasserbad in einem Reiskocher wie in der Immunhistochemie durchgeführt. Hierfür wurde eine, mit retrieval Puffer gefüllte, gedeckelte Kunststoffkuvette in ebendiesem Wasserbad auf 95°C erhitzt.

Die retrieval Lösung bei der Immunfluoreszenz war Tris-EDTA Puffer. Dieser Puffer wurde gemäß den Angaben in der Tabelle 6 hergestellt und dessen pH wurde bei Anfertigung mithilfe eines pH-Meters, Salzsäure und Natriumhydroxids auf 9,0 eingestellt.

Sobald die Temperatur erreicht wurde, konnten die Schnitte in den Wasserbad gegeben werden. Die Proben wurden 30 Minuten in dem Wasserbad gekocht.

Nach einer 30-minütigen Abkühlung auf unter 50°C bei Raumtemperatur wurden die Schnitte drei Mal in PBS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte in eine feuchte Färbekammer gegeben und es erfolgte die 30-minütige Inkubation mit 200 µl 3%-PBS/BSA Lösung pro Schnitt. Ohne einen weiteren Waschschrift wurde diese Lösung ausgeschüttet. Dann wurden 200µl sowohl der PSMA, als auch der CD31 Antikörperlösung zeitgleich auf die Proben pipettiert. Die Inkubation fand über Nacht bei 6°C im Kühlschrank statt. Die Schnitte wurden anschließend drei Mal in PBS-Puffer gewaschen.

Die verwendeten Primärantikörper stammten hier aus einer anderen Wirtsspezies (Maus für die PSMA Antikörper und Hase für den CD31 Antikörper, siehe Tabellen 7 und 8).

3.6.3. VISUALISIERUNG

Alle weiteren Schritte erfolgten in einem abgedunkelten Raum bei Raumtemperatur. 200µl der ersten anti-Maus Sekundärantikörperlösung (Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse) wurde auf die Proben pipettiert und eine Stunde lang inkubiert. Nach drei Waschgängen in PBS-Puffer erfolgte die einstündige Inkubation mit der zweiten anti-Hase Sekundärantikörperlösung (Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit). Beide Sekundärantikörper absorbierten und emittierten eine unterschiedliche Wellenlänge. Dabei erhielt man für den auf den PSMA Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper ein rotes Signal und für den auf den CD31 Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper ein grünes Signal. Die Sekundärantikörper hatten ein klar unterschiedliches Emissionsmaximum (603nm für den AlexaFluor® 568 und 525nm für den AlexaFluor® 488). Anschließend wurden fünf Waschschrte in destilliertem Wasser durchgeführt.

3.6.4. DEHYDRIERUNG UND FERTIGSTELLUNG DER PRÄPARATE

Daraufhin erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 80%-, 90%-, 98%- und zwei Mal in absolutem Ethanol). Nach einer 30-minütigen Lufttrocknung wurden die Proben mit DAPI Prolong® Diamond Mountant eingedeckt. 4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein fluoreszierender Nukleinsäurefarbstoff [60]. Dadurch erhielt man ein drittes blaues Signal für die Zellkerne.

Die Auswertung erfolgte am selben Tag. Die Präparate wurden lichtgeschützt im Kühlschrank bei 6°C aufbewahrt.

3.6.5. KONTROLLEN

In jedem Färbedurchgang wurden jeweils eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Zur Positivkontrolle wurden Schnitte aus Prostatakarzinomgewebeblöcken verwendet.

Um eine positive Farbreaktion auch sicher als solche identifizieren zu können, wurde dasselbe Prostatagewebe mit der PSMA-Antikörperlösung benetzt. Da die Prostata physiologisch das PSMA exprimiert [45], konnte, bei vorhandener Farbreaktion, sicher von einer erfolgreichen Färbung ausgegangen werden (siehe Abbildung 10).

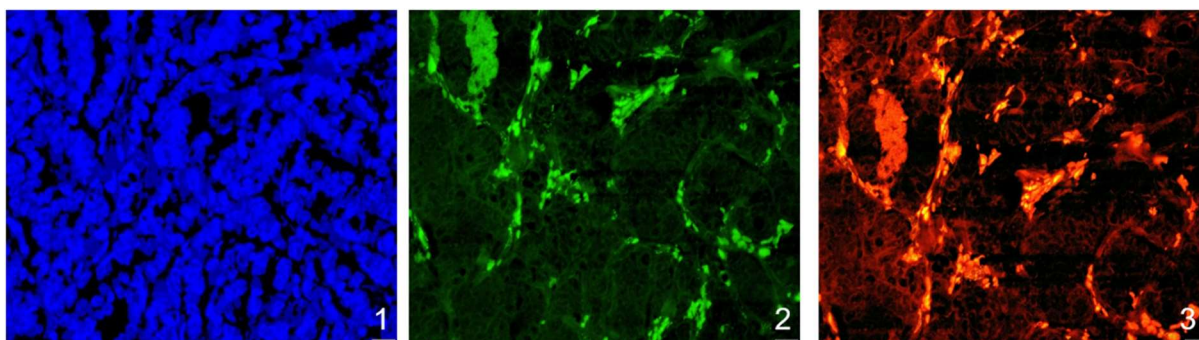


ABBILDUNG 10 IMMUNFLUORESCENZ FÄRBUNG EINER PROSTATAKARZINOMPROBE IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Das DAPI (1) dient hier der Übersicht. Bei der CD31 (2) und PSMA (3) Übersicht erkennt man ein fluoreszierendes Signal an den Tumormikrogefäßen sowohl bei der Darstellung des PSMA als auch bei der Darstellung des CD31.

Es wurde außerdem für jeden untersuchten Schnitt eine Negativkontrolle durchgeführt. Bei der Negativkontrolle fand keine Inkubation mit einem Primärantikörper statt, sondern nur die Sekundärantikörperlösung. Stattdessen wurde 1%PBS/BSA Lösung auf die Probe gegeben. Anhand dieses Schnittes konnte die Autofluoreszenz des Gewebes beurteilt werden. Dadurch konnte ein fluoreszierendes Farbsignal, welches durch Bindung des Primärantikörpers an dem Antigen entsteht, von der Autofluoreszenz des Gewebes unterschieden werden. Somit konnten unspezifische Reaktionen von jenen unterschieden werden, die auf die spezifische Antikörper-Antigen Bindung zurückzuführen waren.

3.6.6. MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG DER IMMUNFLUORESCENZ

Alle Präparate wurden in einem abgedunkelten Raum ausgewertet. Dabei konnte die PSMA Färbung mit dem UFGNA Filterwürfel, die CD31 Färbung mit dem UFBNA Filterwürfel und die DAPI Färbung mit dem U-FUNA Filterwürfel betrachtet werden.

Zuerst wurden die Präparate mit dem 20er Objektiv mit der DAPI Färbung betrachtet. Da hier die sich in den Kernen befindete DNA gefärbt wurde [60], konnten anhand der Kernstruktur die Tumoreale identifiziert werden. Das DAPI diente somit der Orientierung.

In der CD31 Färbung wurden die Gefäße dargestellt. Analog zur Bestimmung des MVDs bei der Immunhistochemie wurden drei „hot spots“ bestimmt, die eine besonders hohe Dichte an

Tumormikrogefäßen aufwiesen. Diese wurden fotografiert. Dabei wurden ebenfalls Fotos des gleichen Areals mit den PSMA und den DAPI darstellenden Sperrfiltern angefertigt. Alle Fotos wurden mit einer Belichtungszeit von 700ms und einer Verstärkung von 9dB gemacht.

Anschließend konnte in diesen Bereichen durch die PSMA Färbung kontrolliert werden, ob dasselbe Mikrogefäß ebenfalls fluoreszierend war. Durch das Einschwenken eines spezifischen Sperrfilters konnte genau dieselbe Struktur und dessen Expression für die zwei Antigene beurteilt werden. Dadurch konnte die Lokalisation des PSMA auf den CD31 positiven Gefäßen nachgewiesen werden. Unterstützend wurden die Fotos im CD31, PSMA und DAPI Filter überlagert.

3.7. STATISTISCHE METHODEN

Alle klinikopathologischen Parameter (wie das TNM Stadium oder die Hormonrezeptorexpression) sowie die Ergebnisse der Färbungen wurden anonymisiert in einer Microsoft Excel-Tabelle zusammengetragen. Falls für die Erstdiagnose, für das Auftreten eines Rezidivs oder den Todeszeitpunkt, nur das Jahr bekannt war, wurde zur Ermöglichung der statistischen Auswertung der 01. Juli des jeweiligen Jahres als Datum standardisiert ausgewählt. Wenn nur der Monat bekannt war, wurde der 01. desselben Monats übernommen.

Wenn das Vorliegen einer Fernmetastase weniger als 30 Tage nach Diagnose des Brusttumors diagnostiziert wurde, dann wurde in dieser Studie von einer primären Metastasierung ausgegangen. Dass das Staging, aus organisatorischen Gründen, zeitverzögert zur Probenentnahme und pathologischen Begutachtung des Primärtumors in der Brust stattfindet, konnte somit berücksichtigt werden.

Die Daten wurden in dem Statistikprogramm *IBM SPSS Statistik 24* übertragen. Für die folgende Statistik wurde stets ein Konfidenzintervall von $p=0,95$ (95%) gewählt. Das Signifikanzniveau lag bei 0,05, somit wurde die Nullhypothese bei $p<0,05$ abgelehnt.

Die Daten wurden mittels grafischer Darstellung mit einem Histogramm und anhand des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung überprüft. Da sowohl die grafische Darstellung als auch der Kolmogorov-Smirnov Test keine Normalverteilung bestätigen konnte, wurde auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen. Für den Vergleich von den intervallskalierten Daten, wie dem MVD, dem IRS Score oder dem MVD-IRS, wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Bei einer Stichprobengröße $n<30$ wurde die exakte 2-seitige Signifikanz, ansonsten wurde die asymptotische 2-seitige Signifikanz berücksichtigt. Bei $k>2$ unabhängige Stichproben konnte der Kruskal-Wallis Test angewendet werden. Für die qualitativen Merkmale wurden Kreuztabellen und der Chi-Quadrat Test herangezogen. Falls bei der Anwendung des Chi Quadrat Tests weniger als 20% der Zellen eine erwartete Häufigkeit <5 hatten, wurde der asymptotische 2-

seitige p-Wert berücksichtigt. Wenn 20% oder mehr der Zellen eine erwartete Häufigkeit <5 hatten, wurde der exakte Test nach Fischer und dessen exakte 2-seitige Signifikanz beachtet. Der Median wurde mit dem Minimum und Maximum ([min;max]) angegeben.

Bei den Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman verwendet.

Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Expression des PSMA in den Tumorzellen und der Tumorneovaskulatur, sowie der Expression des PSMA an verschiedenen Tumorlokalisationen (Primärtumor, Lymphknoten- und Fernmetastase) wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewendet. Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde auf den Friedman-Test zum zeitgleichen Vergleich von mehr als zwei Gruppen verzichtet.

Einen weiteren Punkt dieser Arbeit stellt die Überlebensanalyse mit Kaplan-Meier Kurven dar. Hierzu wurde die PSMA Expression mit dem rezidivfreien- und Gesamtüberleben der Patientinnen verglichen. Am 01. Februar 2017 wurde zuletzt das Datum der letzten Nachsorgeuntersuchung, beziehungsweise das Überleben der Patientinnen überprüft. Anhand der Überlebenskurven kann man abschätzen, wie lange die Patientinnen noch überlebt haben (OAS – overall survival) oder wie lange sie metastasenfrei geblieben sind (MFS – metastase free survival). Durch einen Log-rank Test konnte ein paarweiser Vergleich zwischen den einzelnen Kategorien erfolgen, um zu zeigen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebensraten, der Metastasenfreiheit und der PSMA Expression besteht.

4. ERGEBNISSE

In der hier vorliegenden Studie sollte retrospektiv untersucht werden, ob das PSMA beim Mammakarzinom und dessen Lymphknoten- sowie Fernmetastasen exprimiert wird. Dessen Ausprägung wurde sowohl auf den Tumormikrogefäßen als auch in den Tumorzellen analysiert. Außerdem wurde untersucht, ob die Expression des PSMA bei unterschiedlichen klinikopathologischen Merkmalen verschieden ist. Zudem wurde überprüft, ob dessen Expression mit einem schlechteren metastasefreien und allgemeinen Überleben assoziiert ist. Hierzu wurden immunhistochemische und Immunfluoreszenz Färbungen angefertigt. Zur Quantifizierung des PSMA in den Tumorzellen und in den Tumormikrogefäßen wurde nach dem immunreaktiven Score von Remmele und Stegner vorgegangen [76]. Die Anzahl an PSMA-exprimierenden Tumormikrogefäßen wurde im Verhältnis zur allgemeinen Gefäßdichte (MVD) berechnet. Außerdem wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression des PSMA in den Tumorzellen und der Tumorneovaskulatur, sowie der Expression des PSMA an verschiedenen Tumorlokalisationen (Primärtumor, Lymphknoten- und Fernmetastase) gibt. Zur Bestätigung der Lokalisation des PSMA auf den Tumormikrogefäßen wurden die Immunfluoreszenz Färbungen herangezogen.

4.1. PATIENTINNENKOLLEKTIV UND TUMORMERKMALE

Nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden 72 Patientinnen des Universitätsklinikums Homburg in die Studie eingeschlossen. Bei 70 (97,2%) dieser Patientinnen konnte der Primärtumor immunhistochemisch untersucht werden. Der IRS konnte bei all diesen Patientinnen und der MVD bei 67 (93,1%) Patientinnen gebildet werden. Von den 35 Patientinnen (48,6%), die Lymphknotenmetastasen hatten, konnten der IRS in 18 Fällen (51,4% der Lymphknotenpositiven, 25% aller Patientinnen) und der MVD ebenfalls in 18 Fällen (51,4% der Lymphknotenpositiven, 25% aller Patientinnen) festgelegt werden. Bei den 22 Patientinnen mit Fernmetastasen konnten insgesamt 12 Gewebeproben (54,4% der fernmetastasierten, 16,6% aller Patientinnen) der Fernmetastasen gefärbt werden. Es wurden 6 (50%) Knochen-, 5 (41,7%) Gehirn- und 1 (8,3%) Lungenmetastase untersucht. Bei 9 dieser Proben (40,9% der fernmetastasierten, 12,5% aller Patientinnen) wurde der MVD erhoben. Davon waren 3 (33,3%) Knochen-, 5 (55,6%) Gehirn- sowie 1 (11,1%) eine Lungenmetastase. Bei allen Proben, bei denen der MVD erhoben werden konnte wurde ebenfalls der MVD-IRS bestimmt. Somit wurde bei insgesamt 100 Proben der IRS und bei 94 dieser Proben der MVD und der MVD-IRS bestimmt.

Zudem wurde gesundes Brustdrüsengewebe immunhistochemisch gefärbt und auf eine PSMA Expression in den Zellen sowie in den Gefäßen hin untersucht. Hierzu wurde nicht-bösartig

verändertes Gewebe des Patientinnenkollektivs verwendet. 40 Proben von 55,6% aller Patientinnen konnten untersucht werden.

In den nicht getesteten Fällen war das Material nicht im pathologischen Institut des Universitätsklinikum Homburg verfügbar, da entweder keine Gewebeprobe entnommen wurde oder die initiale Biopsie und Operation außerhalb durchgeführt wurden. In einigen Fällen war die immunhistochemische Untersuchung teils qualitativ ungeeignet, teils quantitativ unzureichend.

In dem folgenden Abschnitt wurden die epidemiologischen Daten sowie einige Merkmale des Patientinnenkollektivs tabellarisch und grafisch dargestellt.

4.1.1. ALTERSVERTEILUNG

Bei der Erstdiagnose lag das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs (n=72) bei 60,5 Jahren mit einem Median von 60,7 Jahren. Die jüngste Patientin war bei Diagnose des Primärtumors 39,9 und die älteste Patientin 86,4 Jahre alt.

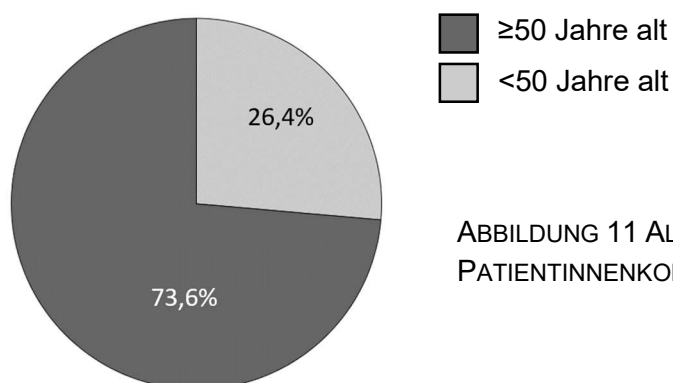


ABBILDUNG 11 ALTERSVERTEILUNG DES PATIENTINNENKOLLEKTIVS

53 (73,6%) Patientinnen waren bei Erstdiagnose über 50 Jahre alt und 19 (26,4%) Patientinnen unter 50 Jahre alt (siehe Abbildung 11).

4.1.2. MENOPAUSENSTATUS

18 (25%) Patientinnen waren prämenopausal und 54 (75%) postmenopausal (siehe Tabelle 17).

Menopausenstatus	Anzahl (%)
Prämenopausal	18 (25%)
Postmenopausal	54 (75%)

TABELLE 17 HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DES MENOPAUSENSTATUS

4.1.3. FERNMETASTASIERUNG

6 (27,3%) der fernmetastasierten Patientinnen hatten Fernmetastasen an mehreren Lokalisationen, 16 (72,7%) an einem Ort. 9 (40,9%) Patientinnen wiesen Knochen-, 11 (50%) Leber-, 5 (22,7%) Lungen- und 6 (27,3%) Gehirnmastasen auf.

22 (30,6%) der untersuchten Mammakarzinome hatten nachgewiesene Fernmetastasen gebildet (siehe Tabelle 18) und 8 (36,4%) dieser Patientinnen waren primär metastasiert.

Metastasierung	Anzahl (%)
M0	50 (69,4%)
M1	22 (30,6%)

TABELLE 18 HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER METASTASIERUNG

4.2. TUMORMERKMALE UND –CHARAKTERISTIKEN

In der Tabelle 19 wurden einige Merkmale des Mammakarzinoms des Patientinnenkollektivs aufgelistet und deren Häufigkeit tabellarisch dargestellt.

Merkmal	Ausprägung	Anzahl (%)
T-Stadium	T1	36 (50,7%)
	T2	29 (40,8)
	T3	3 (4,2%)
	T4	3 (4,2%)
	unbekannt	1 (1,4%)
N-Stadium	N0	36 (50,0%)
	N+	35 (48,6%)
	NX	1 (1,4%)
Grading	G1	7 (9,7%)
	G2	49 (68,1%)
	G3	15 (20,8%)
	unbekannt	1 (1,4%)
Histologie	invasiv duktal	54 (75%)
	andere ^a	18 (25%)
Östrogenrezeptor	positiv	60 (83,3%)
	negativ	11 (15,3%)
	unbekannt	1 (1,4%)
Progesteronrezeptor	positiv	22 (30,6%)
	negativ	49 (68,1%)
	unbekannt	1 (1,4%)
Her2Neu	positiv	9 (12,7%)
	negativ	62 (87,3%)
	unbekannt	1 (1,4%)
Triple negativ	Triple negativ	9 (12,5%)
	nicht triple negativ	62 (86,1%)
	unbekannt	1 (1,4%)
Ki 67	<10%	15 (22,7%)
	10-14%	24 (36,4%)
	>14%	27 (40,9%)
	unbekannt	6 (8,3%)

TABELLE 19 TUMORMERKMALE- UND CHARAKTERISTIKEN

^aandere (n=18): invasiv lobulär (n=12), invasiv duktolobulär (n=2), invasiv muzinös (n=2), invasiv tubulär (n=1)

4.3. MEDIANES ÜBERLEBEN UND REZIDIVFREIES ÜBERLEBEN

Insgesamt waren bei der letzten Erhebung der Patientendaten 15 (20,8%) der Patientinnen verstorben. Dabei wurde nicht überprüft was die Todesursache gewesen ist und ob das Mammakarzinom ursächlich gewesen ist. Im Durchschnitt betrug die Zeit von der Diagnosestellung bis zum Tod $56,2 \pm 30,9$ Monate.

Bei 22 (30,6%) Patientinnen kam es während der Beobachtungszeit zu einem Progress im Sinne eines lokoregionären Rezidivs oder dem Auftreten einer Fernmetastasierung. 3 (4,2%) Patientinnen hatten ein lokoregionäres Rezidiv. Im Durchschnitt betrug die Zeit von der Diagnosestellung bis zum Rezidiv $108 \pm 52,43$ Monate, der Median lag bei 85 Monaten. All diese Patientinnen hatten zum Zeitpunkt des Rezidivs bereits Fernmetastasen. Die durchschnittliche Dauer bis zum Auftreten einer Fernmetastasierung betrug $33 \pm 40,9$ Monate, der Median lag bei 27 Monaten.

4.4. ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN

Die PSMA Färbung hatte in der Immunhistochemie eine zytoplasmatische Reaktion an den Tumorzellen. Auf den Endothelzellen war eine membranöse Färbung mit oder ohne zytoplasmatischer Reaktion zu sehen. In den meisten Fällen war die Färbung homogen. Falls die Färbung jedoch ein heterogenes Färbemuster hatte, wurde die am meisten vetretene Ausprägung berücksichtigt.

4.4.1. DIE PSMA FÄRBUNG

4.4.1.1. PRIMÄRTUMOR

4.4.1.1.1. PSMA-POSITIVE UND NEGATIVE FÄLLE

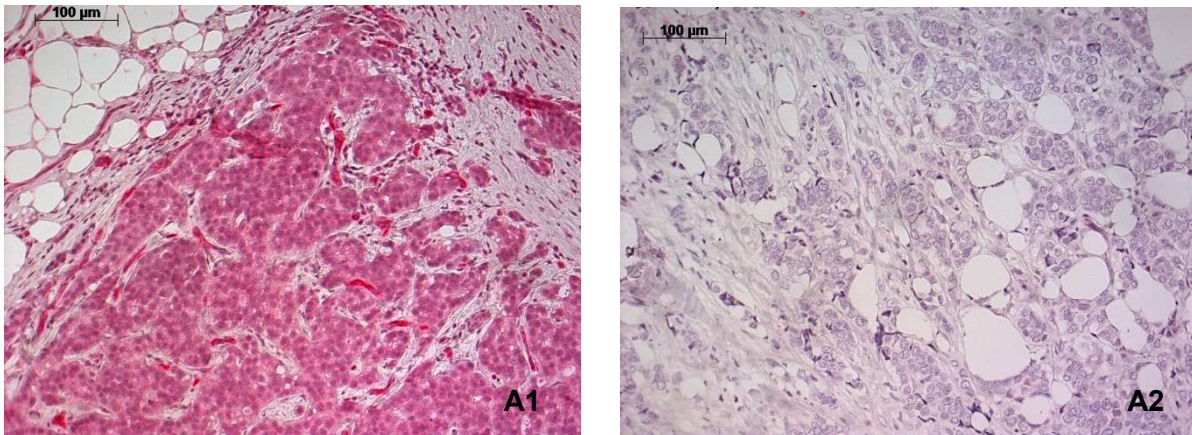


ABBILDUNG 12 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG PRIMÄRTUMORPRÄPARATE MIT DEM PSMA ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG - GEGENÜBERSTELLUNG VON PSMA-POSITIVEN UND NEGATIVEN TUMORZELLEN

(A1): In diesem Präparat erkennt man eine positive Farbreaktion auf den PSMA-Antikörper sowohl an den Tumorzellen als auch an den Gefäßen. Dieses Präparat hat bei der Auswertung für die Intensität der Tumorzellen 2 Punkte erhalten. Insgesamt hatte dieses Präparat einen IRS von 8 Punkten. Den Gefäßen wurden für dessen Färbeintensität 3 Punkte zugeteilt.

(A2): Dieses Präparat hat sowohl an den Tumorzellen als auch an den Gefäßen keine Färbereaktion auf den PSMA-Antikörper gezeigt. Somit hat es einen IRS und MVD Score von 0 erhalten.

