

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner



Identifikation molekularer Targets für die Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jan-Niclas Mumm
aus
Hamburg
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer.nat. Udo Jeschke <hr/>
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Jens Neumann <hr/>
	PD Dr. Andreas Herbst <hr/>
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz.Dr.Dr. Andergassen <hr/>
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel <hr/>
Tag der mündlichen Prüfung:	26. Mai 2020 <hr/>

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Übersicht über Mammakarzinome	1
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.2.2	Risikofaktoren	3
1.2.3	Prognosefaktoren	4
1.2.4	Histopathologie des Mammakarzinoms	5
1.2.5	TNM- und UICC-Klassifikation	6
1.2.6	Grading	7
1.2.7	Hormonrezeptorstatus und molekulare Subtypen	8
1.3	Triple-negatives Mammakarzinom.....	10
1.3