4.4.1.1.2. GEGENÜBERSTELLUNG DER CD31 UND PSMA FÄRBUNG

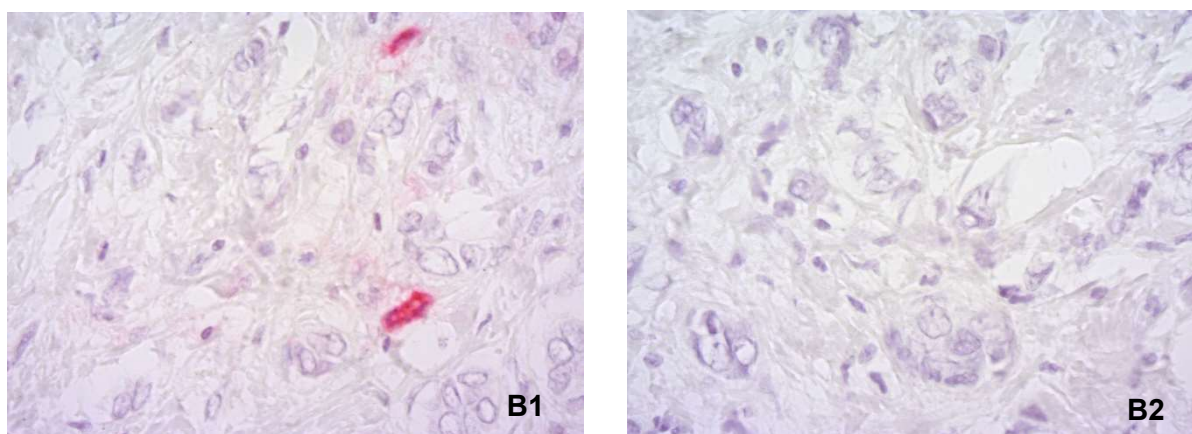


ABBILDUNG 13 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG PRIMÄRTUMORPRÄPARATE IN 40-FACHER VERGRÖßERUNG – GEGENÜBERSTELLUNG VON DER CD31 (B1) UND PSMA (B2) FÄRBUNG BEI PSMA NEGATIVEN GEFÄßEN

Bei der Gegenüberstellung der CD31 (**B1**) und PSMA (**B2**) Färbung desselben Gewebeschnitts ist ersichtlich, dass in diesem Fall die Tumormikrogefäße, die in der CD31 Färbung dargestellt wurden, in der PSMA Färbung nicht immunreaktiv sind. Dieses Mammakarzinom exprimierte kein PSMA in den Tumormikrogefäßen. Außerdem sind die Tumorzellen in diesem Präparat ebenfalls PSMA-negativ.

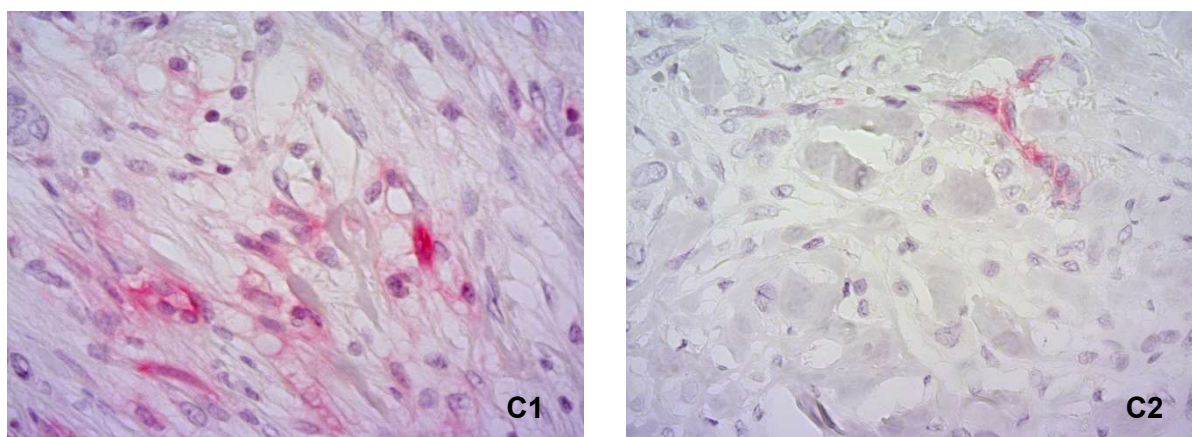


ABBILDUNG 14 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG PRIMÄRTUMORPRÄPARATE IN 40-FACHER VERGRÖßERUNG – GEGENÜBERSTELLUNG VON DER CD31 (C1) UND PSMA (C2) FÄRBUNG BEI PSMA POSITIVEN GEFÄßEN

Bei der Gegenüberstellung der CD31 (**C1**) und PSMA (**C2**) Färbung desselben Gewebeschnitts ist ersichtlich, dass in diesem Fall die Tumormikrogefäße, die in der CD31 Färbung dargestellt wurden, in der PSMA Färbung immunreaktiv sind. Den Gefäßen wurden in diesem Beispiel für deren Färbeintensität in der PSMA Färbung 2 Punkte zugeteilt. Die Tumorzellen hingegen sind in diesem Beispiel PSMA-negativ.

4.4.1.2. LYMPHKNOTENMETASTASEN

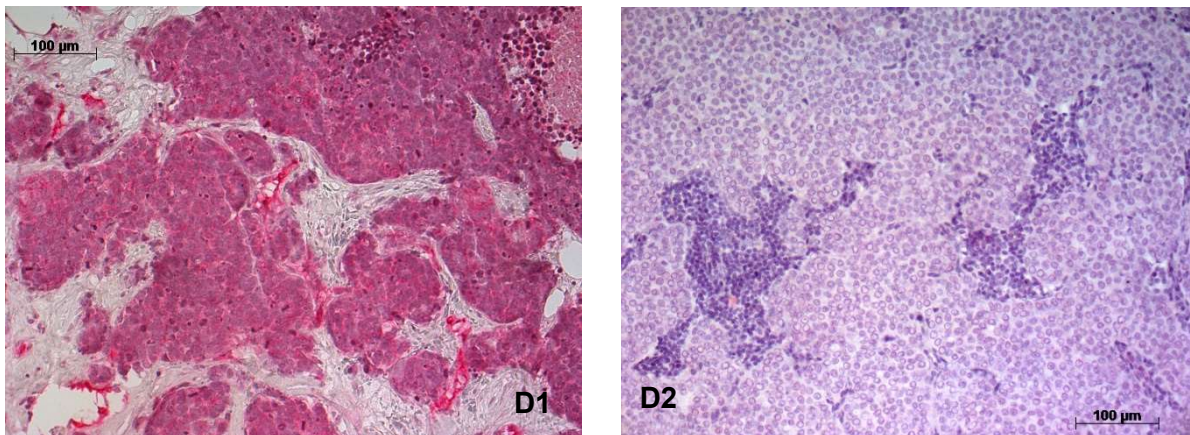


ABBILDUNG 15 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG LYMPHKNOTENMETASTASEPRÄPARATE MIT DEM PSMA ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG - GEGENÜBERSTELLUNG VON PSMA-POSITIVEN UND NEGATIVEN ZELLEN

(D1): In diesem Präparat erkennt man eine positive Farbreaktion auf den PSMA-Antikörper sowohl an den Tumorzellen, als auch an den Gefäßen. Die Tumorzellen haben für deren Farbeintensität 3 Punkte erhalten. Insgesamt hatte dieses Präparat einen IRS von 8 Punkten. Den Gefäßen wurden für deren Farbeintensität 3 Punkte zugeteilt.

(D2): Dieses Präparat hat sowohl an den Tumorzellen als auch an den Gefäßen keine Farbreaktion auf den PSMA-Antikörper gezeigt. Somit hat es einen IRS und MVD von 0 erhalten.

4.4.1.3. FERNMETASTASEN

4.4.1.3.1. LUNGENMETASTASE

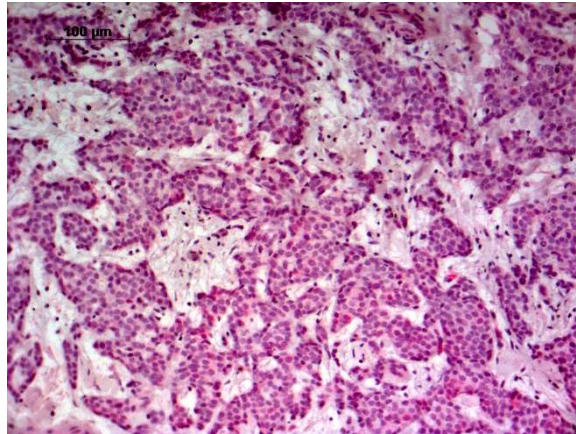


ABBILDUNG 16 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES LUNGENMETASTASEPRÄPARATES MIT DEM PSMA ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Diese Abbildung zeigt die immunhistochemische Färbung eines Lungenmetastasepräparates mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung. Die Tumorzellen haben für deren Färbeintensität 0 Punkte erhalten. Somit war der IRS in diesem Fall negativ und betrug ebenfalls 0 Punkte. Den Gefäßen hingegen, wurden 3 Punkte für die Färbeintensität zugeteilt.

4.4.1.3.2. KNOCHENMETASTASE

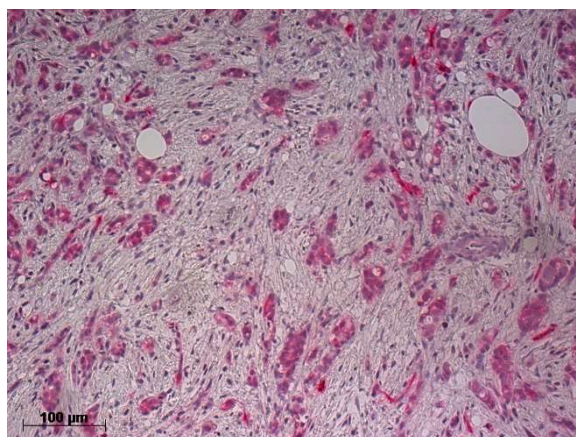


ABBILDUNG 17 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES KNOCHENMETASTASEPRÄPARATS MIT DEM PSMA ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Diese Abbildung zeigt die immunhistochemische Färbung eines Knochenmetastasepräparates mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung. 80% der Tumorzellen waren immunreaktiv

und erhielten 2 Punkte für deren Färbeintensität. Somit hatte dieses Präparat insgesamt einen IRS von 8 Punkten. Den Gefäßen wurden 3 Punkte für deren Färbeintensität zugeteilt.

4.4.1.3.3. GEHIRNMETASTASE

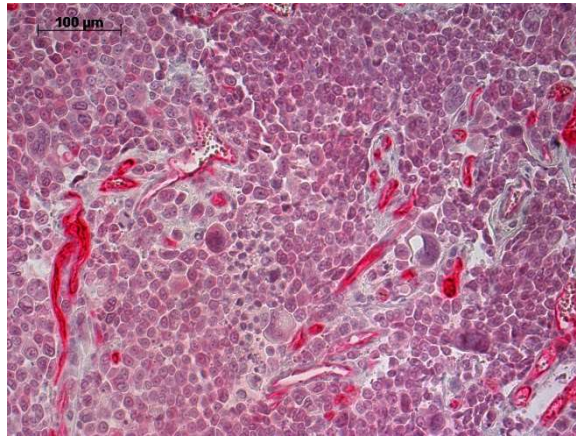


ABBILDUNG 18 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES GEHIRNMETASTASEPRÄPARATS MIT DEM PSMA ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Diese Abbildung zeigt die immunhistochemische Färbung eines Gehirnmastasepräparats mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung. 50% der Tumorzellen waren immunreaktiv und erhielten 2 Punkte für deren Färbeintensität. Somit hatte dieses Präparat insgesamt einen IRS von 4 Punkten. Den Gefäßen wurden 3 Punkte für deren Färbeintensität zugeteilt.

4.4.2. DIE CD31 FÄRBUNG

Die Färbung des CD31 ermöglichte den Nachweis der Gefäße. Bei jedem untersuchten Gewebeschnitt wurde ein zusätzlicher Schnitt mit dem CD31-Primärantikörper benetzt. Der Intensität der immunhistochemischen Farbreaktion auf das CD31 wurde eine Punktzahl von 0 bis 3 vergeben. Für Beispiele siehe Abbildung 19 und 20.

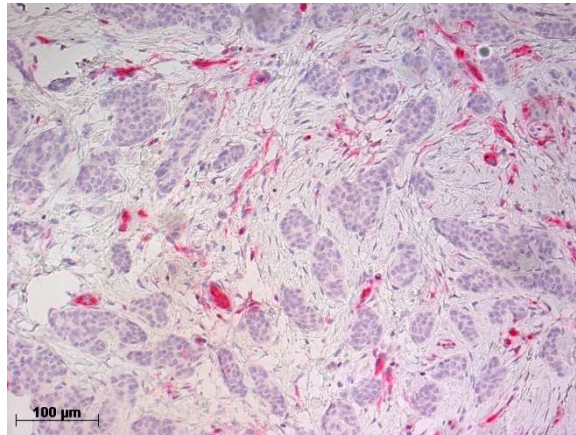


ABBILDUNG 19 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES PRIMÄRTUMORPRÄPARATES MIT DEM CD31 ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Diese Abbildung zeigt die Anfärbung der Gefäße mit dem CD31 Antikörper. Den Gefäßen wurden in diesem Beispiel für deren Färbeintensität 3 Punkte zugeteilt.



ABBILDUNG 20 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG EINES LYMPHKNOTENMETASTASEPRÄPARATES MIT DEM CD31 ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Diese Abbildung zeigt die Anfärbung aller Gefäße mit dem CD31 Antikörper. Den Gefäßen wurden in diesem Beispiel eine Färbeintensität von 3 Punkten vergeben.

Alle gefärbten Gewebeschnitte zeigten eine positive Färbereaktion auf das CD31. Dabei hatten 63 (90%) der Primärtumorpräparate (n=70) eine starke und 7 (10%) eine mäßige Farbreaktion auf das CD31. Alle (100%) Lymphknoten- (n=18) und Fernmetastasen (n=12) hatten eine starke Farbreaktion auf den CD31-Antikörper (3 Punkte) (siehe Tabelle 20).

Färbe- intensität	Gewebe		
	Primärtumor n=70	Lymphknotenmetastase n=18	Fernmetastase n=12
keine Reaktion (0 Punkte)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
schwache Reaktion (1 Punkt)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
mäßige Reaktion (2 Punkte)	7 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
starke Reaktion (3 Punkte)	63 (90%)	18 (100%)	12 (100%)

TABELLE 20 INTENSITÄT DER GEFÄßE IN DER CD31-FÄRBUNG

4.4.3. DAS GESUNDE BRUSTDRÜSENGEWEBE – KONTROLLE

In dieser Studie wurden 40 Proben gesunden Brustdrüsengewebes immunhistochemisch gefärbt.

In der PSMA-Färbung wurde überprüft, ob die Zellen des gesunden Brustdrüsengewebes eine positive oder negative immunhistochemische Reaktion hatten.

In 25 (62,5%) Fällen wurde das PSMA in den gesunden Brustdrüsenzellen exprimiert. 15 (37,5%) Proben waren PSMA negativ (siehe Abbildung 21).

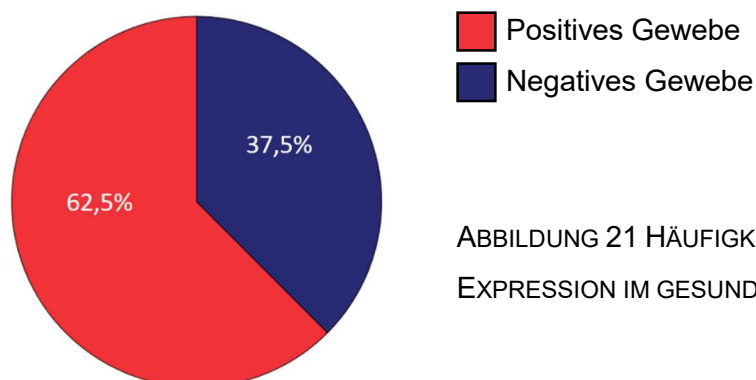


ABBILDUNG 21 HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER PSMA EXPRESSION IM GESUNDEN BRUSTDRÜSENGEWEBE

In den folgenden Abbildungen erkennt man keine positive immunhistochemische Reaktion auf den PSMA Antikörper. Die Zellen des gesunden Brustdrüsengewebes sind hier PSMA-negativ.

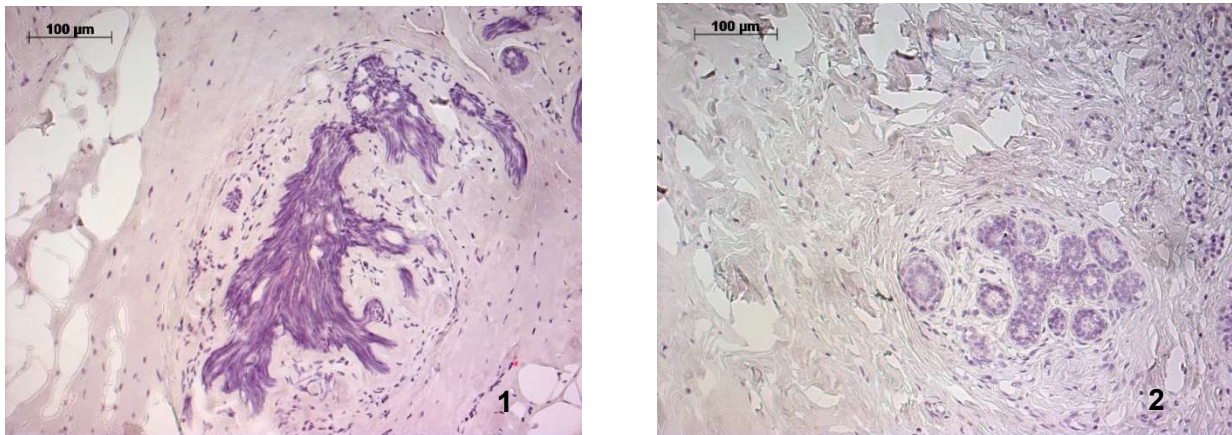


ABBILDUNG 22 (1) UND (2): IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES GESUNDEN BRUSTDRÜSENGEWEBES MIT DEM PSMA-ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG – PSMA-NEGATIVE ZELLEN

In der folgenden Abbildung erkennt man eine positive immunhistochemische Reaktion in den Zellen des gesunden Brustdrüsengewebes auf den PSMA Antikörper. Die Zellen sind hier PSMA-positiv.

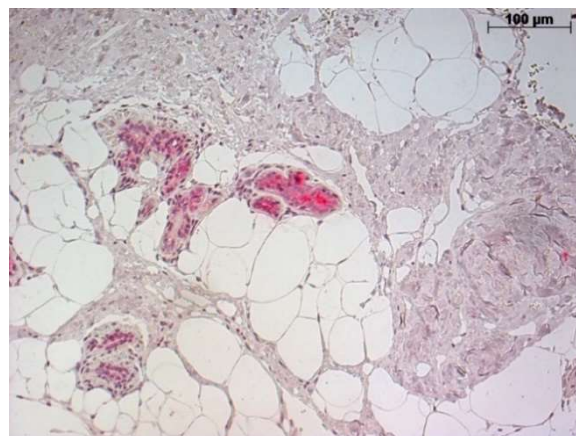


ABBILDUNG 23 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES GESUNDEN BRUSTDRÜSENGEWEBES MIT DEM PSMA-ANTIKÖRPER IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG - PSMA-POSITIVE ZELLEN

In den Gefäßen zeigte sich in fast allen Fällen keine positive Färbereaktion für das PSMA. In einem einzigen Fall waren die Gefäße schwach positiv.

Die CD31-Färbung zeigte in allen Fällen eine immunhistochemische Farbreaktion an den Gefäßen.

4.4.4. ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN

4.4.4.1. DER IRS DER TUMORZELLEN IN DER PSMA-FÄRBUNG

Um die Expression des PSMA in den Tumorzellen beurteilen zu können, wurde sowohl die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung als auch die Prozentzahl gefärbter Zellen bestimmt. Aus diesen beiden Parametern ergibt sich der IRS.

Der IRS wird nach Remmele und Stegner in einer negativen und einer schwach, mäßig oder starken Färbereaktion eingeteilt.

Keine der gefärbten Gewebeproben hatte eine stark positive Färbereaktion für das PSMA in den Tumorzellen (IRS 9-12). In den untersuchten Primärtumorgewebeproben (n=70) hatten 20 (28,6%) eine negative Färbereaktion für das PSMA (IRS 0-2). 25 (35,7%) Proben hingegen, zeigten jeweils eine schwache (IRS 3-4) und mäßige (IRS 6-8) Färbereaktion. Jeweils 7 (38,9%) der Lymphknotenmetastasen (n=18) hatten eine negative und schwach positive Färbereaktion. 4 (22,2%) der Proben waren mäßig positiv. 3 (25,0%) Fernmetastaseproben (n=12) waren negativ, hingegen zeigten sich 4 (33,3%) schwach und 5 (41,7%) mäßig positiv (siehe Tabelle 21). Der Median des IRS der Primärtumorproben lag bei 4 [0;8], bei den Lymphknotenmetastaseproben bei 4 [0;9] und bei den Fernmetastaseproben bei 6 [2;12].

Gewebe	Primärtumor n=70	Lymphknotenmetastase n=18	Fernmetastase n=12
negativ (IRS 0-2)	20 (28,6%)	7 (38,9%)	3 (25,0%)
schwach positiv (IRS 3-4)	25 (35,7%)	7 (38,9%)	4 (33,3%)
mäßig positiv (IRS 6-8)	25 (35,7%)	4 (22,2%)	5 (41,7%)
stark positiv (IRS 9-12)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

TABELLE 21 PSMA EXPRESSION DER TUMORZELLEN (IRS) IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEARTEN

Eine (16,7%) Knochenmetastase (n=6) war negativ, 2 (33,3%) schwach und 3 (50,0%) mäßig positiv. Der Median lag bei 4,5 [0;8]. Von den Gehirnetastasen (n=5) war eine (20,0%) negativ, 2 (40,0%) waren schwach und 2 (40,0%) mäßig positiv. Der Median lag bei 4 [2;8]. Die untersuchte Lungenmetastase (n=1) erhielt einen negativen IRS Score (siehe Tabelle 22).

Gewebe	Knochenmetastase n=6	Gehirnetastase n=5	Lungenmetastase n=1
IRS			
negativ (IRS 0-2)	1 (16,7%)	1 (20,0%)	1 (100%)
schwach positiv (IRS 3-4)	2 (33,3%)	2 (40,0%)	0 (0%)
mäßig positiv (IRS 6-8)	3 (50,0%)	2 (40,0%)	0 (0%)
stark positiv (IRS 9-12)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

TABELLE 22 PSMA EXPRESSION DER TUMORZELLEN (IRS) IN DEN FERNMETASTASEN

Somit waren insgesamt 50 (71,4%) der Primärtumor-, 11 (61,1%) der Lymphknotenmetastase- und 9 (75%) der Fernmetastaseproben positiv (schwach oder mäßig positiv). Demnach exprimierten 70 (70%) der 100 untersuchten Paraffinschnitte das PSMA in den Tumorzellen.

4.4.4.2. DIE PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN

4.4.4.2.1. DIE FÄRBEINTENSITÄT DER TUMORMIKROGEFÄßE FÜR DAS PSMA

Die Auswertung der PSMA Expression an den Tumormikrogefäßen erfolgte in mehreren Schritten: zuerst wurde die Färbeintensität dieser Gefäße auf den PSMA-Antikörper betrachtet. Dieser Intensität wurde eine Punktzahl zwischen 0 und 3 vergeben.

Im Primärtumor hatten 25 (35,7%) Gewebeproben (n=70) keine Farbreaktion an den Gefäßen bei der PSMA-Färbung. 45 (64,3%) Proben hingegen, zeigten eine positive Farbreaktion. Davon wurden 6 (8,6%) Proben 1 Punkt, 22 (31,4%) Proben 2 Punkte und 17 (24,3%) Proben 3 Punkte vergeben (siehe Tabelle 23).

In den Lymphknotenmetastasen (n=18) zeigten 3 (16,7%) Gewebeproben keine Farbreaktion an den Gefäßen bei der PSMA-Färbung. 15 (83,3%) der Proben hingegen hatten eine positive Farbreaktion. Davon wurden 3 (16,7%) Proben 1 Punkt, 7 (38,9%) Proben 2 Punkte und 5 (27,8%) Proben 3 Punkte vergeben (siehe Tabelle 23).

Keine der untersuchten Fernmetastaseproben (n=12) hatte keine Farbreaktion auf den PSMA-Antikörper an den Tumormikrogefäßen. 3 (25%) der Proben erhielten 1 Punkt für deren Färbeintensität, 2 (16,7%) 2 Punkte und 7 (58,3%) 3 Punkte (siehe Tabelle 23).

Gewebe Färbe- intensität	Primärtumor n=70	Lymphknotenmetastase n=18	Fernmetastase n=12
negativ 0 Punkte	25 (35,7%)	3 (16,7%)	0 (0%)
schwach positiv 1 Punkt	6 (31,4%)	3 (16,7%)	3 (25%)
mäßig positiv 2 Punkte	22 (31,4%)	7 (38,9%)	2 (16,7%)
stark positiv 3 Punkte	5 (27,8%)	5 (27,8%)	7 (58,7%)

TABELLE 23 PSMA EXPRESSION AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN DER UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEARTEN - FÄRBEINTENSITÄT

Von den Knochenmetastasen hatten 3 (50%) eine schwache Färbereaktion (1 Punkt) in den Gefäßen, 1 (16,7%) eine mäßige (2 Punkte) und 2 (33,3%) eine starke Reaktion (3 Punkte). Allen Gehirnmetastasen (n=5) wurden 3 Punkte vergeben. Der untersuchten Lungenmetastase (n=1) wurden 2 Punkte vergeben (siehe Tabelle 24).

Gewebe Färbe- intensität	Knochenmetastase n=6	Gehirnmetastase n=5	Lungenmetastase n=1
negativ 0 Punkte	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
schwach positiv 1 Punkt	3 (50,0%)	0 (0%)	0 (0%)
mäßig positiv 2 Punkte	1 (16,7%)	0 (0%)	1 (100%)
stark positiv 3 Punkte	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)

TABELLE 24 PSMA EXPRESSION AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN DER UNTERSCHIEDLICHEN FERNMETASTASEN - FÄRBEINTENSITÄT

4.4.4.2.2. DER PROZENTSATZ AN PSMA-POSITIVEN TUMORMIKROGEFÄßEN

Der Prozentsatz an PSMA-positiven Tumormikrogefäßen wurde im Verhältnis zur gesamten Tumormikrogefäßanzahl berechnet. Die Tabelle 25 listet den Mittelwert, die Standardabweichung sowie den Median des Prozentsatzes an PSMA-positiven Tumormikrogefäßen in den unterschiedlichen untersuchten Gewebearten auf.

Gewebe	Primärtumor n=67	Lymphknotenmetastase n=18	Fernmetastase n=9
Mittelwert ±	17,2 ± 23,9	21,5 ± 20,2	59,2 ± 43,9
Standardabweichung			
Median	9,0	15,5	32,0

TABELLE 25 STREUMAßE DES MVD

4.4.4.2.3. DER MVD IRS

Um sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl an PSMA-positiven Tumormikrogefäßen berücksichtigen zu können, wurde analog zum IRS für die Tumorzellen auch für die Gefäße ein IRS erstellt, den MVD-IRS. Dieser wurde, wie der IRS für die Tumorzellen, anhand der Aufstellung von Remmele und Stegner erhoben und interpretiert [76].

Von den Primärtumorgewebeschnitten (n=67) erhielten 36 (53,7%) Proben einen negativen MVD-IRS Score (0-2). 31 (46,3%) Proben hatten einen positiven Score (3-12). Davon waren 14 (20,9%) schwach (IRS 3-4), 13 (19,4%) mäßig (IRS 6-8) und 4 (6,0%) stark (IRS 9-12) positiv. 6 (33,3%) Lymphknotenmetastasen (n=18) waren negativ und 12 (66,7%) positiv. Davon erhielten 7 (38,9%) einen schwach positiven, 4 (22,2%) einen mäßig positiven und 1 (5,6%) einen stark positiven Score. Eine einzige (11,1%) Fernmetastase (n=9) nahm einen negativen MVD-IRS Score an. Die restlichen 9 (88,9%) Fernmetastaseproben waren positiv. Davon waren 2 (22,2%) schwach, 2 (22,2%) mäßig und 4 (44,4%) stark positiv (siehe Tabelle 26). Der Median des MVD-IRS der Primärtumorproben betrug 1,5 [0;6], der Lymphknotenmetastaseproben 5 [4;9] und der Fernmetastaseproben 5 [2;12].

Gewebe IRS	Primärtumor n=67	Lymphknotenmetastase n=18	Fernmetastase n=9
negativ (IRS 0-2)	36 (53,7%)	6 (33,3%)	1 (11,1%)
schwach positiv (IRS 3-4)	14 (20,9%)	7 (38,9%)	2 (22,2%)
mäßig positiv (IRS 6-8)	13 (19,4%)	4 (22,2%)	2 (22,2%)
stark positiv (IRS 9-12)	4 (6,0%)	1 (5,6%)	4 (44,4%)

TABELLE 26 PSMA EXPRESSION AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN DER UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEARTEN – MVD-IRS

Somit hatten insgesamt 31 (46,2%) der Primärtumor-, 12 (66,7%) der Lymphknoten- und 8 (88,9%) der Fernmetastaseproben einen positiven IRS (schwach, mäßig oder stark positiv) in den Tumormikrogefäßen. Demnach waren insgesamt 51 (54,3%) aller 94 Proben, bei denen der MVD-IRS bestimmt wurde, positiv. 9 (9,6%) dieser Proben waren stark positiv.

Eine der untersuchten Knochenmetastasen (n=3) hatte einen negativen MVD-IRS (0-2), die restlichen einen positiven MVD-IRS (3-12). Davon war eine schwach positiv (3-4) und die andere mäßig positiv (6-8). Der Median des MVD-IRS bei den Knochenmetastasen lag bei 4 [2;6]. Keine

der Gehirnmetastasen (n=5) hatte einen negativen MVD-IRS. Eine war mäßig positiv (6-8) und 4 stark positiv (9-12). Der Median des MVD-IRS der untersuchten Gehirnmetastasen betrug 12 [6;12]. Die gefärbte Lungenmetastase (n=1) hatte einen schwach positiven MVD-IRS.

4.4.4.3. DIE EXPRESSION DES PSMA AN DEN TUMORZELLEN UND AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN IN DEN PRIMÄRTUMORPROBEN

In der hier vorliegenden Studie wurde außerdem untersucht, ob die Gefäße und die Tumorzellen derselben Probe PSMA-positiv waren.

Dafür wurde die Expression des PSMA im Primärtumor sowohl für den IRS, als auch für den MVD-IRS, in 2 Gruppen eingeteilt:

- (1) Negativ: 0-2
- (2) Positiv: 3-12

Daraufhin wurde bestimmt, ob nur die Tumorzellen oder auch die Tumormikrogefäße PSMA-positiv sind, bei n=67 gepaarten Fällen. Hierfür wurden die Proben in unterschiedliche Gruppen eingeteilt:

(+/+): beide sind positiv (Tumorzellen und Tumormikrogefäße)

(+): nur eines des Merkmale ist positiv (Tumorzellen oder Gefäße)

- **(+/-)**: die Tumorzellen sind positiv und die Tumormikrogefäße sind negativ

- **(-/+)**: die Tumorzellen sind negativ und die Tumormikrogefäße sind positiv

(-/-): beide sind negativ (Tumorzellen und Tumormikrogefäße)

Die Tabelle 27 fasst diese Ergebnisse zusammen.

	(+/+)	(+)		(-/-)
		(+/-) Tumorzellen	(-/+) Tumormikrogefäße	
n(%)	24 (35,8%)	24 (35,8%)	7 (10,4%)	12 (17,9%)

TABELLE 27 ZEITGLEICHE EXPRESSION DES PSMA AN DEN TUMORZELLEN UND DEN TUMORMIKROGEFÄßEN BEI DEN PRIMÄRTUMORPROBEN

Somit hatten 24 (35,8%) der Primärtumorproben eine positive PSMA Immunreaktivität sowohl in den Tumorzellen als auch in den Gefäßen. 12 (17,9%) waren für beides negativ. 24 (35,8%) exprimierten das PSMA nur in den Tumorzellen und 7 (10,4%) nur in den Tumormikrogefäßen.

4.4.4.4. DIE EXPRESSION DES PSMAS AN DEN TUMORZELLEN UND AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN BEI DEN LYMPHKNOTENMETASTASEPROBEN

Zur Beurteilung der zeitgleichen Expression des PSMAs an den Tumorzellen und den Tumormikrogefäßen bei den Lymphknotenmetastasen wurden der MVD-IRS und der IRS in zwei Gruppen wie in der obigen Auswertung eingeteilt. Dies konnte bei n=18 Fällen beurteilt werden (siehe Tabelle 28).

	(+/+)	(+) (+/-)		(-/-)
		Tumorzellen	Tumormikrogefäße	
n(%)	10 (55,6%)	1 (5,6%)	2 (11,1%)	5 (27,8%)

TABELLE 28 ZEITGLEICHE EXPRESSION DES PSMAS AN DEN TUMORZELLEN UND AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN BEI DEN LYMPHKNOTENMETASTASEPROBEN

Somit hatten 10 (55,6%) der Lymphknotenmetastaseproben eine positive PSMA Immunoreaktivität sowohl in den Tumorzellen als auch in den Gefäßen. 5 (27,8%) waren für beides negativ. 1 (5,6%) exprimierte das PSMA nur in den Tumorzellen und 2 (11,1%) nur in den Tumormikrogefäßen.

4.4.4.5. DIE EXPRESSION DES PSMAS AN DEN TUMORZELLEN UND AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN BEI DEN FERNMETASTASEPROBEN

Damit die zeitgleiche Expression des PSMAs an den Tumorzellen und an den Tumormikrogefäßen bei den Fernmetastaseproben untersucht werden konnte, wurden der IRS und der MVD-IRS in zwei Gruppen, wie in der obigen Auswertung, eingeteilt. Bei n=9 Fällen konnte die Expression des PSMAs in den Tumorzellen mit der in den Tumormikrogefäßen verglichen werden.

	(+/+)	(+) (+)		(-/-)
		(+/-)	(-/+)	
		Tumorzellen	Tumormikrogefäße	
n(%)	6 (66,7%)	1(11,1%)	2 (22,2%)	0 (0%)

TABELLE 29 ZEITGLEICHE EXPRESSION DES PSMAS AN DEN TUMORZELLEN UND AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN BEI DEN FERNMETASTASEPROBEN

Somit hatten 6 (66,7%) der Fernmetastaseproben eine positive PSMA Immunreaktivität sowohl in den Tumorzellen als auch in den Gefäßen. Keine Probe war für beides negativ. 1 (11,1%) exprimierte das PSMA nur in den Tumorzellen und 2 (22,2%) nur in den Tumormikrogefäßen (siehe Tabelle 29). Insgesamt konnten hier 3 Knochen-, 1 Lungen- und 5 Gehirnmastasen beurteilt werden. 2/3 Knochen- und 4/5 Gehirnmastasen waren sowohl an den Tumorzellen als auch an den Tumormikrogefäßen positiv.

4.4.4.6. DIE ZEITGLEICHE EXPRESSION DES PSMAS IM PRIMÄRTUMOR UND DEN LYMPHKNOTEN- ODER FERNMETASTASEPROBEN

In 17 gepaarten Fällen für die Lymphknotenmetastaseproben und in 7 gepaarten Fällen für die Fernmetastaseproben (n=3 Knochenmetastasen und n=4 Gehirnmastasen) konnte die Expression des PSMAs im Primärtumor mit der der Metastase bei derselben Patientin verglichen werden (siehe Tabelle 30).

Primärtumorproben		(+/+)	(+) (+)		(-/-)
			(+/-)	(-/+)	
			Tumorzellen	Tumormikrogefäße	
Lymphknoten- metastase n=17	(+/+)	5	3	1	0
	(+) (+)	(+/-)	0	1	0
		(-/+)	0	1	1
	(-/-)	1	2	1	1
Fern- metastase n=7	(+/+)	2	3	0	0
	(+) (+)	(+/-)	1	0	0
		(-/+)	0	1	0
	(-/-)	0	0	0	0

TABELLE 30 VERGLEICH DER PSMÄ EXPRESSION IN DEN PRIMÄRTUMORPROBEN MIT DER IN DEN LYMPHKNOTEN- UND FERNMETASTASEPROBEN

Im Allgemeinen ist ersichtlich, dass die Expression des PSMA in den Primärtumorproben nicht vollständig mit der der Lymphknoten- oder Fernmetastase übereinstimmt. Weder die Expression des PSMA in den Tumorzellen noch die in den Tumormikrogefäßen stimmt mit der der Primärtumorprobe exakt überein.

Insbesondere bei den Gehirnmastasen hatten 3 Proben einen positiven MVD-IRS, während die Primärtumorprobe derselben Patientin jedoch negativ war.

4.4.5. VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN DER PRIMÄRTUMORPROBEN MIT DEN KLINIKOPATHOLOGISCHEN PARAMETERN

4.4.5.1. T-STADIUM

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem T-Stadium und der PSMA Expression an den Tumorzellen oder an den Tumormikrogefäßen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 34).

4.4.5.2. N-STADIUM

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem N-Stadium und der PSMA Expression an den Tumorzellen oder an den Tumormikrogefäßen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 34).

4.4.5.3. M-STADIUM

Hinsichtlich des IRS im Primärtumor ließ sich im Mann-Whitney U Test ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-metastasierten und fernmetastasierten Patientinnen feststellen ($p=0,009$). Der Median der M0-Patientinnen lag bei 4 [0;8] und der der M1 Patientinnen bei 6 [0;8]. Somit lässt sich signifikant nachweisen, dass Mammakarzinome, die Fernmetastasen gebildet haben, mehr PSMA in den Tumorzellen exprimieren (siehe Tabelle 34 und Abbildung 24).

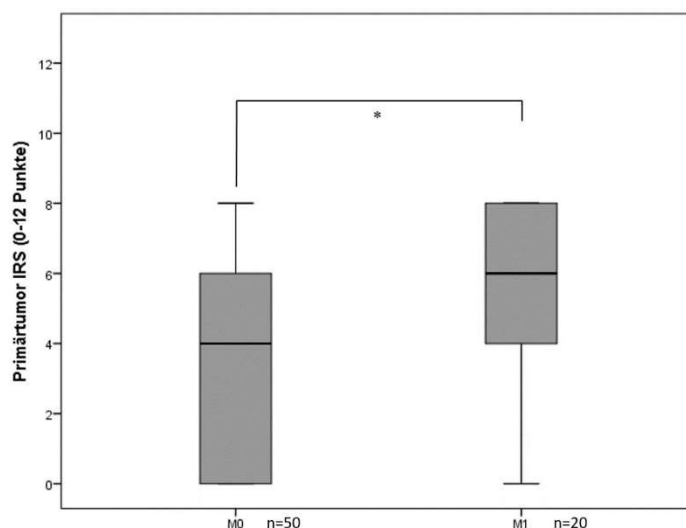


ABBILDUNG 24 PSMA EXPRESSION DER TUMORZELLEN - BOXPLOT ZUM VERGLEICH DES IRS IM PRIMÄRTUMOR DER M0- UND M1 PATIENTINNEN

*p=0,009

Der MVD im Primärtumor der nicht-fernmetastasierten Mammakarzinome war ebenso im Mann-Whitney U Test signifikant kleiner als der der fernmetastasierten (p=0,050) (siehe Tabelle 34 und Abbildung 25). Der Median des MVD lag bei 6 bei den M0-Patientinnen und bei den M1-Patientinnen bei 21.

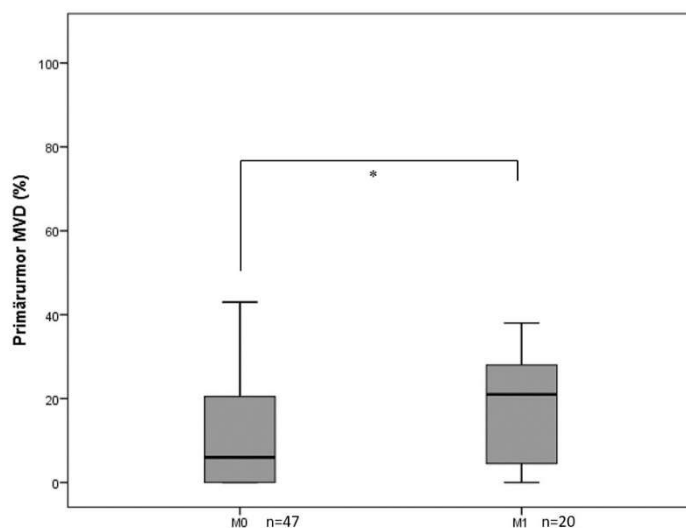


ABBILDUNG 25 PSMA EXPRESSION AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN - BOXPLOT ZUM VERGLEICH DES MVD IM PRIMÄRTUMOR DER M0- UND M1-PATIENTINNEN

*p=0,050

Beim MVD-IRS im Primärtumor ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den M0- und M1-Patientinnen nachweisen ($p=0,137$). Der Median der M1 Patientinnen lag bei 3 [0;12]. Bei den M0-Patientinnen hingegen, lag er bei 2 [0;12] (siehe Tabelle 31).

M-Stadium	n	Median des MVD-IRS im Primärtumor	p-Wert
M0	47	2	0,137
M1	20	3	

TABELLE 31 PSMA EXPRESSION AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN (MVD-IRS) BEI DEN M0- UND M1-PATIENTINNEN

4.4.5.4. GRADING

Ein Kruskal-Wallis Test bestätigte, dass der IRS im Primärtumor signifikant höher ist bei einem höheren Differenzierungsgrad des Tumors (Grading 3), $p=0,011$. Durchgeführte post-hoc Tests (Dunn-Bonferroni Tests) zeigten, dass sich lediglich die Grading 2 (G2) und Grading 3 (G3) Tumore signifikant unterscheiden ($p=0,007$). Der Median des IRS der differenzierten Grading 1 (G1) Karzinome lag bei 4 [0;8] ($n=7$). Der Median der G2 Karzinome lag ebenfalls bei 4 [0;8] ($n=48$) und der Median der entdifferenzierten G3 Karzinome bei 8 [3;8] ($n=15$) (siehe Tabelle 34 und Abbildung 26).

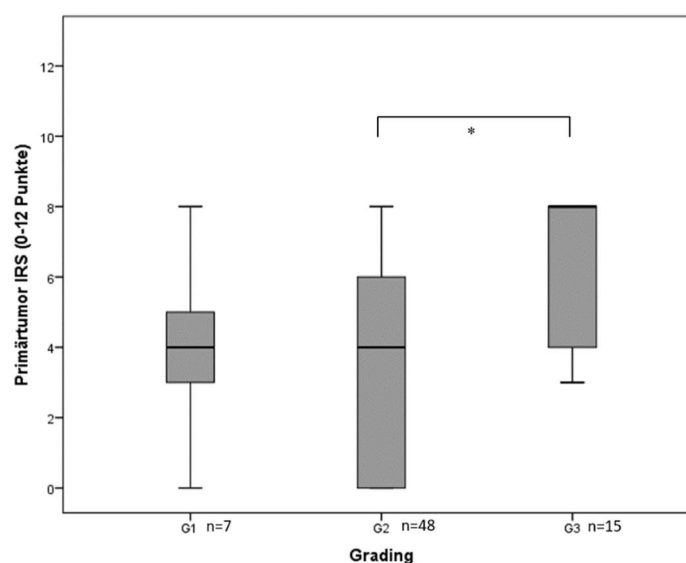


ABBILDUNG 26 PSMA EXPRESSION DER TUMORZELLEN (IRS) - BOXPLOT ZUM VERGLEICH DES IRS IN DEN PRIMÄRTUMORPROBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM GRADING

* $p=0,007$

Die Anzahl an PSMA exprimierenden Tumormikrogefäßen war im Kruskal-Wallis Test ebenfalls signifikant höher bei den entdifferenzierten Mammakarzinomen ($p=0,034$) (siehe Tabelle 34). Der Median betrug 1 [0;6] bei den G1 Tumoren ($n=7$). Durchgeführte post-hoc Tests (Dunn-Bonferroni Tests) zeigten, dass sich lediglich die Grading 2 und Grading 3 Tumore signifikant unterscheiden ($p=0,029$). Der Median der G2 Karzinome lag bei 2 [0;12] ($n=44$) und der der G3 Karzinome bei 4 [0;9] ($n=15$) (siehe Abbildung 27).

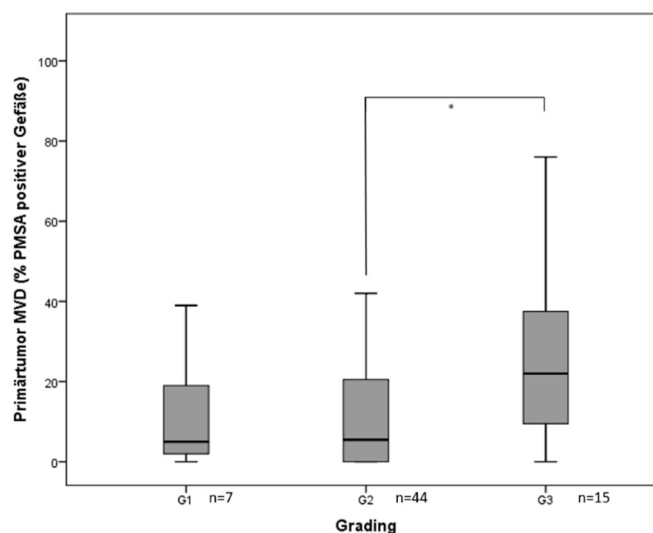


ABBILDUNG 27 PSMA EXPRESSION DER TUMORMIKROGEFÄßE (MVD) - BOXPLOT ZUM VERGLEICH DES MVD IN DEN PRIMÄRTUMORPROBEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM GRADING
* $p=0,029$

Bei dem MVD-IRS im Primärtumor, sowie bei allen Lymphknoten- und Fernmetastaseproben konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der PSMA Expression und dem Grading nachgewiesen werden (siehe Tabelle 34).

4.4.5.5. HISTOLOGIE

Der IRS und der MVD-IRS der PSMA positiven Zellen ist im Primärtumor bei invasiv duktalem Mammakarzinomen signifikant höher als bei den anderen histologischen Tumortypen ($p=0,002$ und $p=0,029$). Der Median des IRS im Primärtumor lag bei den invasiv duktalem Mammakarzinomen bei 4 [0;8] und der der Tumore mit einer anderen Histologie bei 2 [0;8] (siehe Tabelle 32). Außerdem betrug der Median des MVD-IRS im Primärtumor bei den invasiv duktalem Mammakarzinomen 3,5 [0;12] und der der anderen Tumore 0 [0;9] (siehe Tabelle 33). Beim MVD ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (siehe Tabelle 34).

Histologie	n	Median des IRS im Primärtumor	p-Wert
inv. duktal*	53	4	0,002
andere	18	2	

TABELLE 32 PSMA EXPRESSION AN DEN TUMORZELLEN (IRS) BEI DEN INVASIV DUKTALEN MAMMAKARZINOMEN UND DEN ANDEREN HISTOLOGISCHEN TUMORENTITÄTEN

*inv. duktal: invasiv duktal

Histologie	n	Median des MVD-IRS im Primärtumor	p-Wert
inv. duktal	50	3,5	0,029
andere	17	0	

TABELLE 33 PSMA EXPRESSION AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN (MVD-IRS) BEI DEN INVASIV DUKTALEN MAMMAKARZINOMEN UND DEN ANDEREN HISTOLOGISCHEN TUMORENTITÄTEN

*inv. duktal: invasiv duktal

4.4.5.6. KI67 LEVEL

Bei der Durchführung eines Kruskal-Wallis Tests konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ki67 Level und dem MVD-IRS der Primärtumorproben ($p=0,004$, $n=62$) nachgewiesen werden. Durchgeführte Post-hoc (Dunn-Bonferroni) Tests zeigten, dass sich lediglich die Gruppen, bei denen der Ki67-Level $<10\%$ war und zwischen $10-14\%$ lag, sowie die Gruppen, bei denen er $<10\%$ war und $>14\%$ lag, sich signifikant voneinander unterschieden ($p=0,021$ und $p=0,005$). Der Median des MVD-IRS bei den Primärtumorproben, die ein Ki67 Level $<10\%$ hatten, lag bei 0 [0;4] ($n=15$). Im Gegensatz dazu lag der Median der Tumore, die ein Ki67-Level zwischen 10 und 14% oder $>14\%$ hatten, bei 4 ([0;12], $n=20$ und [0;9], $n=27$ jeweils). Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem MVD und dem Ki67-Level ebenfalls nachgewiesen werden ($p=0,009$) (siehe Tabelle 34).

4.4.5.7. ALTER BEI DIAGNOSESTELLUNG

Wenn das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung im Mann-Whitney U Test mit dem IRS in den Primärtumorproben verglichen wird, ist der Unterschied signifikant ($p=0,039$) (siehe Tabelle 34). Der Median des IRS bei den Patientinnen, die jünger als 50 Jahre waren, lag bei 3 [0;8] und der der Patientinnen, die 50 oder älter waren, lag bei 4 [0;8].

4.4.5.8. ZUSAMMENFASSUNG DES VERGLEICHES DER KLINIKOPATHOLOGISCHEN MERKMALE MIT DEN ERHOBENEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN PARAMETERN IM PRIMÄRTUMOR

In der Tabelle 34 werden alle Ergebnisse der durchgeführten Mann-Whitney-U und Kruskal-Wallis Tests zum Vergleich der klinikopathologischen Merkmale mit den erhobenen immunhistochemischen Parametern in den Primärtumorproben tabellarisch zusammengefasst.

Merkmale	Primärtumor IRS	Primärtumor MVD	Primärtumor MVD-IRS
<u>T-Stadium</u>			
T1-T4	n.s.	n.s.	n.s.
<u>N-Stadium</u>			
N+-N0-NX	n.s.	n.s.	n.s.
<u>M-Stadium</u>			
M0-M1	p=0,009	p=0,050	n.s.
<u>ER</u>			
positiv-negativ	p=0,012	n.s.	n.s.
<u>Grading</u>			
G1-G2-G3	p=0,011	p=0,034	n.s.
<u>Histologie</u>			
inv. duktal-andere	p=0,002	n.s.	p=0,029
<u>Ki67</u>			
<10%/10-14%/>14%	n.s.	p=0,009	p=0,004
<u>Alter bei Diagnose</u>			
≤50 - >50	p=0,039	n.s.	n.s.
<u>Menopause</u>			
prä-postmenopausal	n.s.	n.s.	n.s.

TABELLE 34 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES MANN-WHITNEY U UND KRUSKAL-WALLIS TESTS BEZÜGLICH DER PSMA EXPRESSION IM PRIMÄRTUMOR IN ABHÄNGIGKEIT VON KLINIKOPATHOLOGISCHEN PARAMETERN
n.s.: nicht signifikant

4.4.5.9. DIE ZEITGLEICHE EXPRESSION DES PSMA AN DEN TUMORZELLEN UND AN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN DER PRIMÄRTUMORPROBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON KLINIKOPATHOLOGISCHEN PARAMETERN

Zum Vergleich der klinikopathologischen Parameter mit der zeitgleichen Expression des PSMA in den Tumorzellen und in den Tumormikrogefäßen wurde der Chi-Quadrat Test verwendet (siehe Tabelle 35).

Merkmal		n	(-/-)	(+)		(+/+)	p
				(+/-)	(-/+)		
Alter	<50	17	3	6	4	4	n.s.
	≥50	50	9	18	3	20	
Meno- pause	prä-	16	3	6	3	4	n.s.
	post-	51	9	18	4	20	
Histo- logie	inv.duktal	50	5	19	5	21	0,026
	andere	17	7	5	2	3	
T- Stadium	T1	34	7	14	3	10	n.s.
	T2, T3, T4	32	5	10	4	13	
N- Stadium	N0	34	9	11	5	9	n.s.
	N+/NX	33	3	13	2	15	
Grading	G1, G2	51	12	20	7	12	0,002
	G3	15	0	4	0	11	
ER	positiv	55	12	19	7	17	n.s.
	negativ	11	0	5	0	6	
PR	positiv	45	8	17	6	14	n.s.
	negativ	21	4	7	1	9	
Her2Neu	positiv	7	1	3	0	3	n.s.
	negativ	59	11	21	7	20	
Triple negativ	ja	9	0	5	0	4	n.s.
	nein	57	12	19	7	19	
Ki67	<10%	15	5	7	0	3	0,041
	10-14%	20	4	7	4	5	
	>14%	27	2	10	2	13	
CA 15-3	<29 U/ml	25	8	10	2	5	n.s.
	>29 U/ml	9	1	3	1	4	
M- Stadium	M0	47	10	16	7	14	n.s.
	M1	20	2	8	0	10	

TABELLE 35 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES CHI-QUADRAT TESTS BEZÜGLICH DER ZEITGLEICHEN PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORZELLEN UND TUMORMIKROGEFÄßEN IM PRIMÄRTUMOR IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN KLINIKOPATHOLOGISCHEN PARAMETERN

(-/-): IRS und MVD-IRS sind negativ
(+/-): IRS ist positiv, MVD-IRS ist negativ
(-/+): MVD-IRS ist positiv, IRS ist negativ
(+/+): IRS und MVD-IRS sind positiv
n.s.: nicht signifikant
ER: Östrogenrezeptor
PR: Progesteronrezeptor

Es zeigte sich somit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der zeitgleichen Expression des PSMA in den Gefäßen und in den Tumorzellen bei unterschiedlicher Histologie, einem unterschiedlichen Grading oder Ki67-Level.

4.4.6. VERGLEICH DER ERHOBENEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN PARAMETER UNTEREINANDER

In dieser Studie wurde das PSMA sowohl im Primärtumor, als auch in den Lymphknoten- und den Fernmetastasen nachgewiesen. Außerdem wurden Gefäße und Tumorzellen auf eine PSMA Expression hin untersucht.

4.4.6.1. WILCOXON TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN

Um die Expression des PSMA an den verschiedenen Lokalisationen vergleichen zu können, wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewendet und Korrelationsanalysen durchgeführt. Für den Vergleich des IRS und des MVD-IRS wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Bei dem Vergleich des IRS und des MVD-IRS mit dem MVD wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Der MVD wurde nicht mit dem MVD-IRS der gleichen Lokalisation verglichen. Da der MVD bei der Erstellung des MVD-IRS mit einfließt, wurde zur besseren statistischen Verwertbarkeit davon abgesehen.

Um die Richtung des Zusammenhangs deuten zu können, wurde der Median der Differenzen zwischen den verschiedenen Parametern berechnet.

	Primär- tumor IRS	Lymph- knoten IRS	Metastase IRS	Primär- tumor MVD-IRS	Lymph- knoten MVD-IRS	Fern- metastase MVD-IRS
Primärtumor IRS		p=0,020	n.s.	p=0,001	p=0,022	n.s.

TABELLE 36 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES WILCOXON TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN
n.s. : nicht signifikant

	Primär- tumor IRS	Lymph- knoten IRS	Metastase IRS	Primär- tumor MVD- IRS	Lymph- knoten MVD-IRS	Fern- metastase MVD-IRS
Primärtumor IRS	n	n=17	n.s.	n=67	n=17	n=8
	\tilde{x}	$\tilde{x}=1$	n.s.	$\tilde{x}=2$	$\tilde{x}=1$	n.s.

TABELLE 37 MEDIANE DER DIFFERENZEN ZWISCHEN DEN ERHOBENEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN PARAMETERN
n.s.: nicht signifikant
 \tilde{x} = Median der Differenzen

Aus den Tabellen 36 und 37 ist ersichtlich, dass der IRS im Primärtumor signifikant höher ist als der MVD-IRS in denselben Proben (Median der Differenzen=2, p=0,001). Daneben ist der IRS im Primärtumor ebenfalls höher als der IRS und der MVD-IRS der Lymphknotenmetastasen (Median der Differenzen=1 und 2 und p=0,020 und p=0,022). Außerdem ist diese Expression höher als die in den Tumorzellen und den Gefäßen der Lymphknotenmetastasen. Bei dem Vergleich mit dem IRS und dem MVD-IRS der Fernmetastaseproben konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die Expression des PSMA in der Tumorneovaskulatur (MVD-IRS) der Primärtumorproben zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu der Expression des PSMA in den Tumorzellen und der Tumorneovaskulatur der Lymphknotenmetastaseproben.

Außerdem wurde überprüft, ob sich für die zeitgleiche Expression des PSMA (an den Tumorzellen und an der Tumorneovaskulatur) in den Primärtumorproben und in den Lymphknoten- und Fernmetastaseproben im Wilcoxon Test für verbundene Stichproben ein signifikanter Zusammenhang nachweisen lässt. Diese Untersuchungen konnten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen (p=0,411 und p=0,739 jeweils).

4.4.6.2. KORRELATIONSANALYSEN

4.4.6.2.1. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DER PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORZELLEN UND DER TUMORNEOVASKULATUR

Der Prozentsatz an PSMA-positiven Gefäßen in den Primärtumor- und in den Lymphknotenmetastaseproben korrelierte signifikant mit der PSMA-Expression der Tumorzellen bei den Primärtumor- und Lymphknotenmetastaseproben, sowie dem MVD-IRS der getesteten Lymphknotenmetastasen. Außerdem korreliert der Prozentsatz an PSMA positiven Gefäßen in den Lymphknotenmetastasen signifikant mit dem MVD-IRS in den Primärtumorproben. Bei den Fernmetastaseproben ergab sich keine signifikante Korrelation (siehe Tabelle 38).

Der positive Korrelationskoeffizient bedeutet, dass beispielsweise eine höheres MVD mit einem höheren IRS bei den Primärtumorproben einhergeht.

		Primär- tumor IRS	Lymph- knoten IRS	Metastase IRS	Primär- tumor MVD- IRS	Lymph- knoten- MVD-IRS	Fern- metastase MVD-IRS
Primärtumor MVD	σ	$\sigma=0,334$	$\sigma=0,567$	n.s.		$\sigma=0,608$	n.s.
	p	p=0,006	p=0,018	n.s.		p=0,010	n.s.
Lymphknoten MVD	σ	$\sigma=0,595$	$\sigma=0,793$	n.s.	$\sigma=0,529$		n.s.
	p	p=0,038	p<0,001	n.s.	p=0,029		n.s.
Fernmetastase MVD	σ	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
	p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

TABELLE 38 KORRELATIONSANALYSE DER ERHOBENEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN PARAMETER

σ : Korrelationskoeffizient nach Spearman

n.s. : nicht signifikant

4.4.6.2.2. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM AUSMAß DER PSMA EXPRESSION AN DEN GEFÄßEN DES PRIMÄRTUMORS UND DER LYMPHKNOTENMETASTASEN

Zum Vergleich des MVD der PSMA-positiven Gefäße im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen konnte eine Korrelationsanalyse bei 17 Patientinnen durchgeführt werden. Diese zeigte einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,001$), der Korrelationskoeffizient nach Spearman lag bei 0,736. Dieser positive Korrelationskoeffizient bedeutet, dass ein höherer MVD im Primärtumor in der Regel mit einem höheren MVD in den Lymphknotenmetastasen einhergeht. Dieser Zusammenhang verdeutlicht sich in dem folgenden Streudiagramm (siehe Abbildung 28).

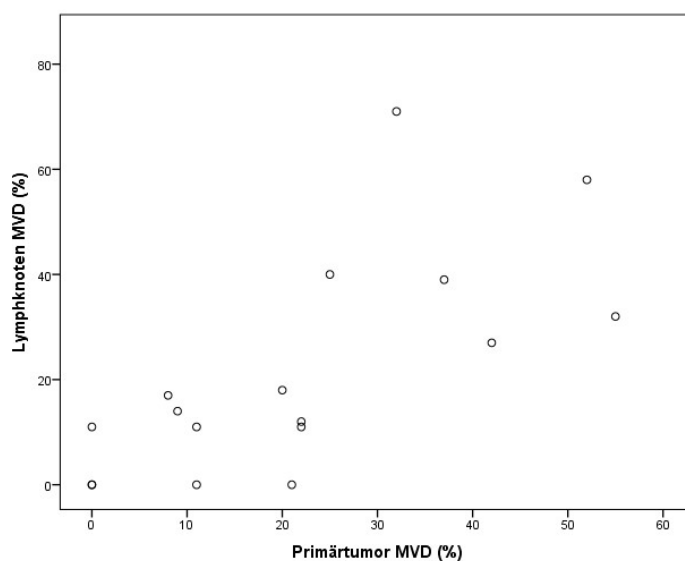


ABBILDUNG 28 STREUDIAGRAMM ZUR DARSTELLUNG DER POSITIVEN KORRELATION ZWISCHEN DER PSMA-MICROVESSEL DENSITY IM PRIMÄRTUMOR UND IN DEN LYMPHKNOTENMETASTASEN

4.4.7. GESAMT UND REZIDIVFREIES ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PSMA-EXPRESSION

Zur Überlebenszeitanalyse und Analyse des metastasefreien Überlebens wurde eine grafische Darstellung mittels Kaplan-Meier Kurven zur Visualisierung der Ergebnisse der zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen gemacht. Damit eine Aussage über den Unterschied zwischen den beiden Gruppen getroffen werden konnte, wurde ein Log-rank Test durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden die Daten in zwei Einheiten gruppiert: der IRS und der MVD-IRS wurden in zwei Gruppen eingeteilt.

- (1) Score =0-2 (negativ)
- (2) Score= 3-12 (schwach, mäßig und stark positiv)

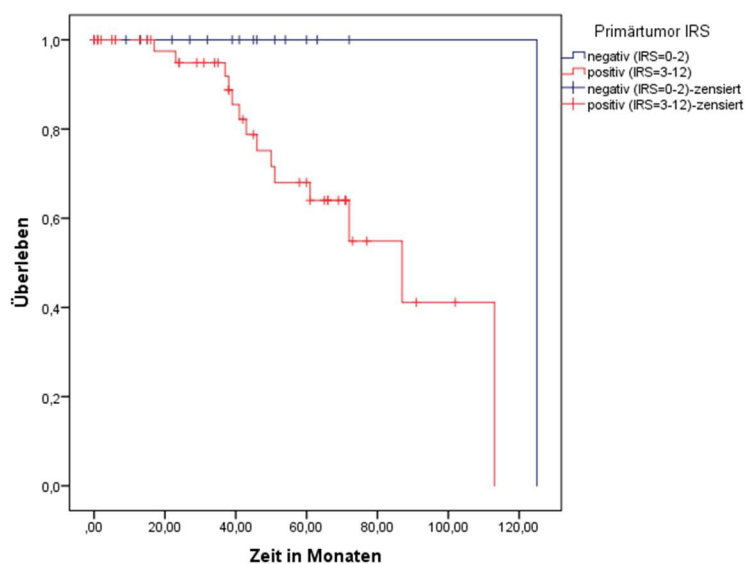


ABBILDUNG 29 KAPLAN-MEIER KURVE ZUR ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORZELLEN

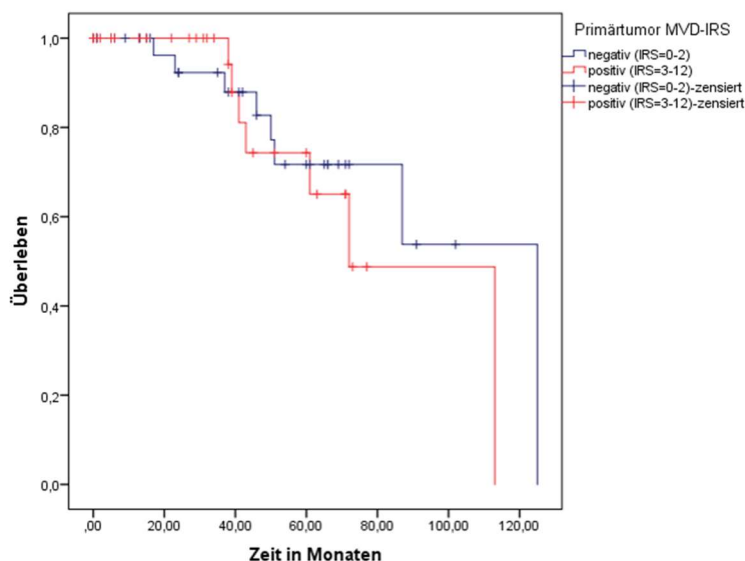


ABBILDUNG 30 KAPLAN-MEIER KURVE ZUR ÜBERLEBENSZEITANALYSE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORMIRKOGEFÄßEN

Aus der ersten Kaplan-Meier Kurve (siehe Abbildung 29) geht hervor, dass das Überleben der Patientinnen mit negativem PSMA IRS in den Tumorzellen verlängert ist. Dies ist im Log-rank-Test signifikant ($p=0,027$). Der Nachweis des PSMA in den Gefäßen (siehe Abbildung 30) ist nicht mit einem signifikant verlängertem Überleben assoziiert ($p=0,532$).

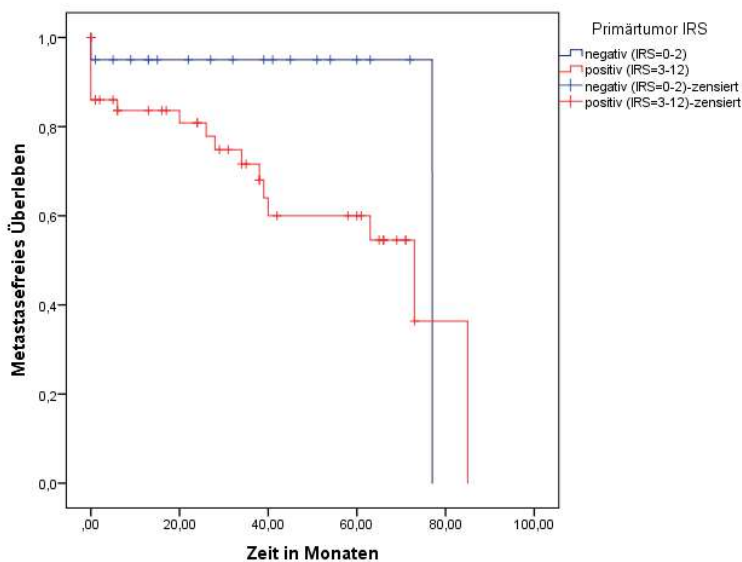


ABBILDUNG 31 KAPLAN-MEIER KURVE ZUR ANALYSE DES METASTASEFREIEN ÜBERLEBENS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORZELLEN

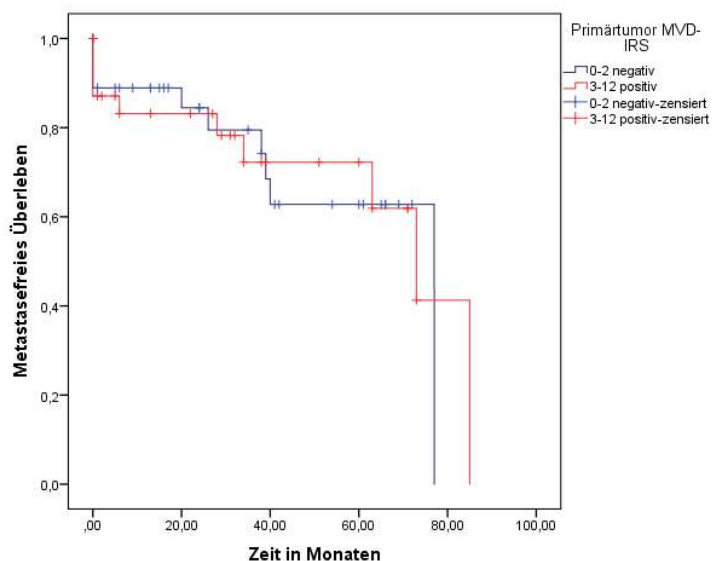


ABBILDUNG 32 KAPLAN-MEIER KURVE ZUR ANALYSE DES METASTASEFREIEN ÜBERLEBENS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER PSMA EXPRESSION IN DEN TUMORMIKROGEFÄßEN

Die Analyse des metastasefreien Überlebens in Abhängigkeit mit der PSMA Expression in den Tumorzellen (siehe Abbildung 31) und in den Tumormikrogefäßen (siehe Abbildung 32) zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,058$ und $p=0,928$).

Bei der Analyse des allgemeinen und metastasefreien Überlebens mit den gepaarten Fällen (also der zeitgleichen Expression des PSMA in den Tumorzellen und in der Tumorneovaskulatur) konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=0,178$ und $p=0,266$) nachgewiesen werden.

4.5. ERGEBNISSE DER IMMUNFLUORESZENZ

Diese Färbung konnte nur qualitativ und nicht quantitativ beurteilt werden. Wie bei der Beschreibung der mikroskopischen Auswertung der Immunfluoreszenz schon erläutert wurde, wurden im Tumorareal drei sogenannte „*hot spots*“, welche besonders stark vaskularisiert waren, bestimmt, fotografiert und analysiert.

Im Allgemeinen wurde darauf geachtet, ob die mit dem CD31-Primärantikörper dargestellten Endothelzellverbände im Tumor ebenfalls bei Darstellung des PSMA-Primärantikörpers fluoreszierend waren. Hierfür wurden getrennte Fotografien derselben hot spots in der PSMA und in der CD31 Färbung angefertigt. Durch eine Überlagerung dieser Fotografien konnte nachgewiesen werden, dass genau dieselbe Struktur nicht nur das PSMA exprimierte, sondern ebenfalls das CD31. Das CD31 hatte ein grünes und das PSMA ein rotes Signal.

Bei der mikroskopischen Begutachtung der gefärbten Schnitte in den einzelnen Fluoreszenzkanälen und der anschließenden digitalen Übereinanderlagerung der entsprechenden Aufnahmen wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen im Allgemeinen bestätigt.

Jene Fälle, die in der Immunhistochemie keine PSMA-positiven Gefäße zeigten, hatten ebenfalls in der Immunfluoreszenz PSMA-negative Gefäße.

Außerdem hatten die Fälle, die in der Immunhistochemie einen positiven MVD-IRS hatten, ebenfalls in der Immunfluoreszenz PSMA positive Gefäße. Dies bestätigte sich sowohl bei den Primärtumorproben als auch bei den Lymphknoten- und Fernmetastaseproben. Es war bei den Patientinnen mit und ohne Fernmetastasen der Fall.

Allerdings schien die Immunfluoreszenz insgesamt weniger PSMA positive Gefäße nachzuweisen als die Immunhistochemie.

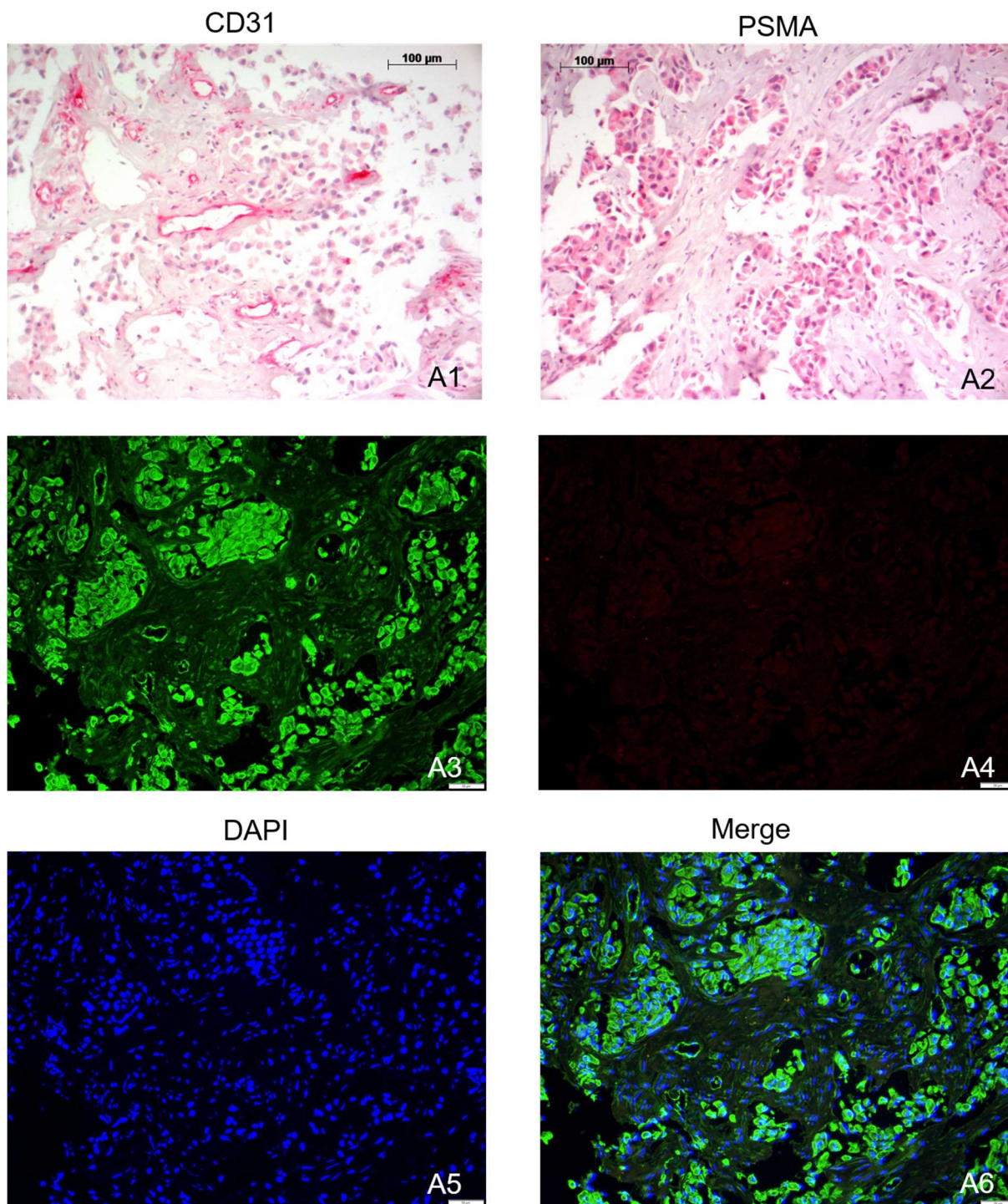


ABBILDUNG 33 GEGENÜBERSTELLUNG EINES PSMA-NEGATIVEN FALLS IN DER IMMUNHISTOCHEMIE UND DER IMMUNFLUORESCENZ IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Es handelt sich hier um die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz Färbung eines Primärtumorgewebeschnitts. Bei dieser Gegenüberstellung zeigt sich in der immunhistochemischen (**A1**) und der immunfluoreszierenden (**A3**) Färbung mit dem CD31-Primärantikörper eine Anreicherung dieses Antikörpers an den Endothelzellverbänden. Intraluminal zeigt sich ein fluoreszierendes Signal (**A3**), welches bei der Begutachtung der Gefäße nicht berücksichtigt werden sollte. Bei den PSMA-Färbungen erkennt man weder in der Immunhistochemie (**A2**) noch in der Immunfluoreszenz (**A4**) eine Immunreaktivität an den Gefäßen. Die DAPI Darstellung (**A5**) dient der Übersicht. Bei Überlagerung oder

merge (**A6**) der Fluoreszenzkanäle (**A2**), (**A4**) und (**A5**) zeigt sich hauptsächlich leuchtend grünes Signal. Dies weist auf ein deutliches Überwiegen des CD31 hin.

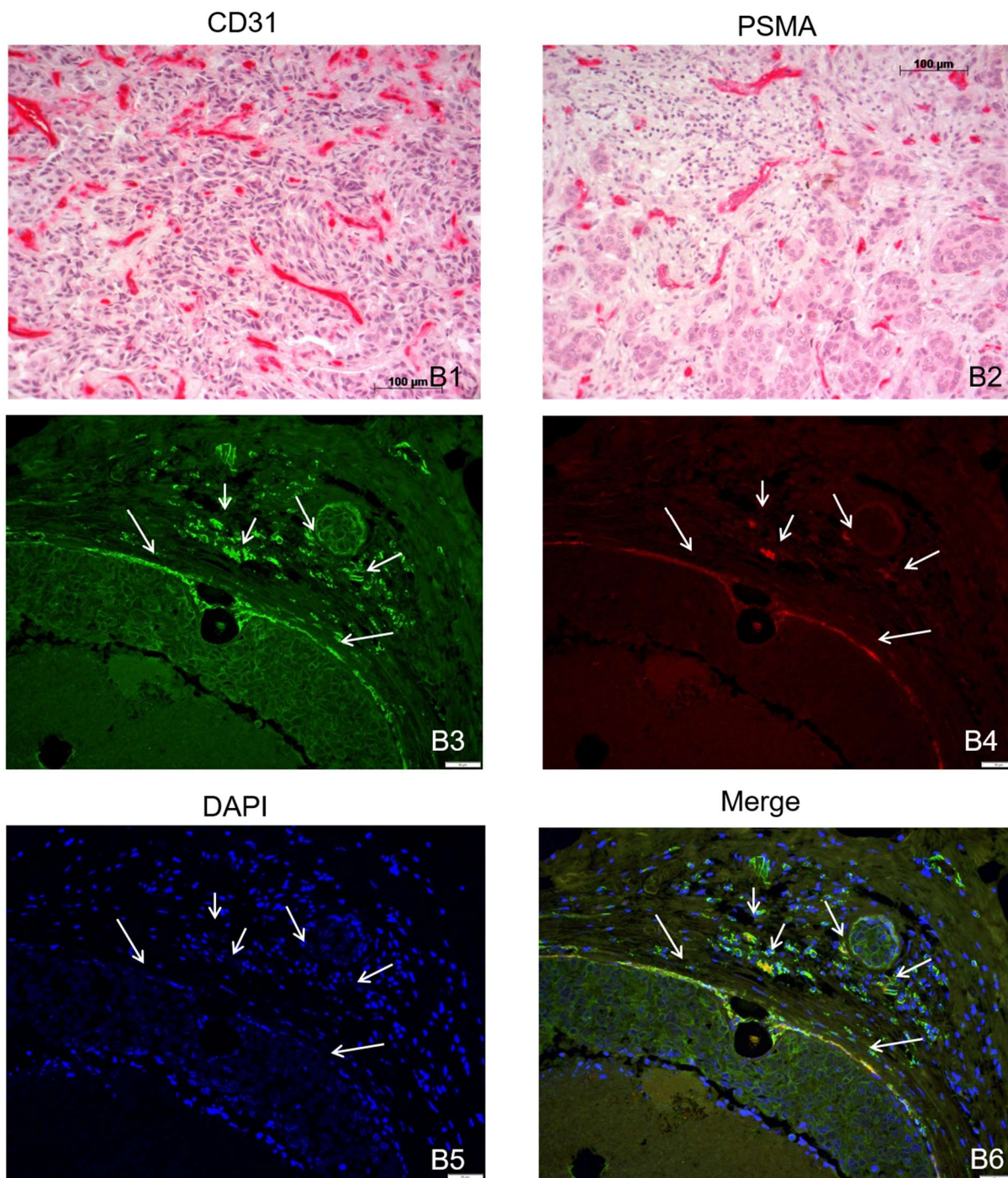


ABBILDUNG 34 GEGENÜBERSTELLUNG EINES PSMA-POSITIVEN FALLS IN DER IMMUNHISTOCHEMIE UND DER IMMUNFLUORESCENZ IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Es handelt sich hier die eine Immunhistochemie und Immunfluoreszenz Färbung eines Primärtumorgewebeschnitts. Bei dieser Gegenüberstellung zeigt sich in der immunhistochemischen (**B1**) und der immunfluoreszierenden (**B3**) Färbung mit dem CD31-Primärantikörper eine Anreicherung dieses Antikörpers an den Endothelzellverbänden. Bei den PSMA-Färbungen erkennt man sowohl in der Immunhistochemie (**B2**) als auch in der Immunfluoreszenz (**B4**) eine Immunreaktivität an den Gefäßen. Die weißen Pfeile weisen auf einige Tumormikrogefäße hin. Die DAPI Darstellung (**B5**) dient der Übersicht.

Bei Überlagerung oder *merge* (**B6**) der Fluoreszenzkanäle (**B2**), (**B4**) und (**B5**) zeigt sich hauptsächlich ein leuchtend grünes Signal, welches jedoch stellenweise gelb ist. Diese gelbe Farbe ist durch die Überlagerung des roten Signals für das PSMA und des grünen Signals für das CD31 entstanden. Dies zeigt die Kolokalisation des PSMA und des CD31.

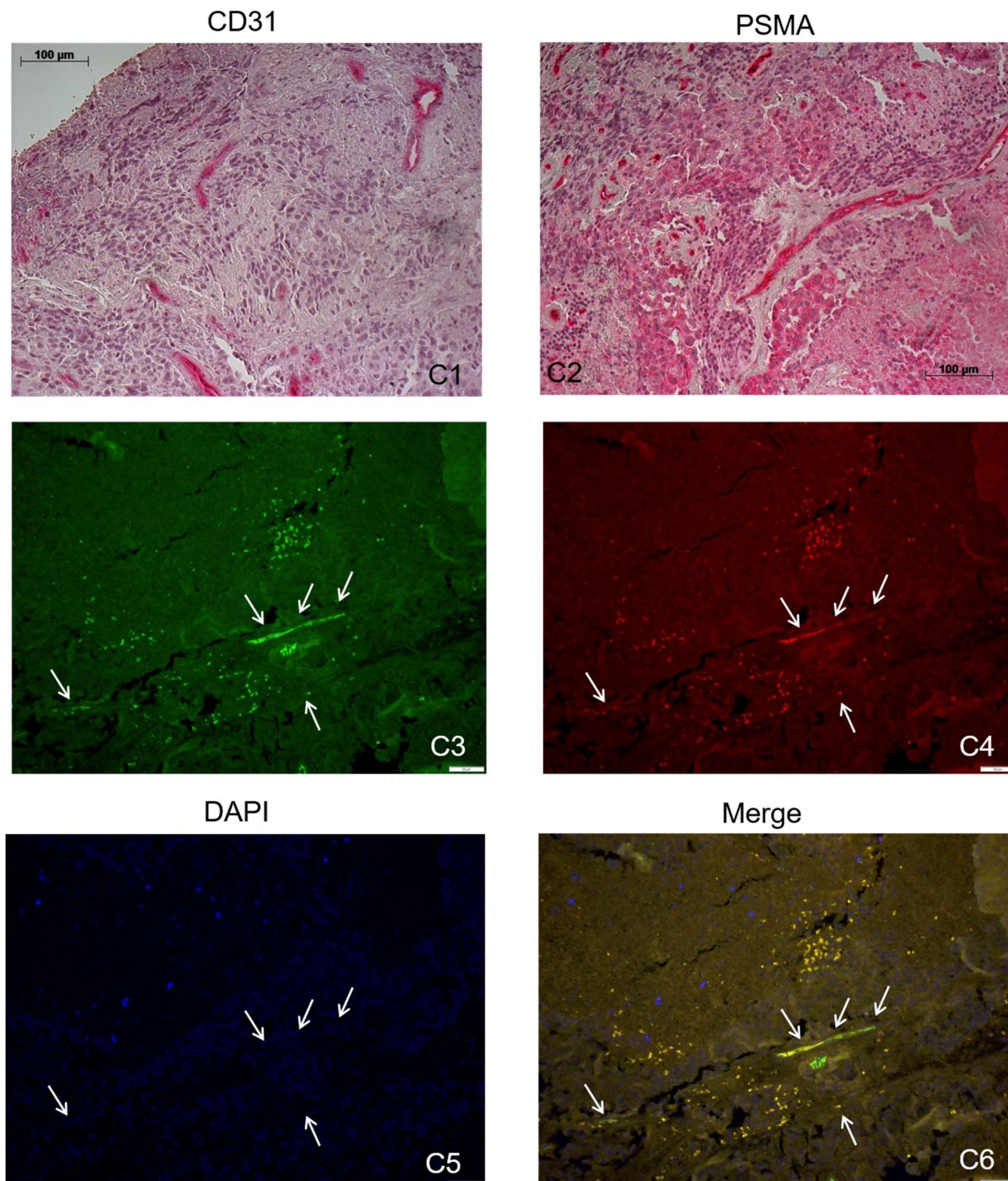


ABBILDUNG 35 GEGENÜBERSTELLUNG EINER PSMA-POSITIVEN GEHIRNMETASTASE IN DER IMMUNHISTOCHEMIE UND IMMUNFLUORESCENZ IN 20-FACHER VERGRÖßERUNG

Es handelt sich hier um die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz Färbung eines Gehirnetastasegewebeschnitts. Bei dieser Gegenüberstellung zeigt sich in der immunhistochemischen (**C1**) und der immunfluoreszierenden (**C3**) Färbung mit dem CD31-Primärantikörper eine Anreicherung

dieses Antikörpers an den Endothelzellverbänden. Bei den PSMA-Färbungen erkennt man sowohl in der Immunhistochemie **(C2)** als auch in der Immunfluoreszenz **(C4)** eine Immunreaktivität an den Gefäßen. Die weißen Pfeile weisen auf einige Tumormikrogefäße hin. Die DAPI Darstellung **(C5)** dient der Übersicht. Bei Überlagerung oder *merge* **(C6)** der Fluoreszenzkanäle **(C2)**, **(C4)** und **(C5)** zeigt sich hauptsächlich leuchtend grünes Signal, welches jedoch stellenweise gelb ist. Diese gelbe Farbe ist durch die Überlagerung des roten Signals für das PSMA und des grünen Signals für das CD31 entstanden. Dies zeigt die Kolokalisation des PSMA und des CD31.

Zusammenfassend wurden in der Immunfluoreszenz die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigt.

5. DISKUSSION

Das Mammakarzinom sowie das Prostatakarzinom sind jeweils die häufigsten Tumorentitäten bei Frau und Mann in Deutschland [46]. Das PSMA wurde bereits zu bildgebenden und therapeutischen Zwecken, vor allem für das metastasierte Prostatakarzinom, weitgehend erforscht. Die bisherigen Ergebnisse sind vielversprechend und die Therapiemöglichkeiten scheinen nebenwirkungsarm zu sein. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie die Expression des PSMA und dessen prognostische Bedeutung bei Mammakarzinompatientinnen untersucht.

Hierzu wurde die Expression des PSMA bei 72 Patientinnen mit einem Mammakarzinom getestet. Immunhistochemische Färbungen wurden auf Paraffinschnitten derselben Blöcke mit dem PSMA Antikörper (Clone 3E6) und dem CD31 Antikörper (Clone JC70A) von Dako durchgeführt. Zudem erfolgte eine Immunfluoreszenz Färbung bei ausgewählten Fällen.

In den bisherigen Studien, die die Expression des PSMA bei unterschiedlichen Tumorentitäten untersuchten, wurden bereits eine große Anzahl an PSMA-Antikörpern für verschiedene Detektionsmethoden verwendet. Aus diesem Grund wurden vor Beginn der Versuche, die gängigen Antikörper, die bereits zum Nachweis des PSMA bei immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden, überprüft. Anschließend wurde der gängigste Antikörper ausgewählt, der bereits für den Nachweis des PSMA beim Mammakarzinom angewendet wurde [64] [102]. Das PSMA wurde bereits in der Tumorneovaskulatur bei verschiedenen Tumorentitäten [18] [36] [64] [95] [96] und zum Beispiel auch beim Mammakarzinom nachgewiesen [92] [102]. Um die Anzahl der PSMA exprimierenden Gefäße im Verhältnis zur allgemeinen Gefäßdichte quantifizieren zu können, wurde in dieser Studie ebenfalls die allgemeine Gefäßdichte mittels einer CD31 Färbung bestimmt.

Aktuell ist diese Studie die dritte, neben der Studie von *Wernicke et al.* [102] (n=92) und der von *Tolkach et al.* [92] (n=315), die die Expression des PSMA bei einer großen Anzahl an Mammakarzinompatientinnen untersucht.

In dieser Studie wurde die Expression des PSMA mit dem IRS nach *Remmele und Stegner* evaluiert [76]. Die Ergebnisse zeigten, dass eine PSMA Immunoreaktivität sowohl in den Tumorzellen (bei 71,4% der Primärtumorproben und 70% aller untersuchten Proben) als auch in der Tumorneovaskulatur (bei 46,3% der Primärtumorproben und 54,3% aller untersuchten Proben) stattfindet. Obwohl mehr Fälle das PSMA in den Tumorzellen exprimierten als in den Tumormikrogefäßen, hatte der IRS der PSMA Expression in den Tumormikrogefäßen (MVD-IRS) meistens eine höhere Punktzahl, wenn die Gefäße PSMA-positiv waren. Bei den Primärtumorproben zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des PSMA in den Tumorzellen und in der Tumorneovaskulatur ($p=0,001$). Bei diesem Vergleich war ersichtlich, dass die PSMA Expression in den Tumorzellen höher als die der Tumormikrogefäße ist.

Die 40 Proben gesunden Brustdrüsengewebes, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden, zeigten, dass das PSMA auch von den Zellen des gesunden Brustdrüsengewebes exprimiert wird. Außer bei einem Fall, der eine niedrige Färbeintensität aufwies, waren alle Gefäße PSMA-negativ.

Diese Ergebnisse stimmen zum Teil mit denen von *Wernicke et al.* überein [102]. Diese Arbeitsgruppe stellte PSMA positive Gefäße bei 90 der 92 untersuchten Mammakarzinome fest. In den zwei übrigen Fällen wurde das PSMA ebenfalls in den Gefäßen des gesunden Brustdrüsengewebes nachgewiesen. Im Gegensatz zu den in dieser Studie gemachten Beobachtungen waren sowohl das gesunde Brustdrüsengewebe als auch die Tumorzellen alle PSMA-negativ.

Tolkach et al. fanden bei den 315 untersuchten Proben nur in 10 Fällen (3%) eine PSMA Expression in den Tumorzellen. 60% dieser Fälle waren jedoch in den Gefäßen PSMA-positiv. Dieses Protein wurde in 87 (27,6%) Fällen schwach, in 77 (24,4%) Fällen moderat und in 25 (8%) Fällen stark exprimiert [92].

Die Expression des PSMA in normalem und/oder malignem Brustdrüsengewebe wurde ebenfalls in einigen Studien mit einer kleineren Fallzahl untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind bisher sehr uneinheitlich.

Chang et al. verwendeten fünf unterschiedliche PSMA Antikörper und fanden heraus, dass das PSMA in der Tumorneovaskulatur von 5 der 6 untersuchten Mammakarzinome exprimiert wurde. Die Tumorzellen waren in dieser Studie PSMA-negativ. Alle 8 gefärbten Präparate mit gesundem Brustdrüsengewebe hingegen, hatten eine PSMA Expression im Epithel. Die Gefäße waren im gesunden Gewebe alle PSMA-negativ [18]. In einer anderen Studie von *Kinoshita et al.* war in den 6 untersuchten Fällen normalen Brustdrüsengewebes die Farbreaktion auf den PSMA-Antikörper moderat. Eines der 5 gefärbten invasiv duktalem Mammakarzinome zeigte eine schwache PSMA-Immunoreaktivität [45]. *Ross et al.* stellten in 7 von 10 Fällen eine PSMA Expression in der Tumorneovaskulatur von invasiv duktalem Mammakarzinomen fest [80]. Zudem waren die 8 von *Mhaweck-Fauceglia et al.* untersuchten Phylloides Tumore der Brust allesamt PSMA negativ [56].

Jene Zusammenfassung der bisherigen Beobachtungen bezüglich der PSMA Expression beim Mammakarzinom und im gesunden Brustdrüsengewebe zeigt, dass die Erkenntnisse aktuell noch sehr widersprüchlich sind.

Ein Grund dafür könnte die Verwendung von unterschiedlichen Antikörpern sein, welche andere Epitope des PSMA erkennen. *Kinoshita et al.* und *Ross et al.* benutzten beispielsweise den 7E11 Antikörper von der Firma Cytogen [45]. Dieser Antikörper erkennt die intrazelluläre Domäne des PSMA [104]. *Mhaweck-Fauceglia et al.* bevorzugten hingegen den Y-PSMA-1 Antikörper von der Firma Genetex, der spezifisch für die extrazelluläre Domäne des PSMA ist.

[56] [95]. *Tolkach et al.* und *Wernicke et al.* verwendeten wie in dieser Studie den 3E6 Antikörper von Dako, der ebenfalls die extrazelluläre Domäne des PSMA bindet. *Wernicke et al.* verdünnten den Antikörper ebenfalls 1:25, *Tolkach et al.* jedoch 1:100 [92] [102]. Die niedrigere Verdünnung von *Tolkach et al.* könnte die im Vergleich zur hier vorliegenden Studie geringere Anzahl an Mammakarzinomen, die PSMA-positive Tumorzellen hatten, erklären.

Außerdem wurde in den vorgestellten Studien eine unterschiedliche Methode zum Antigen-Retrieval angewendet, sowie verschiedene Proben. Zwar waren alle Proben Gewebeschnitte aus in Paraffin eingebettetem, formalin-fixiertem Gewebe, jedoch variierte die Dicke des Gewebeschnitts. Zudem wurden in der Studie von *Mhaweck-Fauceglia et al.* sowie von *Tolkach et al.* tissue microarrays (TMA[s]) aus den Gewebeblöcken angefertigt [56] [92]. In dieser Studie, sowie in der von *Kinoshita et al.* und *Wernicke et al.* wurde davon abgesehen [45] [102].

Zuletzt sind erhebliche Unterschiede bei der Quantifizierung der PSMA-positiven Gefäße aufzufinden. In dieser Studie wurden für jedes untersuchte Gewebe mehrere Gewebeschnitte des gleichen Paraffinblockes angefertigt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte möglichst aufeinanderfolgend waren. Von jeder Gewebeprobe wurde eine PSMA und eine CD31 Färbung durchgeführt. In diesen Färbungen wurden jeweils fünf *hot spots*, die besonders stark vaskularisiert waren, ausgewählt und in 20-facher Vergrößerung fotografiert. Aus diesen Fotografien wurde zuerst die allgemeine Gefäßdichte anhand der CD31 Färbung und dann die Anzahl der PSMA-positiven Gefäße im Verhältnis zur allgemeinen Gefäßdichte berechnet. Dieser Prozentzahl wurde eine Punktzahl von 0 bis 4 vergeben. Anschließend wurde die Intensität der Färbung auf den Gefäßen bestimmt, die eine Punktzahl von 0 bis 3 erhielt. Aus der Multiplikation beider Werte wurde der MVD-IRS bestimmt, analog zum IRS von *Remmele und Stegner* [76].

Ein Vorteil dieser Studie ist, dass eine umfangreiche Fläche an Tumorgewebe untersucht wurde. Die Intensität der PSMA-positiven Gefäße wurde für die gesamte Gewebeprobe beurteilt. Jene Intensität, die am häufigsten vertreten und am repräsentativsten war, wurde ausgewählt. Es wurden 5 *hot spots* in 20-facher Vergrößerung fotografiert und ein Mittelwert aus der Anzahl der gezählten Gefäße berechnet. Dadurch konnte die Gefäßanzahl vereinheitlicht werden. Bei den Fällen, wo das Material quantitativ oder qualitativ nicht genügte, um 5 Bilder in 20-facher Vergrößerung anzufertigen, wurde von der Berechnung des MVD abgesehen. In der Studie von *Tolkach et al.* hingegen, wurden TMAs beurteilt [92]. Um die Ergebnisse zu vereinheitlichen wurde bei der Studie von *Wernicke et al.* davon abgesehen, die Intensität der Gefäße zu berücksichtigen, da diese mit dem Ausmaß an PSMA-positiven Gefäßen korrelierte. Nur die Anzahl an PSMA-exprimierenden Gefäßen wurde beachtet [102].

Allerdings könnte in dieser Studie bei der Bestimmung der allgemeinen Gefäßdichte und der PSMA-positiven Gefäße das gleiche Gefäß mehrmals gezählt worden sein. Bei Anschnitt eines Paraffinblocks ist unbekannt, wie die Schlingelung der Gefäße innerhalb der

Tumorgewebeprobe verläuft. Durch diese Windungen könnte eventuell mehrmals das gleiche Gefäß vorhanden gewesen sein. Aus diesem Grund wurde jede Endothelzelle und jede Gruppierung aus Endothelzellen, die getrennt von einem strukturell klar definierten Gefäß aufzufinden war, als einzelnes Gefäß getrennt gezählt. Somit wurde in jedem Schnitt auf gleiche Art und Weise diese eventuell vorhandene Schlingelung einheitlich nicht berücksichtigt.

Außerdem ist die Anzahl an gezählten Gefäßen mit anderen Studien schwer vergleichbar, da die Quantifizierung im Auge des Betrachters liegt. Es stehen sogar verschiedene computer-gestützte Auswertungsmethoden zu Verfügung, um diese Subjektivität bei der Auswertung zu verhindern. Beispielsweise kann die endotheliale Fläche, der Durchmesser der Mikrogefäße, oder die Anzahl an Verzweigungen pro hundert Gefäßabschnitten computer-gestützt bestimmt werden. Diese Methoden haben aber auch interindividuelle Unterschiede [63].

Aus diesen Gründen ist ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Studien erschwert. Daraus resultiert die Notwendigkeit von der Vereinheitlichung des PSMA-Nachweises auf Gefäßen.

In dieser Studie wurden mehrere unterschiedliche Parameter erhoben und diese mit den klinikopathologischen Parametern der Patientinnen und des Tumors selbst verglichen. Hiermit sollte untersucht werden, ob die Expression des PSMA's beim Mammakarzinom eventuell mit einigen Tumor- oder Patientinnenmerkmalen assoziiert ist. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die zeitgleiche Expression des PSMA's (an den Tumorzellen und Tumormikrogefäßen) in den Primärtumorproben signifikant mit dem histologischen Typ, dem Grading und dem Ki67-Level assoziiert ist. Invasiv duktales Karzinome oder Tumore mit einem höheren Grading oder Ki67-Level hatten einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der zeitgleichen PSMA Expression in den Tumorzellen und in den Tumormikrogefäßen ($p=0,026$, $p=0,002$ und $p=0,041$ jeweils). Außerdem konnte eine Signifikanz zwischen dem IRS, der Anzahl an PSMA-positiven Gefäßen und dem M-Stadium der Patientinnen nachgewiesen werden ($p=0,009$ und $p=0,050$ jeweils). Somit scheint eine stärkere PSMA Expression bei Mammakarzinomen, die Fernmetastasen bilden, stattzufinden.

Wernicke et al. hatten in ihrer Studie ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen der PSMA Expression in den Gefäßen (die entweder $<5\%$, $5-50\%$ oder $>50\%$ der Gesamtzahl an Gefäßen betrug) und dem Ki67-Level oder dem Grading ($p<0,0001$ jeweils). *Tolkach et al.* fanden ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen der PSMA Expression und dem Grading heraus ($p=0,002$). Außerdem waren die von ihnen untersuchten invasiv duktales Mammakarzinome signifikant mit einer stärkeren PSMA Expression assoziiert ($p=0,01$). In deren Studie wurde jedoch für den statistischen Vergleich zwischen den klinikopathologischen Parametern und der Expression des PSMA's nur die Intensität der Färbung in den Gefäßen herangezogen. Weder *Wernicke et al.* noch *Tolkach et al.* konnten einen signifikanten

Unterschied zwischen PSMA-Positivität der Gefäße und dem Lymphknotenstatus nachweisen [92] [103]. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der hier vorliegenden Studie überein.

Tolkach et al. fanden eine höhere PSMA Expression in den Tumormikrogefäßen vor allem bei Hormonrezeptor und triple negativen Mammakarzinomen ($p=1.9e-06$ und $p=0,006$). Die PSMA Expression der triple negativen Tumore war 4,5-mal höher als bei den anderen Tumoren. Deren Studie testete Gewebeproben von 47 (14,9%) hormonrezeptornegativen und von 33 (10,5%) triple negativen Tumore [92]. *Wernicke et al.* konnten ebenfalls eine höhere Anzahl an PSMA-positiven Gefäßen bei Östrogen- ($p<0,0001$) und Progesteronrezeptor negativen ($p=0,03$) Tumoren nachweisen. Sie untersuchten 12 (11%) Gewebeproben von Östrogen- und 24 (24%) Progesteronrezeptor negativen Tumoren. In dieser Studie hingegen konnte keine Assoziation zwischen der Expression des PSMA und dem Hormonrezeptorstatus belegt werden. Dies könnte an der geringen Fallzahl liegen (11 (15,3%) Proben waren Östrogenrezeptor negativ, 49 (68,1%) Progesteronrezeptor negativ und nur 9 (12,5%) triple negativ).

Außerdem konnte kein Zusammenhang zwischen der gepaarten PSMA Expression (also der zeitgleichen Expression in den Gefäßen und in den Tumorzellen) und dem allgemeinen- und metastasefreien Überleben nachgewiesen werden. Auch die alleinige Expression des PSMA in der Tumorneovaskulatur, welche in der hier vorliegenden Studie durch den MVD-IRS objektiviert wurde, hatte in obigen statistischen Auswertung keinen Einfluss auf die Prognose der Patientinnen. Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen dem allgemeinen Überleben und der PSMA Expression an den Tumorzellen nachgewiesen werden ($p=0,027$). *Tolkach et al.*, welche im Jahre 2018 Ergebnisse zu der Expression des PSMA bei 315 Patientinnen veröffentlichten, konnten keine signifikante Assoziation zwischen der PSMA Expression und dem Überleben nachweisen [92]. *Wernicke et al.* hingegen, konnten nachweisen, dass eine höhere PSMA Expression in der Tumorneovaskulatur mit einem schlechteren allgemeinen Überleben assoziiert ist. In deren Auswertung wurde jedoch nur berücksichtigt, ob weniger oder mehr als 50% der Gefäße PSMA-positiv waren [102].

Diese gegensächlichen Ergebnisse könnten aufgrund der unterschiedlichen Erhebung der immunhistochemischen Parameter entstanden sein. In dieser Studie wurde analog nach dem IRS von *Remmele und Stegner* vorgegangen [76]. Diese Methode wurde gezielt ausgewählt, um gegebenenfalls als Standard für weitere Untersuchungen des PSMA angewendet werden zu können.

Das Mammakarzinom metastasiert aufgrund seiner Nähe zu den Lymphabflussgebieten hauptsächlich in den Lymphknoten. Es gibt außerdem eine weitere Anzahl an Fernmetastasierungsorten, wie beispielsweise in den Knochen [10]. Der Nachweis einer PSMA Expression in den Metastasen des Mammakarzinoms könnte möglicherweise die Indikation einer PSMA-gerichteten antiangiogenetischen Therapie festigen. Beim Prostatakarzinom ist bereits weitgehend erforscht und bestätigt worden, dass das PSMA nicht nur im Primarius,

sondern auch in den Lymphknoten- und Fernmetastasen exprimiert wird [69]. Bisher wurden nur sehr wenige Metastaseproben eines Mammakarzinoms auf die Expression des PSMA hin erforscht.

Dies wurde in dem Design dieser Studie berücksichtigt. Es wurden 18 Lymphknotenmetastaseproben des Patientinnenkollektivs untersucht. Auch bei den Lymphknotenmetastasen wurde sowohl die PSMA Immunoreaktivität der Tumorzellen als auch die der Gefäße bestimmt. Die Anfärbung des PSMA war in 7 (38,9%) Fällen negativ und in 11 (61,1%) Fällen positiv. Außerdem war der MVD-IRS in 6 (33,3%) Fällen negativ und in 12 (66,7%) Fällen positiv. Insgesamt hatten 10 (55,6%) Fälle sowohl PSMA-positive Gefäße als auch PSMA-positive Tumorzellen. Somit wird das PSMA nicht nur im Primarius eines Mammakarzinoms, sondern auch in dessen Lymphknotenmetastasen exprimiert.

Bei 17 dieser Proben konnte die Ausprägung der PSMA-Expression im Primarius und in der Lymphknotenmetastase derselben Patientin verglichen werden. Es stellte sich dabei heraus, dass die Expression des PSMA im Primarius und dessen Lymphknotenmetastasen nicht in jedem Fall dieselbe ist. Es zeigte sich aber auch, dass das PSMA in den Primärtumor- und in den Lymphknotenmetastaseproben signifikant miteinander zusammenhängen. Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass eine höhere Anzahl an PSMA-positiven Gefäßen im Primarius signifikant mit einer höheren Anzahl an PSMA-positiven Gefäßen in den Lymphknotenmetastasen korreliert.

Außerdem wurden in dieser Studie 12 Fernmetastaseproben untersucht. Auch hier wurden sowohl die Gefäße als auch die Tumorzellen auf eine etwaige PSMA Expression hin untersucht. 3 (25%) Fälle waren an den Tumorzellen PSMA-negativ 9 (75%) hingegen positiv. 1 (11,1%) Fall war an den Tumormikrogefäßen PSMA-negativ und 8 (88,9%) hingegen positiv. Insgesamt waren 6 (66,7%) Fernmetastaseproben sowohl an den Tumorzellen als auch an den Tumormikrogefäßen PSMA-positiv.

Somit war die PSMA Expression der 12 Fernmetastaseproben, die in dieser Studie untersucht wurden, in den Gefäßen stärker ausgeprägt als in den Tumorzellen. Die Expression des PSMA in den 7 gepaarten Fällen aus dem Primarius und dessen Fernmetastasen (3 Knochen- und 4 Gehirnmetastasen) war nicht identisch. In 3 Fällen hatte der Primärtumor MVD-IRS einen negativen Score und die Gehirnmetastase derselben Patientin jedoch einen positiven Score. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der PSMA Expression im Primarius und dessen Fernmetastase nachgewiesen werden.

Weitere Studien befassten sich ebenfalls mit der PSMA Expression bei Brustkrebsmetastasen. Allerdings wurde bisher nur eine begrenzte Anzahl an Fällen untersucht. *Nomura et al.* testeten 5 Gehirnmetastasen eines Mammakarzinoms. Die Expression des PSMA in der Tumorneovaskulatur der Metastasen war 3-mal höher als die des gesunden Gehirngewebes

($p=0,007$). Außerdem war die Ausprägung der PSMA Expression in den Gehirnmetastasen und deren Primarius in den 4 untersuchten gepaarten Fällen unterschiedlich. Bei drei Patientinnen waren deren Gehirnmetastasen weniger PSMA-positiv als deren Brusttumore [64]. *Wernicke et al.* testeten 14 Gehirnmetastaseproben. Diese exprimierten allesamt (100%) das PSMA. In 10 Fällen konnte die Expression des Primärtumors mit der korrespondierenden Fernmetastase verglichen werden. Hier war die PSMA-Expression im Primarius und dessen Gehirnmetastase gleich [102]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können aufgrund der niedrigen untersuchten Fallzahl entstanden sein. Außerdem wurde in diesen Studien andere Methoden angewendet, um die Immunreaktivität des PSMA zu erheben. Da in der hier vorliegenden Studie die Immunreaktivität des PSMA im Primarius und in den Fernmetastasen unterschiedlich gewesen ist, ist es ersichtlich, dass aus dem Ausmaß der Expression des PSMA im Primarius nicht auf dessen Expression in den Fernmetastasen geschlossen werden kann. Es wurden jedoch jeweils nur sehr wenige Proben getestet.

In einer zweiten Methode wurde in der hier vorliegenden Studie die genaue Kollokalisierung des CD31 und des PSMA nachgewiesen. Dies wurde in den immunhistochemischen Färbungen bereits untersucht, aber es wurden immer jeweils ein Gewebeschnitt mit dem PSMA und ein Gewebeschnitt mit dem CD31 Primärantikörper inkubiert. In dieser Methode konnte nämlich die PSMA Expression auf den Tumormikrogefäßen morphologisch identifiziert werden, ohne jedoch eine genaue Aussage über dessen Lokalisation machen zu können. Mittels Immunfluoreszenz konnten die untersuchten Paraffinschnitte zeitgleich mit einem CD31 und einem PSMA Primärantikörper benetzt werden. Durch das Schwenken der Sperrfilter und das Zusammenführen der Fotografien der CD31 und der PSMA Färbung konnte nachgewiesen werden, dass das PSMA auf der Tumorneovaskulatur des Mammakarzinoms und dessen Lymphknoten- und Fernmetastasen vorliegt. Diese Methodik wurde bereits von *Haffner et al.* angewendet und zeigte auch beim Magen- und kolorektalen Karzinom, dass das PSMA von den Tumormikrogefäßen exprimiert wird [36].

Leider wurde diese Methodik nur bei einer geringen Fallzahl verwendet. Diese Studie ist jedoch die bisher einzig veröffentlichte, die diese genaue Kollokalisierung bei Mammakarzinompatientinnen nachweist [44].

Spatz et al. [88] und *Tolkach et al.* [92] entwickelten eine andere Methode, um die Anzahl an PSMA-positiven Gefäßen zu quantifizieren. Hierfür wurden Ergebnisse aus dem [the] Cancer Genome Atlas Data evaluiert. Die Anzahl an PSMA mRNA Kopien wurde mit der Anzahl an CD34 und *erythroblast transformation specific-related gene* [Erythroblastentransformationsspezifisches verwandtes Gen] verglichen. Mit dieser Methode konnte die Subjektivität des MVD-Zählens beseitigt werden. Allerdings konnte die genaue Lokalisation des PSMA auf den Tumormikrogefäßen nicht nachgewiesen werden.

Das PSMA befindet sich bei vielen bösartigen Erkrankungen restriktiv auf der Neovaskulatur des Tumors, wie beispielsweise das Lungen- oder das kolorektale Karzinom [36] [96]. Dies weist darauf hin, dass das PSMA eine Funktion für die Endothelzellen hat. Es ist bisher jedoch nicht ganz geklärt, ob das PSMA selber eine Rolle bei der Gefäßneubildung spielt und dieses Protein eine geeignete Zielstruktur für eine antiangiogenetische Therapie wäre.

Bei der Behandlung von onkologischen Erkrankungen sollte man antiangiogenetische Therapien klar von denen unterscheiden, die die Gefäße als Zielstruktur haben (*vascular targeting agents*, VTAs). Einerseits wird die Gefäßneubildung und die Endothelzellproliferation verhindert, andererseits wird der Blutfluss zum Tumor durch Zerstörung ebendieser Gefäße unterbunden [84]. Der Nutzen einer Therapie mit VTAs wurde bereits nachgewiesen. Es führt beispielsweise bei Mausmodellen zur vollständigen Okklusion der Tumorgefäße mit Unterbindung der Sauerstoffversorgung. Dies bewirkt eine Tumorregression [13]. Generell können VTAs zu einer schnellen Verminderung des Blutflusses und somit zur Nekrose von Tumorzellen führen. VTAs verstopfen vor allem die Gefäße im Inneren eines Tumors da dort ein höherer Druck herrscht, welcher das Zusammenfallen der Gefäße bei Okklusion unterstützt [91]. Dadurch überleben jedoch die Tumorzellen in der Peripherie des Tumors, welche dann die gesunden Gefäße in ihrer Umgebung für die Versorgung mit Nährstoffen nutzen können. Die Gefäße des normalen Gewebes werden durch die VTA nicht beeinflusst [84].

Das Avastin® verhindert die Gefäßneubildung in einem Tumor [94]. Es ist also eine antiangiogenetische Therapie. Antiangiogenetische Therapien sind hauptsächlich gegen Tumorzellen in der Peripherie des Tumors wirksam, da dort mehr neue Blutgefäße entstehen [91]. Bisher sind nur wenige antiangiogenetische Therapien als Monotherapie von der FDA zugelassen [84]. Das Avastin® hat sich bereits als eine effektive Therapie des metastasierten Mammakarzinoms erwiesen [30] [33] [57] [71] [78]. Dessen Zulassung wurde jedoch in den Vereinigten Staaten unter anderem aufgrund der Nebenwirkungen, die es verursacht, zurückgezogen [17].

Die Kombination aus einer angiogenetischen Therapie und einem VTA hat bereits einen positiven synergistischen Effekt zur Therapie von Tumorerkrankungen gezeigt [91], da sowohl bereits bestehende als auch neu geformte Gefäße für das Überleben eines Tumors unverzichtbar sind [84]. Die Kombination aus diesen beiden Therapiearten ermöglicht die Zerstörung der neuen und der bereits bestehenden Gefäße.

Die genaue Funktion des PSMA ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Ein von *Bradbury et al.* erstelltes in vitro Modell zeigte, dass Brustkrebszelllinien, bei denen das PSMA Gen herunterreguliert wurde, eine niedrigere Zellproliferation und –adhäsion aufweisen. Aufgrund dessen ist die Migrationskapazität dieser Zellen reduziert [9]. Außerdem erklärten *Caromile et al.*, dass das PSMA durch eine Assoziation mit dem RACK1 das Signal zwischen dem β 1-

Integrin und dem IGF-1R unterbricht, was zu einer vermehrten Proliferation von Tumorzellen führt [15].

Grant et al. konnten außerdem in einem Mausmodell nachweisen, dass das PSMA eine VEGF unabhängige Rolle bei der okulären Neovaskularisation spielt. Mäuse, bei denen das PSMA-Gen herunterreguliert wurde, hatten unter hypoxischen Zuständen halb so viele retinale Gefäße wie die Wildtyp-Mäuse. Die Gefäße der PSMA-null Mäuse waren hoch organisiert. Die Gefäße der Wildtyp-Mäuse hingegen, waren geschlängelt und chaotisch angeordnet. Somit scheint das PSMA der pathologischen Neovaskularisation in der Retina beizutragen [32]. Ist das PSMA jedoch auch bei der pathologischen Angiogenese von bösartigen Erkrankungen involviert?

Conway et al. konnten nachweisen, dass Mäuse, bei denen das PSMA Gen ausgeschaltet wurde (*PSMA null-mice*), eine gestörte Angiogenese haben. Auch bei den Wildtyp-Mäusen, denen ein PSMA Inhibitor per Injektion verabreicht wurde, wurden deutlich weniger Kapillaren gebildet. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die molekularen Mechanismen, die die Rolle des PSMA bei der Angiogenese ausmachen. Dabei scheint das PSMA, die laminin-spezifische $\beta 1$ Integrin Funktion zu modulieren. Die Inhibition des PSMA führte zu einer reduzierten Aktivität und Aktivierung der $\beta 1$ Integrine, ohne deren Expression zu beeinflussen. Dabei ist das PSMA für die initiale Ligandenbindung des $\beta 1$ Integrins verantwortlich. Das PSMA scheint an einer regulatorischen Schleife teil zu haben, bei der das $\beta 1$ Integrin und PAK1 involviert sind, welche die Zellinvasion im Rahmen der Angiogenese unterstützen [20]. Insbesondere scheint das PSMA die Angiogenese über die Hydrolyse eines Lamininfragments zu regulieren. Das daraus resultierende Dipeptid ist angiogenetisch und aktiviert die endotheliale Integrin-Signaltransduktionskaskade. Dieses Dipeptid erhöht nämlich die Angiogenese in vitro (und führt zu einer stärkeren Adhäsion von human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)) und in vivo in Mausmodellen [21].

Godron et al. hingegen suggerierten, dass die PSMA-induzierte Folsäureaufnahme für die Regeneration der endothelialen Stickoxid-Synthase (eNOS) essenziell ist, welche für die Angiogenese unabdinglich ist. Tatsächlich regeneriert die aktive Form der Folsäure, das 5-methyl-tetrahydrofolat (5-MTHF) das Tetrahydrobiopterin. Das Tetrahydrobiopterin ist zur Regeneration der eNOS essenziell. Ohne diesen Cofaktor bildet die eNOS Superoxid-Radikale [83]. Somit könnte die enzymatische Funktion als Folathydrolase des PSMA nicht nur den lokalen Folsäurespiegel erhöhen, sondern durch diese dann mehr vorhandene Folsäure die Regeneration der eNOS unterstützen. Dieses Enzym ist für die Angiogenese essentiell. Über diesen Signalweg könnte das PSMA die Ausbildung von neuen Blutgefäßen unterstützen [31].

Liu et al. haben sich ebenfalls mit dieser Frage befasst. Diese Arbeitsgruppe stellte die Hypothese auf, dass die Tumormikroumgebung eventuell die Expression des PSMA auf den Gefäßen beeinflusst. Sie haben ein in vitro Modell erstellt, um das Vorhandensein des PSMA auf neuen Tumorgefäßen nachweisen zu können. HUVECs wurden in verschiedenen Medien

kultiviert und weitgehend untersucht. Die HUVECs wurden einerseits in VEGF enthaltenden Medien und andererseits in tumorkonditionierten Medien (*tumor conditioned medium*, TCM) herangezogen. Die TCM wurden aus verschiedenen Tumorzelllinien hergestellt. Dabei sind zwei Zelllinien von besonderem Interesse, die MCF-7 (eine Östrogenrezeptor positive) und die MDA-MB-231 (eine Östrogenrezeptor negative) Brustkrebszelllinie. Die HUVECs bildeten gefäßartige Rohrformationen in den VEGF enthaltenden Medien und in den TCM aus der MDA-MB-231 Zelllinie. Bei dem Medium aus der MCF-7 Zelllinie wurden nur unvollständige Gefäße gebildet. Außerdem konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass die neugebildeten Gefäße in dem TCM der MDA-MB-231 Zelllinie das PSMA stark exprimieren, im Gegensatz zu den Gefäßen, die in den VEGF-haltigen Medien kultiviert wurden. Somit scheint diese Östrogenrezeptor-negative Zelllinie Faktoren zu sezernieren, die die PSMA Expression auf Gefäßen fördert. Außerdem markierten fluoreszierende PSMA Inhibitoren die Gefäße in dem TCM der MDA-MB-231 Zelllinie [51]. Das *in vitro* Modell von *Conway et al.* unterstützt diese Hypothese. Sie zeigten in Ihrer Studie, dass PSMA-negative Endothelzellen eine gestörte Invasion in Matrigel (eine basalmembranartige Matrix, die den Konditionen einer Tumorumgebung entspricht) aufweisen. Diese Ergebnisse wurden bei HUVECs, die durch PSMA Inhibitoren gehemmt wurden, bestätigt [20]. Außerdem wurde die Vermutung, dass sich Tumorzellen und HUVECs gegenseitig beeinflussen und dadurch die Expression des PSMA induziert wird, weitgehend von *Nguyen et al.* untersucht. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass tumorkonditionierte Medien, welche aus unterschiedlichen humanen Krebszelllinien hergestellt wurden, eine Expression des PSMA auf HUVECs *in vitro* hervorruft. Diese Zelllinien induzierten ebenfalls die Expression des PSMA *in vivo*, wenn sie mit HUVEC in einem Mausmodell implantiert wurden. Somit wird das PSMA wahrscheinlich durch Faktoren induziert, welche von den Tumorzellen sezerniert werden. Außerdem internalisieren PSMA-exprimierende HUVECs den Antikörper J591, welcher das extrazelluläre Epitop des PSMA bindet [62].

Zusammenfassend scheint das PSMA ebenfalls angiogenetisch aktiv zu sein und die Neubildung von Gefäßen zu unterstützen.

Zudem könnte das PSMA, durch die Unterstützung der Neoangiogenese und dessen Expression auf Tumormikrogefäßen, sowohl eine geeignete Zielstruktur für eine antiangiogenetische Therapie als auch für eine VTA Therapie sein.

Da das PSMA sowohl eine Rolle bei der Tumorneoangiogenese spielt als auch spezifisch auf den Tumormikrogefäßen exprimiert wird, wurden bereits therapeutische und bildgebende Methoden entwickelt, welche sich die Expression des PSMA und dessen enzymatische Aktivität zunutze machen.

Sathkedge et al. führten bei einer 33-jährigen Patientin, die an einem metastasierten Mammakarzinom erkrankt war ein ^{68}Ga -PSMA und ein ^{18}F -FDG-PET/CT zum Restaging durch. Diese bildgebenden Untersuchungen hatten eine starke Anreicherung im Achsen- und

Extremitätenskelett, sowie in den Lebermetastasen [81]. Diese Untersuchung wurde bei einer größeren Patientinnenkohorte (n=19) wiederholt und zeigte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse [82]. Daraus kann man schließen, dass das ^{68}Ga -PSMA PET CT eventuell wertvolle diagnostische Informationen bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom liefern könnte. Außerdem führten *Kasoha et al.* ebenfalls ein ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC PET CT bei einer Patientin mit einem knochenmetastasierten Mammakarzinom durch. Diese bildgebende Untersuchung ermöglichte die Visualisierung von all den bereits bekannten Knochenmetastasen [44]. Die PSMA-spezifische Bildgebung ermöglicht einen nicht-invasiven Nachweis des PSMA in Lymphknoten- und Fernmetastaseproben. In der hier vorliegenden Studie war die Expression des PSMA an Lymphknoten- und Fernmetastase anders als die des korrespondierenden Primärtumors. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression in den Fernmetastasen und dem Primarius eines Mammarzinoms nachgewiesen werden. Durch die Bildgebung könnte jedoch der immunhistochemische Nachweis des PSMA aus invasiv entnommenen Gewebeproben vermieden werden und trotzdem das Vorhandensein des PSMA an den Metastasen eines Mammakarzinoms überprüft werden.

Somit könnte die PSMA-Bildgebung dazu beitragen, die Mammakarzinome zu selektieren, welche stark PSMA positiv sind und dessen Metastasen das PSMA exprimieren. Ebendiese Mammakarzinome könnten von einer PSMA-gerichteten Therapie profitieren. Außerdem könnte die Bildgebung zum Therapiemonitoring verwendet werden.

Die bisher erforschten PSMA-gerichteten Therapien haben ihren Nutzen beim Prostatakarzinom bereits erwiesen und deren Nebenwirkungen sind vertretbar [3] [74] [108]. Diese Therapiemöglichkeit wird jedoch bereits bei anderen Tumorentitäten erforscht. In einer Phase I Studie zum Beispiel, ist das PSMA die Zielstruktur einer Docetaxel-enthaltenden Nanopartikel BIND-014 Therapie. Diese Therapie wird bei Patienten, die an einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung leiden, angewendet. Eine Patientin, die an einem lymphknotenmetastasierten Zervixkarzinom erkrankt war, zeigte unter dieser Therapie eine vollständige Remission. In der Bildgebung konnten ebenfalls bei anderen Tumorentitäten und bei einem Mammakarzinom eine Remission nachgewiesen werden. Die Nebenwirkungen der Therapie waren hinnehmbar. Es handelte sich dabei hauptsächlich um hämatotoxische Nebenwirkungen wie dem Auftreten einer Neutropenie. Außerdem trat in einigen Fällen beispielsweise Diarrhoe, Übelkeit oder eine Alopezie auf. Die aufgetretene Hämatotoxizität war der des Docetaxels sehr ähnlich [38].

Eine andere Phase I Studie konnte nachweisen, dass die tumorassoziierte Neovasculatur von mehreren fortgeschrittenen metastastischen soliden Tumorerkrankungen spezifisch mit einem Indium-111-markierten Antikörper (J591) als Therapieziel verwendet werden kann. Das J591 bindet die extrazelluläre Domäne des PSMA. Allerdings konnte keine Regression der Tumorerkrankung objektiviert werden. Die Toxizität dieser Therapie war ebenfalls akzeptabel

[58]. Somit werden bisher erfolgsversprechende PSMA-Therapien auch bei anderen Tumorentitäten als dem Prostatakarzinom untersucht und getestet.

In einigen Fallberichten wird auch die Anwendung einer PSMA-gerichteten Therapie bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom beschrieben. *Tolkach et al.* zum Beispiel, verwendeten eine ^{177}Lu -PSMA-Therapie bei einer 38-jährigen Patientin, die an einem triple-negativen Mammakarzinom erkrankt war. Diese Therapie wurde zwar gut toleriert, aber nach vier Wochen trat ein neuer Progress auf. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Zyklen der Therapie verabreicht [92]. Die bereits erwähnte Studie von *Von Hoff et al.* testete die Docetaxel-BIND-014 Therapie ebenfalls bei einer Brustkrebspatientin. Diese 39-jährige Patientin erhielt 21 Zyklen der Therapie und zeigte ein partielles Ansprechen darauf [38].

Leider sind antiangiogenetische Therapien mit einem Paradigma vergesellschaftet: sie basieren darauf, dass der Tumor aufgrund der Unterbrechung der Blutversorgung hypoxisch wird und es anschließend zur Apoptose der Tumorzellen kommt. Die antiangiogenetischen Therapien führen hauptsächlich zu Fluktuationen des Sauerstoffgehalts in den soliden Tumoren. Reoxygenierte Zellen sollten durch das p53 apoptotisch werden. Leider adaptieren die bösartigen Zellen und ein Anteil an Hypoxie-resistenten Zellen wird durch verschiedene zelluläre Mechanismen überleben. Doch Tumorzellen, die ein verändertes p53 haben, werden dadurch nicht zerstört. Dadurch werden noch bösartigere Zellen selektioniert [79].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass das PSMA im Primarius, den Lymphknoten- und Fernmetastasen des Mammakarzinoms exprimiert wird. Es wird sowohl von den Tumorzellen als auch von den Tumormikrogefäßen exprimiert. Aus diesem Grund könnte es eine geeignete Zielstruktur für die Diagnostik und die Therapie des Mammakarzinoms darstellen. Die Fallberichte, die über die Anwendung von bildgebenden und therapeutischen PSMA-basierten Verfahren bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom referieren, waren, was die Bildgebung angeht, vielversprechend. Dennoch müssen die immunhistochemischen Methoden zur Bestimmung der PSMA Expression standardisiert werden um Studien zu diesem Thema objektiv vergleichen zu können. Außerdem muss die Expression des PSMA in den Fernmetastasen des Mammakarzinoms bei einer größeren Anzahl an Proben getestet werden, um nachvollziehen zu können, ob man von der Expression im Primarius auch auf die der Fernmetastase schließen kann. Zur weiteren Beurteilung des PSMA als prognostischer Marker bei Patienten mit einem Mammakarzinom sind weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv notwendig.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adair TH, Montani J-P (2010) Overview of Angiogenesis. Morgan & Claypool Life Sciences
2. Afshar-Oromieh A, Avtzi E, Giesel FL, Holland-Letz T, Linhart HG, Eder M, Eisenhut M, Boxler S, Hadaschik BA, Kratochwil C, Weichert W, Kopka K, Debus J, Haberkorn U (2014) The diagnostic value of PET/CT imaging with the ⁶⁸Ga-labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 42:197–209
3. Ahmadzadehfar H, Eppard E, Kürpig S, Fimmers R, Yordanova A, Schlenkhoff CD, Gärtner F, Rogenhofer S, Essler M (2016) Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Oncotarget* 7:12477–12488
4. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ (1991) Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 114:1059–1068
5. Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD (1945) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. i. vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 6:73–85
6. Ausprunk DH, Folkman J (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14:53–65
7. Bacich DJ, Pinto JT, Tong WP, Heston WDW (2001) Cloning, expression, genomic localization, and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen/NAALADase/folate hydrolase. *Mamm Genome* 12:117–123
8. Bacich DJ, Ramadan E, Keefe DSO, Bukhari N, Wegorzewska I, Ojeifo O, Olszewski R, Wrenn CC, Bzdega T, Wroblewska B, Heston WDW, Neale JH (2002) Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N -acetylaspartylglutamate. *J Neurochem* 83:20–29
9. Bradbury R, Jiang WENG, Cui Y (2016) MDM2 and PSMA Play Inhibitory Roles in Metastatic Breast Cancer Cells Through Regulation of Matrix Metalloproteinases. *Anticancer Res* 36:1143–1151
10. Braun S, Kiechle M, Harbeck N (2002) Mammakarzinom Biologische Grundlagen, Klassifikation und prognostische Faktoren. *Internist* 43:329–339
11. Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW (1996) Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 174:126–31
12. Bundesamt S (2016) Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs. URL:

<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html>

13. Burrows FJ, Thorpe PE (1993) Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8996–9000
14. Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249–57
15. Caromile LA, Shapiro LH (2017) PSMA redirects MAPK to PI3K-AKT signaling to promote prostate cancer progression. *Mol Cell Oncol* 4:1–3
16. Carter RE, Feldman AR, Coyle JT, Sciences M, Hopkins J (1996) Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:749–753
17. Center for Drug Evaluation and Research Drug Safety and Availability - Avastin (bevacizumab) Information. Center for Drug Evaluation and Research URL: <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm193900.htm>
18. Chang SS, Reuter VE, Heston WDW, Bander NH, Grauer LS, Gaudin PB (1999) Five Different Anti-Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA) Antibodies Confirm PSMA Expression in Tumor-associated Neovasculature. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/13/3192.full-text.pdf>
19. Chang SS, O'keefe DS, Bacich DJ, Reuter VE, Heston WDW, Gaudin PB (1999) Prostate-specific Membrane Antigen Is Produced in Tumor-associated Neovasculature. *Clin cancer Res* 5:2674–2681
20. Conway RE, Li Z, Wu D, Petrovic N, Shapiro LH, Heston W (2006) Prostate-Specific Membrane Antigen Regulates Angiogenesis by Modulating Integrin Signal Transduction. *Mol Cell Biol* 26:5310–5324
21. Conway RE, Rojas C, Alt J, Nováková Z, Richardson SM, Rodrick TC, Fuentes JL, Richardson NH, Attalla J, Stewart S, Fahmy B, Barinka C, Ghosh M, Shapiro LH, Slusher BS (2016) Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-mediated laminin proteolysis generates a pro-angiogenic peptide. *Angiogenesis* 19:487–500
22. De Young BR, Frierson HF, Ly MN, Smith D, Swanson PE (1998) CD31 immunoreactivity in carcinomas and mesotheliomas. *Am J Clin Pathol* 110:374–377
23. Delisser HM, Newman PJ, Albelda SM (1994) Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15:490–495
24. Devlin AM, Ling E-H, Peerson JM, Fernando S, Clarke R, Smith AD, Halsted CH (2000) Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. *Hum Mol Genet* 9:2837–2844
25. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Hull W-E, Wängler C, Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M (2012) ⁶⁸ Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-

-
- Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. *Bioconjug Chem* 23:688–697
26. Eder M, Eisenhut M, Babich J, Haberkorn U (2013) PSMA as a target for radiolabelled small molecules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 40:819–823
 27. European Medicines Agency (2017) Avastin, Bevacizumab. URL: www.ema.europa.eu/contact
 28. Folkman J (1999) What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4–7
 29. Ghosh A, Wang X, Klein E, Heston WDW (2005) Novel Role of Prostate-Specific Membrane Antigen in Suppressing Prostate Cancer Invasiveness. *Cancer Res* 1:727–732
 30. Gianni L, Romieu GH, Lichinitser M, Serrano S V, Mansutti M, Pivot X, Mariani P, Andre F, Chan A, Lipatov O, Chan S, Wardley A, Greil R, Moore N, Prot S, Pallaud C, Semiglazov V (2013) AVEREL: a randomized phase III Trial evaluating bevacizumab in combination with docetaxel and trastuzumab as first-line therapy for HER2-positive locally recurrent/metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 31:1719–25
 31. Gordon IO, Tretiakova MS, Noffsinger AE, Hart J, Reuter VE, Al-Ahmadie HA (2008) Prostate-specific membrane antigen expression in regeneration and repair. *Mod Pathol* 21:1421–1427
 32. Grant CL, Caromile LA, Durrani K, Rahman MM, Claffey KP, Fong GH, Shapiro LH (2012) Prostate specific membrane antigen (PSMA) regulates angiogenesis independently of VEGF during ocular neovascularization. *PLoS One* 7:1–10
 33. Gray R, Bhattacharya S, Bowden C, Miller K, Comis RL (2009) Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27:4966–72
 34. Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ (1994) Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* 86:614–9
 35. Guinebretière J-M, Monique GL, Gavaille A, Bahi J (1994) Angiogenesis and Risk of Breast Cancer in Women With Fibrocystic Disease. *J Natl Cancer Inst* 86:635–636
 36. Haffner MC, Kronberger IE, Ross JS, Sheehan CE, Zitt M, Mühlmann G, Öfner D, Zelger B, Ensinger C, Yang XJ, Geley S, Margreiter R, Bander NH (2009) Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. *Hum Pathol* 40:1754–1761
 37. Halsted CH, Baugh CM, Butterworth CE (1975) Jejunal perfusion of simple and conjugated folates in man. *Gastroenterology* 68:261–9
 38. Hoff DD Von, Mita MM, Ramanathan RK, Weiss GJ, Mita AC, Lorusso PM, Iii HAB, Hart LL, Low SC, Parsons DM, Zale SE, Summa JM, Youssou H, Sachdev JC (2016) Phase I Study of PSMA-Targeted Docetaxel- Containing Nanoparticle BIND-014 in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 22:3157–3164

39. Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA (1980) The LNCaP cell line-a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37:115–32
40. Horoszewicz JS, Kawinski E, Murphy GP (1980) Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res* 7:927–35
41. Israeli RS, Powell CT, Fair WR, Heston WDW (1993) Molecular Cloning of a Complementary DNA Encoding a Prostate-specific Membrane Antigen. *Cancer Res* 53:227–230
42. Jacquemier JD, Penault-Llorca FM, Bertucci F, Sun ZZ, Houvenaeghel GF, Geneix JA, Puig BD, Bardou VJH, Hassoun JA, Birnbaum D, Viens PJ (1998) Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: A multiparametric and immunohistochemical analysis. *J Pathol* 184:130–135
43. Jean-Francois Chatal CAH (1999) Radionuclide therapy. *Lancet* 354:931–35
44. Kasoha M, Unger C, Solomayer E-F, Bohle RM, Zaharia C, Khreich · Fadi, Wagenpfeil S, Ingolf Juhasz-Böss · (2017) Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases. *Clin Exp Metastasis* 34:479–490
45. Kinoshita Y, Kuratsukuri K, Landas S, Imaida K, Rovito PM, Wang CY, Haas GP (2006) Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J Surg* 30:628–636
46. Koch-Institut R (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile
47. Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (2018) Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs.
48. Kreienberg R, Janni W, Stüber T, Albert U-S, Scharl A, Wöckel A (2018) Clinical practice guideline: The screening, diagnosis, treatment, and follow-up of breast cancer. *Dtsch Arzteblatt Online* 115:
49. Kurz H, Burri PH, Djonov VG (2015) Angiogenesis and Vascular Remodeling by Intussusception: From Form to Function. *News Physiol Sci* 18:65–70
50. Liu H, Rajasekaran AK, Moy P, Xia Y, Kim S, Navarro V, Rahmati R, Bander4 NH (1998) Constitutive and Antibody-induced Internalization of Prostate-specific Membrane Antigen. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/58/18/4055.full-text.pdf>
51. Liu T, Jabbes M, Nedrow-Byers JR, Wu LY, Bryan JN, Berkman CE (2011) Detection of prostate-specific membrane antigen on HUVECs in response to breast tumor-conditioned medium. *Int J Oncol* 38:1349–1355

-
52. Löffler G, Petrides P.E. HPC (2007) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
 53. Lv Q, Yang J, Zhang R, Yang Z, Yang Z, Wang Y, Xu Y, He Z (2018) Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Therapy of Prostate Cancer Using a DUPA–Paclitaxel Conjugate. *Mol Pharm* 15:1842–52
 54. Maurer T, Eiber M, Schwaiger M (2016) Current use of PSMA–PET in prostate cancer management. *Nat Rev Urol* 13:226–235
 55. McCulloch P, Choy A, Martin L (1995) Association between tumour angiogenesis and tumour cell shedding into effluent venous blood during breast cancer surgery. *Lancet* (London, England) 346:1334–5
 56. Mhawech-Fauceglia P, Zhang S, Terracciano L, Sauter G, Chadhuri A, Herrmann FR, Penetrante R (2007) Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: An immunohistochemical study using mutiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology* 50:472–483
 57. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE (2007) Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *New En* 357:2666–76
 58. Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Sheehan CE, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Ross JS, Bander NH (2007) Vascular Targeted Therapy With Anti – Prostate-Specific Membrane Antigen Monoclonal Antibody J591 in Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* 25:540–47
 59. Minner S, Wittmer C, Graefen M, Salomon G, Steuber T, Haese A, Huland H, Bokemeyer C, Yekebas E, Dierlamm J, Balabanov S, Kilic E, Wilczak W, Simon R, Sauter G, Schlomm T (2011) High level PSMA expression is associated with early psa recurrence in surgically treated prostate cancer. *Prostate* 71:281–288
 60. Mulisch M, Welsch U, Romeis B (2010) Romeis Mikroskopische Technik. Spektrum, Akad. Verl
 61. München - Bayerisches Krebsregister - Regionalzentrum München am Klinikum Großhadern ICD-10 C50: Mammakarzinom (Frauen) Inzidenz und Mortalität. URL: <https://www.tumorregister-muenchen.de>
 62. Nguyen DP, Xiong PL, Liu H, Pan S, Leconet W, Navarro V, Guo M, Moy J, Kim S, Ramirez-Fort MK, Batra JS, Bander NH (2016) Induction of PSMA and Internalization of an Anti-PSMA mAb in the Vascular Compartment. *Mol Cancer Res* 14:1045–1053
 63. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D (2008) Evaluation of microvascular density in tumors: Pro and contra. *Histol Histopathol* 23:601–607
 64. Nomura N, Pastorino S, Jiang P, Lambert G, Crawford JR, Gymnopoulos M, Piccioni D, Juarez T, Pingle SC, Makale M, Kesari S (2014) Prostate specific membrane antigen

(PSMA) expression in primary gliomas and breast cancer brain metastases. *Cancer Cell Int* 14:

65. O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, Horiguchi Y, Luo Y, Powell CT, Zandvliet D, Russell PJ, Molloy PL, Nowak NJ, Shows TB, Mullins C, Vonder Haar RA, Fair WR, Heston WDW (1998) Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1443:113–127
66. O'Keefe DS, Bacich DJ, Heston WDW (2001) *Prostate Cancer: Biology, Genetics and the New Therapeutics*. Humana Press, Totowa, NJ
67. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362:857–860
68. Osborne JR, Akhtar NH, Vallabhajosula S, Anand A, Deh K, Tagawa ST (2013) Prostate-specific membrane antigen-based imaging. *Urol Oncol* 31:144–154
69. Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Hautmann RE, Li H, Mo P, Gschwend JE, Kuefer R, Rubin MA (2007) Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol* 38:696–701
70. Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, Qiao CH, Lin S, Tong WP, May F, Mukherjee B, Heston WDW (1996) Prostate-specific Membrane Antigen: A Novel Folate Hydrolase in Human Prostatic Carcinoma Cells. *Clin cancer Res* 2:1445–1451
71. Pivot X, Schneeweiss A, Verma S, Thomssen C, Passos-Coelho JL, Benedetti G, Ciruelos E, von Moos R, Chang H-T, Duenne A-A, Miles DW (2011) Efficacy and safety of bevacizumab in combination with docetaxel for the first-line treatment of elderly patients with locally recurrent or metastatic breast cancer: Results from AVADO. *Eur J Cancer* 47:2387–2395
72. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146:873–887
73. Provenzale JM (2007) Imaging of Angiogenesis : Novel Imaging Methods. *Mol Imaging* 188:11–23
74. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, Haberkorn U, Schäfers M, Essler M, Baum RP, Kulkarni HR, Schmidt M, Drzezga A, Bartenstein P, Pfestroff A, Luster M, Lützen U, Marx M, Prasad V, Brenner W, Heinzl A, Mottaghy FM, Ruf J, Meyer PT, Heuschkel M, Eveslage M, Bögemann M, Fendler WP, Krause BJ (2017) German Multicenter Study Investigating ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med* 58:85–90
75. Rajasekaran AK, Anilkumar G, Christiansen JJ (2005) Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein ? *Am J Physiol Cell Physiol* 288:975–981
76. Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an

- immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8:138–40
77. Riede U-N, Werner M (2004) *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 5. Auflage edition. Springer Verlag GmbH
78. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, Perez EA, Yardley DA, Chan SYT, Zhou X, Phan S-C, O'Shaughnessy J (2011) RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 29:1252–60
79. Rohwer N, Cramer T (2011) Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat* 14:191–201
80. Ross JS, Schenkein D, Webb I, Gray G, Deeds J, Meyer R, McDonald A, Sheehan C, Gray K (2004) Expression of prostate specific membrane antigen in the neo-vasculature of non-prostate cancers. *J Clin Oncol* 22:
81. Sathekge M, Modiselle M, Vorster M, Mokgoro N, Nyakale N, Mokaleng B, Ebenhan T (2015) 68Ga-PSMA imaging of metastatic breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 42:1482–1483
82. Sathekge M, Lengana T, Modiselle M, Vorster M, Zeevaart J, Maes A, Ebenhan T, Van De Wiele C (2017) 68Ga-PSMA-HBED-CC PET imaging in breast carcinoma patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44:689–94
83. Schmidt TS, Alp NJ (2015) Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci* 113:47–63
84. Siemann DW, Chaplin DJ, Horsman MR (2017) Realizing the Potential of Vascular Targeted Therapy : The Rationale for Combining Vascular Disrupting Agents and Anti-Angiogenic Agents to Treat Cancer Realizing the Potential of Vascular Targeted Therapy : The Rationale for Combining Vascular Disrupting. *Cancer Invest* 35:519–34
85. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD, Cordon-Cardo C (1997) Prostate-specific Membrane Antigen Expression in Normal and Malignant Human Tissues. *Clin cancer Res* 3:81–85
86. Slusher BS, Vornov JJ, Thomas AG, Hurn PD, Harukuni I, Bhardwaj A, Traystman RJ, Robinson MB, Britton P, Lu X-CM, Tortella FC, Wozniak KM, Yudkoff M, Potter BM, Jackson PF (1999) Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury. *Nat Med* 5:1396–1402
87. Sodee DB, Malguria N, Faulhaber P, Resnick MI, Albert J, Bakale G, Centers TPI (2000) Multicenter ProstaScint Imaging findings in 2154 Patients with Prostate Cancer. *Adult Urol* 56:988–993
88. Spatz S, Tolkach Y, Jung K, Stephan C, Busch J, Ralla B, Rabien A, Feldmann G, Brossart P, Bundschuh RA, Ahmadzadehfar H, Essler M, Toma M, Müller SC, Ellinger J,

-
- Hauser S, Kristiansen G (2018) Comprehensive Evaluation of Prostate Specific Membrane Antigen Expression in the Vasculature of Renal Tumors: Implications for Imaging Studies and Prognostic Role. *J Urol* 199:370–377
89. Stauch Slusher B, Tsai G, Yoo G, Coyle JT (1992) Immunocytochemical localization of the N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) hydrolyzing enzyme N-acetylated α -linked acidic dipeptidase (NAALADase). *J Comp Neurol* 315:217–229
90. Tahergorabi Z, Khazaei M (2011) A Review on Angiogenesis and Its Assays. *Iran J Basic Med Sci* 15:1110–1126
91. Thorpe PE (2004) Vascular Targeting Agents as Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 10:415–427
92. Tolkach Y, Gevensleben H, Bundschuh R, Koyun A, Huber D, Kehrer C, Hecking T, Denise M, Paik K, Kaiser C, Ahmadzadehfar H, Essler M, Kuhn W, Kristiansen G (2018) Prostate - specific membrane antigen in breast cancer : a comprehensive evaluation of expression and a case report of radionuclide therapy. *Breast Cancer Res Treat*
93. Tomaszewski JJ, Cummings JL, Parwani A V., Dhir R, Mason JB, Nelson JB, Bacich DJ, O'Keefe DS (2011) Increased cancer cell proliferation in prostate cancer patients with high levels of serum folate. *Prostate* 71:1287–1293
94. Tumorzentrum München, Bauerfeind I, W. (2015) Mammakarzinome. 5. Auflage edition. Zuckschwerdt Verlag GmbH für Medizin u. Naturwissensch.
95. Tykvart J, Navrátil V, Sedlák F, Corey E, Colombatti M, Fracasso G, Koukolík F, Bařinka C, Šácha P, Konvalinka J (2014) Comparative analysis of monoclonal antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Prostate* 74:1674–1690
96. Wang H, Wang S, Song W, Pan Y, Yu H, Si T, Liu Y, Cui X, Guo Z (2015) Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Lung Cancer Cells and Tumor Neovasculature Endothelial Cells and Its Clinical Significance. *PLoS One* 10:
97. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma. *N Engl J Med* 324:1–8
98. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J (1993) Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143:401–9
99. Weidner N (1995) Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 147:9–19
100. Weidner N (1998) Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 184:119–122
101. Werner R (1997) Mechanisms of angiogenesis.pdf. *Nature* 386:671–674
102. Wernicke AG, Varma S, Greenwood EA, Christos PJ, Chao KSC, Liu H, Bander NH, Shin SJ (2014) Prostate-specific membrane antigen expression in tumor-associated vasculature of breast cancers. *Apmis* 122:482–489
103. Wernicke AG, Kim S, Liu H, Bander NH, Pirog EC (2016) Prostate-specific Membrane

-
- Antigen (PSMA) Expression in the Neovasculature of Gynecologic Malignancies : Implications for PSMA-targeted Therapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 00:1–6
104. Wibmer AG, Burger IA, Sala E, Weber WA, Vargas HA (2016) Molecular Imaging of Prostate Cancer. *RadioGraphics* 36:142–161
 105. Wright GL, Haley C, Beckett M Lou, Schellhammer PF (1995) Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 1:18–28
 106. Xu L, Wang Z, Li X-F, He X, Guan L-L, Tuo J-L, Wang Y, Luo Y, Zhong H-L, Qiu S-P, Cao K-Y (2013) Screening and identification of significant genes related to tumor metastasis and PSMA in prostate cancer using microarray analysis. *Oncol Rep* 30:1920–1928
 107. Yao V, Berkman CE, Choi JK, O’Keefe DS, Bacich DJ (2010) Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid. *Prostate* 70:305–316
 108. Zechmann CM, Afshar-Oromieh A, Armor T, Stubbs JB, Mier W, Hadaschik B, Joyal J, Kopka K, Debus J, Babich JW, Haberkorn U, Armor T, Joyal J, Babich JW, Stubbs JB, Hadaschik B, Kopka K (2014) Radiation dosimetry and first therapy results with a ¹²⁴I/¹³¹I-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 41:1280–1292
 109. Zhou J, Neale JH, Pomper MG, Kozikowski AP (2005) NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 4:1015–1026
 110. Uroweb - European Association of Urology (EAU). URL: <https://uroweb.org/>
 111. (2018) Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.1/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.1.pdf

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
σ	Korrelationskoeffizient nach Spearman
\pm	Standardabweichung
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
\tilde{x}	Median der Differenzen
5-MTHF	5-methyl-tetrahydrofolat
A.	Arteria
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AKT	Proteinkinase B
BET	brusterhaltende Therapie
BMI	body mass Index
BRCA 1	breast cancer gene 1
BRCA 2	breast cancer gene 2
BSA	Bovine Serum Albumin Fraction V
CA 15-3	cancer antigen 15-3
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAPI	4'6-diamidin-2-phenylindol
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DKFZ	deutsches Krebsforschungszentrum
DUPA	(2-[3-(1,2dicarboxypropylureido)]pentanedioic acid)]
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendiaminetetracetat
eNOS	endotheliale Stickoxid Synthase
ER	Östrogenrezeptor
ERK1/2	extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2
FAK	fokale Adhäsionskinase [focal adhesion Kinase]
FDA	amerikanische Food and Drug Administration
FDG	Fluordesoxyglucose
FOLH1	Folathyrolase 1
FOLH1	Folat Hydrolase 1
G1, G2, G3	Grading 1,2,3
GCP II	Glutamat Carboxypeptidase II
GRB2	Wachstumsfaktorrezeptor gebundenes Protein 2 [growth factor receptor-bound protein 2]
HBED-CC	N,N'-bis[2-hydroxy-5-(carboxyethyl)-benzyl]ethylendiamine N,N'-diacetid acid
HE	Hämatoxylin Eosin
Her2(/neu)	human epidermal growth factor receptor
HIER	heat induced epitope retrieval
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IGF-1R	Typ I Insulin Wachstumsfaktorrezeptor [growth factor receptor]
inv. duktal	invasiv duktal

IRS	Immunreaktiver Score
kDa	Kilodalton
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LNCaP	Lymphknotenkarzinom der Prostata [lymph node carcinoma of the prostate]
LSAB	labeled streptavidin Biotin Methode
max	Maximum
MDM2	mouse double minute 2
MFS	metastase free survival
min	Minimum
MIP	(s)-2-(3-((S)-1-carboxy-S((4-(123)I-iodobenzyl)amino)pentyl)ureido)pentaediodic acid
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MVD	microvessel density
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NAA	N-acetyl-aspartate
NAAG	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate
NAALADase I	N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate Peptidase I
OAS	overall survival
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ I
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung [phosphate buffered saline]
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIET	protease induced epitope retrieval
PR	Progesteronrezeptor
PSA	prostatapezifisches Antigen
PSMA	Prostatapezifisches Membranantigen
R0 Resektion	Resektion mit tumorfreien Rändern
R1 Resektion	Resektion mit mikroskopisch nicht tumorfreien Resektionsrändern
RACK1	Rezeptor für aktivierte C Kinasen 1
TCM	tumor conditioned medium
TMA	tissue microarray
UICC	Union for International Cancer Control
uPA	Plasminogen vom Urokinasentyp
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor [growth factor]
vs.	versus
VTA	vascular targeting agent

TABELLE 39 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1 Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten für Frauen an Brustkrebs, inklusive in-situ Karzinome 2003-2013</i>	11
<i>Abbildung 2 Struktur des PSMA</i>	16
<i>Abbildung 3 Die PSMA-abhängige Signaltransduktion beim Prostatakarzinom</i>	19
<i>Abbildung 4 Bindung der Liganden bei der PSMA Bildgebung</i>	23
<i>Abbildung 5 Die Intussusception</i>	28
<i>Abbildung 6 Design der E2100 Studie</i>	32
<i>Abbildung 7 Die indirekte Streptavidin-biotin Methode (LSAB: labeled Streptavidin Biotin Method) zur visualisierung der am antigen gebundenen Primärantikörper</i>	45
<i>Abbildung 8 CD31 Färbung eines Mammakarzinomgewebeschnittes in 20-facher Vergrößerung</i>	48
<i>Abbildung 9 Grundprinzip der indirekten Immunfluoreszenz</i>	51
<i>Abbildung 10 Immunfluoreszenz Färbung einer Prostatakarzinomprobe in 20-facher Vergrößerung</i>	53
<i>Abbildung 11 Altersverteilung des Patientinnenkollektivs</i>	57
<i>Abbildung 12 Immunhistochemische Färbung Primärtumorpräparate mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung - Gegenüberstellung von PSMA-positiven und negativen Tumorzellen</i>	61
<i>Abbildung 13 Immunhistochemische Färbung Primärtumorpräparate in 40-facher Vergrößerung – Gegenüberstellung von der CD31 (B1) und PSMA (B2) Färbung bei PSMA negativen Gefäßen</i>	62
<i>Abbildung 14 Immunhistochemische Färbung Primärtumorpräparate in 40-facher Vergrößerung – Gegenüberstellung von der CD31 (C1) und PSMA (C2) Färbung bei PSMA positiven Gefäßen</i>	62
<i>Abbildung 15 Immunhistochemische Färbung Lymphknotenmetastasepräparate mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung - Gegenüberstellung von PSMA-positiven und negativen Zellen</i>	63
<i>Abbildung 16 Immunhistochemische Färbung eines Lungenmetastasepräparates mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung</i>	64
<i>Abbildung 17 Immunhistochemische Färbung eines Knochenmetastasepräparats mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung</i>	64
<i>Abbildung 18 Immunhistochemische Färbung eines Gehirnmastasepräparats mit dem PSMA Antikörper in 20-facher Vergrößerung</i>	65
<i>Abbildung 19 Immunhistochemische Färbung eines Primärtumorpräparates mit dem CD31 Antikörper in 20-facher Vergrößerung</i>	66
<i>Abbildung 20 Immunhistochemische Färbung eines Lymphknotenmetastasepräparates mit dem CD31 Antikörper in 20-facher Vergrößerung</i>	66
<i>Abbildung 21 Häufigkeitsverteilung der PSMA Expression im gesunden Brustdrüsengewebe</i>	67
<i>Abbildung 22 (1) und (2): Immunhistochemische Färbung des gesunden Brustdrüsengewebes mit dem PSMA-Antikörper in 20-facher Vergrößerung – PSMA-negative Zellen</i>	68
<i>Abbildung 23 Immunhistochemische Färbung des gesunden Brustdrüsengewebes mit dem PSMA-Antikörper in 20-facher Vergrößerung - PSMA-positive Zellen</i>	68
<i>Abbildung 24 PSMA Expression der Tumorzellen - Boxplot zum Vergleich des IRS im Primärtumor der M0- und M1 patientinnen</i>	79

<i>Abbildung 25 PSMA Expression an den Tumormikrogefäßen - Boxplot zum Vergleich des MVD im Primärtumor der M0- und M1-Patientinnen.....</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 26 PSMA Expression der Tumorzellen (IRS) - Boxplot zum Vergleich des IRS in den Primärtumorproben in Abhängigkeit vom Grading.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 27 PSMA Expression der Tumormikrogefäße (MVD) - Boxplot zum Vergleich des MVD in den Primärtumorproben in Abhängigkeit vom Grading.....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 28 Streudiagramm zur Darstellung der positiven Korrelation zwischen der PSMA-Microvessel density im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 29 Kaplan-Meier Kurve zur Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der PSMA Expression in den Tumorzellen.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 30 Kaplan-Meier Kurve zur Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der PSMA Expression in den Tumormikrogefäßen.....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 31 Kaplan-Meier Kurve zur Analyse des metastasefreien Überlebens in Abhängigkeit von der PSMA Expression in den Tumorzellen.....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 32 Kaplan-Meier Kurve zur Analyse des metastasefreien Überlebens in Abhängigkeit von der PSMA Expression in den Tumormikrogefäßen.....</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 33 Gegenüberstellung eines PSMA-negativen Falls in der immunhistochemie und der Immunfluoreszenz in 20-facher Vergrößerung.....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 34 Gegenüberstellung eines PSMA-positiven Falls in der immunhistochemie und der Immunfluoreszenz in 20-facher Vergrößerung.....</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 35 Gegenüberstellung einer PSMA-positiven Gehirnmastase in der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz in 20-facher Vergrößerung.....</i>	<i>95</i>

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1 T-Klassifikation</i>	8
<i>Tabelle 2 N-Klassifikation</i>	9
<i>Tabelle 3 M-Klassifikation</i>	10
<i>Tabelle 4 Die UICC-Stadieneinteilung</i>	10
<i>Tabelle 5 Reagenzien</i>	37
<i>Tabelle 6 Puffer und Lösungen</i>	37
<i>Tabelle 7 PSMA-Primärantikörper und Verdünnungen</i>	38
<i>Tabelle 8 CD31 Primärantikörper und verdünnungen</i>	38
<i>Tabelle 9 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz und verdünnungen</i>	39
<i>Tabelle 10 Geräte</i>	39
<i>Tabelle 11 Verbrauchsmaterialien</i>	40
<i>Tabelle 12 Optische Geräte</i>	40
<i>Tabelle 13 Programme</i>	40
<i>Tabelle 14 Färbeprotokoll der Hämatoxylin-Eosin Färbung im Färbeautomat</i>	42
<i>Tabelle 15 Zusammenstellung des immunreaktiven Score (IRS)</i>	47
<i>Tabelle 16 Interpretation des Immunreaktiven Score (IRS)</i>	47
<i>Tabelle 17 Häufigkeitsverteilung des Menopausenstatus</i>	58
<i>Tabelle 18 Häufigkeitsverteilung der Metastasierung</i>	58
<i>Tabelle 19 Tumormerkmale- und Charakteristiken</i>	59
<i>Tabelle 20 Intensität der Gefäße in der CD31-Färbung</i>	67
<i>Tabelle 21 PSMA Expression der Tumorzellen (IRS) in den unterschiedlichen Gewebearten</i>	69
<i>Tabelle 22 PSMA Expression der Tumorzellen (IRS) in den Fernmetastasen</i>	70
<i>Tabelle 23 PSMA Expression an den Tumormikrogefäßen der unterschiedlichen Gewebearten - Färbeintensität</i>	71
<i>Tabelle 24 PSMA Expression an den Tumormikrogefäßen der unterschiedlichen fernmetastasen - Färbeintensität</i>	72
<i>Tabelle 25 Streumaße des MVD</i>	72
<i>Tabelle 26 PSMA Expression an den Tumormikrogefäßen der unterschiedlichen Gewebearten – MVD- IRS</i>	73
<i>Tabelle 27 zeitgleiche Expression des PSMA's an den Tumorzellen und den Tumormikrogefäßen bei den Primärtumorproben</i>	74
<i>Tabelle 28 zeitgleiche Expression des PSMA's an den Tumorzellen und an den Tumormikrogefäßen bei den Lymphknotenmetastaseproben</i>	75
<i>Tabelle 29 Zeitgleiche Expression des PSMA's an den Tumorzellen und an den Tumormikrogefäßen bei den Fernmetastaseproben</i>	76
<i>Tabelle 30 Vergleich der PSMA Expression in den Primärtumorproben mit der in den Lymphknoten- und Fernmetastaseproben</i>	76

<i>Tabelle 31 PSMA Expression an den Tumormikrogefäßen (MVD-IRS) bei den M0- und M1-Patientinnen</i>	80
<i>Tabelle 32 PSMA Expression an den Tumorzellen (IRS) bei den invasiv duktalem Mammakarzinomen und den anderen histologischen Tumorentitäten</i>	82
<i>Tabelle 33 PSMA Expression an den Tumormikrogefäßen (MVD-IRS) bei den invasiv duktalem Mammakarzinomen und den anderen histologischen Tumorentitäten</i>	82
<i>Tabelle 34 Zusammenfassung der Ergebnisse des Mann-Whitney U und Kruskal-Wallis Tests bezüglich der PSMA Expression im Primärtumor in abhängigkeit von klinikopathologischen Parametern</i>	83
<i>Tabelle 35 Zusammenfassung der Ergebnisse des Chi-Quadrat Tests bezüglich der zeitgleichen PSMA Expression in den Tumorzellen und Tumormikrogefäßen im Primärtumor in Abhängigkeit von den Klinikopathologischen Parametern</i>	84
<i>Tabelle 36 Zusammenfassung der Ergebnisse des Wilcoxon Test für verbundene Stichproben</i>	86
<i>Tabelle 37 Mediane der Differenzen zwischen den erhobenen immunhistochemischen Parametern</i>	86
<i>Tabelle 38 Korrelationsanalyse der erhobenen Immunhistochemischen parameter</i>	87
<i>Tabelle 39 Abkürzungsverzeichnis</i>	119

PUBLIKATIONEN

EIGENANTEIL AN DEN PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGEN

Die Grundidee zur Untersuchung der Expression des PSMA's beim Mammakarzinom stammte von Herrn Professor Dr. Juhasz-Böss. Ich selbst habe, unter Absprache und Mitbetreuung von Frau Dr. Kasoha, das Studiendesign erstellt sowie die Versuche durchgeführt und die dafür notwendigen Gewebeschnitte angefertigt.

Das Poster, welches im Oktober 2016 auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe vorgestellt wurde, habe ich selbst verfasst und als Erstautorin vorgestellt. Zudem habe ich als Co-Autorin maßgeblich bei der Publikation dieser Daten mitgewirkt.

POSTER UND PUBLIKATION

61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Stuttgart, Oktober 2016: „Prostate-Specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases“ (Referentin: C. Unger, Autoren: C. Unger, I. Juhasz-Böss, E.-F. Solomayer, R.M. Bohle, C. Zaharia, S. Ezzidin, M. Kasoha).

39th annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, December 2016: „Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases“ (Autoren: A. von Heesen, M. Kasoha, E.-F. Solomayer, C. Unger, R.M. Bohle, C. Zaharia, S. Ezzidin, I. Juhasz-Böss)

Die Arbeit mit dem Titel „Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases“ ist in Volume 34 des Jahres 2017 im Journal Clinical & Experimental Metastasis erschienen.

Auf den folgenden Seiten befindet sich das von mir vorgestellte und verfasste Poster sowie die Titelseite der Publikation in der Originalversion.

Die Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Expression des Mammakarzinoms

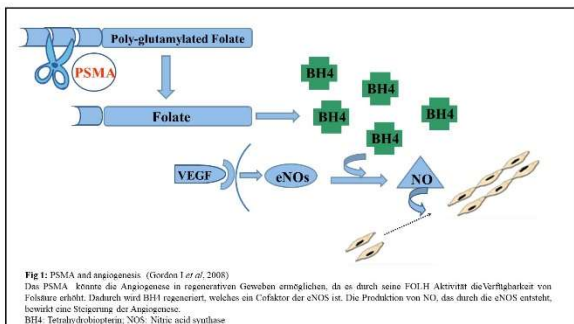
Clara Unger¹, Ingolf Juhasz-Böss¹, Erich-Franz Solomayer¹, Rainer Maria Bohle², Claudia Zaharia², Samer Ezzidin³, Fadi Khreish³, Stefan Wagenpfeil⁴, Mariz Kasoha¹

¹Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin ²Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie ³Klinik für Nuklearmedizin ⁴Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Abstract : 487

Einleitung

- Das Prostate specific membrane antigen (PSMA) ist ein Typ II transmembranäres Glykoprotein.
- Vorkommen:**
 - Gesunde Prostata und vererbt bei Prostata-Ca
 - Herniges Gewebe: Duodenum, Niere, Endometrium, Brustdrüse
 - Tumorzellen: Prostata, RCC, Blase, Brust, Magen, Lunge
 - Neovaskulatur von: Mamma, Nieren-, Blasen-, Lungen-, Colon-, Magen-, Pancreas-Ca
- Funktionen:**
 - FOLH1: Hydrolyse von polyglutamylierter Folsäure zu Folsäure
 - NAALADase (N-acetylated-alpha-linked-acidic-dipeptidase) im Gehirn: Hydrolyse von NAAG (N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate) in NAA (N-acetyl-aspartate)
 - In der Angiogenese:



Bildgebung:

- PET/CT ist mit dem mAb J591 bei Prostata-Ca schon etabliert und erfolgreich.
- Case Study mit 68Ga-PSMA Bildgebung bei Mamma-Ca (Sathkege *M et al.*)

Therapie: Phase II Studie mit Lutetium-177 anti-PSMA mAb J591 bei therapierefraktärem metastasiertem Prostata-Ca

Ziel der Studie

Untersuchung der PSMA Expression in den Tumorzellen und in der Tumorneovaskulatur bei Brustkrebspatientinnen. Das PSMA wurde sowohl im Primärtumor, als auch in den Lymphknotenmetastasen, und in den Fernmetastasen nachgewiesen

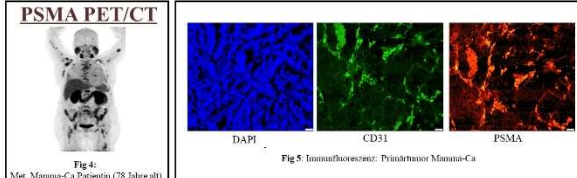
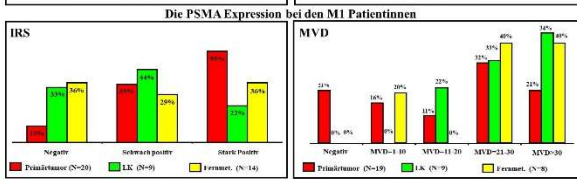
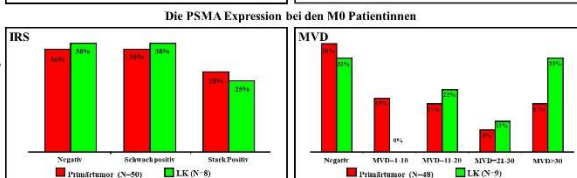
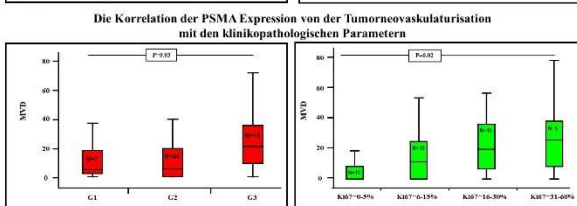
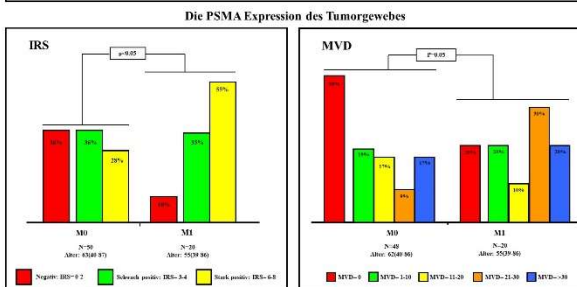
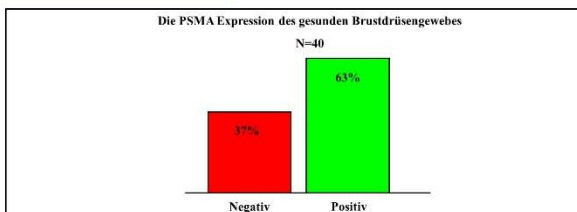
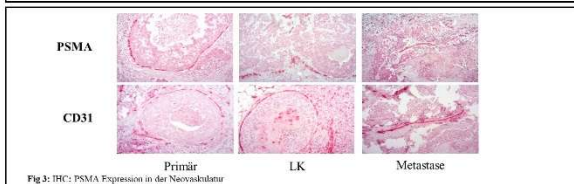
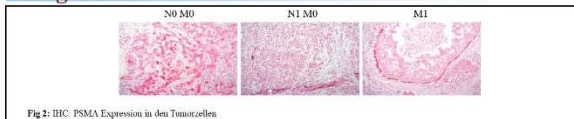
Patientenkollektiv

Unsere Studie untersucht 72 Brustkrebspatientinnen, darunter 22 mit Fernmetastasen (5 Lungenmet., 1 Lungenmet., 6 Knochenmet.).

Methoden

- Gewebeschnitte aus formalinfixierten Paraffinblöcken des Instituts für Pathologie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) wurden immunhistochemisch angefertigt. 2 Schnitte wurden parallel mit PSMA (DAKO, Clone 3E6) und CD31 (DAKO, Clone JC70A) Antikörpern und DAKO REAL™ Detection System, Alkaline phosphatase/RED gefärbt. Das CD31 wird auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert und hat den Nachweis von Gefäßen ermöglicht. Sowohl die Tumorzellen als auch die Gefäße wurden auf die PSMA Expression untersucht. Die Gefäßdichte (MVD: microvessel density), wurde anhand von 5 Fotos errechnet, um die Menge an PSMA-positiven Gefäßen zu quantifizieren.
- Immunfluoreszenz wurde ebenfalls an ausgewählten Fällen realisiert, um die genaue Koloralisation des PSMA und des CD31 nachzuweisen. Dafür wurden folgende Antikörper verwendet: PSMA Clone 3E6 DAKO (mouse), CD31 Clone 2B364 Abcam (rabbit), Alexa Fluor® 568 (goat anti mouse) und Alexa Fluor® 488 (goat anti rabbit) (Life science Technologies).

Ergebnisse



Schlussfolgerung

Laut unseren Ergebnissen wird das PSMA sowohl in der Tumorneovaskulatur als auch in den Tumorzellen des Mammakarzinoms exprimiert. Die Expression ist bei Patientinnen mit Fernmetastasen oder mit einem höheren Tumorstadium deutlich verstärkt. Diese Ergebnisse suggerieren, dass das PSMA ein ideales Target für die Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms ist.



Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases

Mariz Kasoha¹ · Clara Unger¹ · Erich-Franz Solomayer¹ · Rainer M. Bohle² · Claudia Zaharia² · Fadi Khreich³ · Stefan Wagenpfeil⁴ · Ingolf Juhasz-Böss¹

Received: 30 August 2017 / Accepted: 1 February 2018 / Published online: 10 February 2018
 © Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

Abstract

The present study was undertaken to investigate the expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA) in normal breast tissues, in cancerous breast tissues and in distant metastases from patients with breast cancer. Immunohistochemical analysis was performed to determine PSMA expression and angiogenic activity using anti-PSMA mAb and anti-CD31 mAb respectively. Immunofluorescence staining was applied to confirm the exact co-localization of PSMA and CD31. We observed different patterns of PSMA expression between normal and cancerous tissues. Normal breast tissues showed PSMA expression only in normal glandular cells. However, primary breast tumors and distant metastases showed PSMA expression in tumor cells and in tumor-associated neovasculature. PSMA score group status in primary breast tumors was significantly associated with histologic type and tumor grade ($p=0.026$ and $p=0.004$ respectively). Distant metastases showed higher PSMA expression in tumor-associated neovasculature comparing with primary tumors. Moreover, brain tumor-associated neovasculature had significantly higher expression of PSMA comparing with bone tumor-associated neovasculature. The localized binding of PSMA mAb to the neovasculature endothelium was confirmed with the double Immunofluorescence staining. ⁶⁸Ga-PSAM imaging of a patient with metastatic breast cancer showed strong tracer uptake in all known skeletal metastases. To the best of our knowledge, this study is the second one that has assessed PSMA expression in a large number of breast cancer patients. Our findings showed that PSMA is particularly expressed in tumor-associated neovasculature of breast tumors and its distant metastases, thus enhancing the evidence on the potential usefulness of PSMA as a therapeutic vascular target.

Keywords Breast cancer · Prostate-specific membrane antigen (PSMA) · Angiogenesis · Metastases · Neovasculature

Introduction

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is a 84–100 kDa type II transmembrane glycoprotein which is first cloned in the human prostate parenchyma and has a unique 3-part structure, a 707-amino acid external portion, a 24-amino acid transmembrane portion and a 19-amino acid internal portion [1]. While initial observations assumed that the expression of PSMA is limited to prostate cells, it is now well known that it is also expressed to a limited degree in other tissues. For example, PSMA expression is seen in the brush border of the small intestine, in the proximal renal tubules, in the spleen, in the liver, in the salivary glands and in the brain [2]. Moreover, Godron et al. demonstrated for the first time the expression of PSMA in a variety of neovasculature from physiologic regenerative and reparative conditions such as vessels in proliferative endometrium

✉ Mariz Kasoha
mariz.kasoha@uks.eu

¹ Department of Gynecology, Obstetrics and Reproductive Medicine, University Medical School of Saarland, 66421 Homburg, Saar, Germany

² Institute of General and Surgical Pathology, University Medical School of Saarland, 66421 Homburg, Saar, Germany

³ Department of Nuclear Medicine, Saarland University, 66421 Homburg, Saar, Germany

⁴ Institute of Medical Biometry, Epidemiology and Medical Informatics, Saarland University, 66421 Homburg, Saar, Germany

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich nachstehenden Personen meinen besonderen Dank zum Ausdruck bringen, ohne welche die Fertigstellung dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ich möchte mich hiermit bei meinem Betreuer und Doktovorater, Herrn Professor Dr. med. Juhasz-Böss bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Auch für seine hervorragende Betreuung, ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie für das mühevoll Korrekturlesen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Mariz Kasoha danke ich ganz herzlich für die umfassende Mitbetreuung und Unterstützung. Ich möchte mich bei ihr für ihre große Hilfsbereitschaft und Geduld bedanken.

Ein Dank gilt dem Zytologielabor der Frauenklinik, für die moralische und tatkräftige Unterstützung. Durch die hervorragende Atmosphäre im Labor waren die dort verbrachten Stunden eine sehr lehrreiche und freudige Zeit, die ich neben dem Studium genießen durfte. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Barbara Linxweiler bedanken, für ihre Mühe, unendliche Geduld und vor allem für ihr liebevolles Engagement. Ich verdanke ich meine Kenntnisse über die Immunhistochemie. Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Alice Kunz, Stefanie Seyfried und Dr. med. Zoltan Takacs.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Bohle möchte ich mich für die Unterstützung bei Bestimmung der optimalen Färbemethodik und der Auswertung bedanken. Vielen Dank für ihr mir entgegengebrachtes Vertrauen, durch welches ich die notwendigen Gewebeblöcke aus dem pathologischen Institut für die durchgeführten Färbungen verwenden durfte. Ein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. med. Claudia Zaharia, die mich bei der Auswertung der Färbungen unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Molekularlabors des Instituts für allgemeine und spezielle Pathologie für ihre technische Assistenz bedanken.

Bei Dr. med. Maximilian Linxweiler und Florian Bochen aus dem Forschungslabor der Klinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde möchte ich mich ebenfalls für die wertvollen Anregungen bedanken.

Bei Frau Gudrun Wagenpfeil möchte ich mich für die schnellen und ausführlichen Hilfestellungen für die statistische Auswertung bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinen Eltern Ralf und Céline Unger, denen ich diese Arbeit widme. Ohne ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung, wären mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meiner Freundin Katharina Moll gilt ein ganz besonderer Dank für die geistige und moralische Unterstützung während des Verfassens dieser Dissertationsschrift. Ihre aufbauenden Worte haben maßgeblich zur Fertigstellung dieser Promotionsschrift beigetragen.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.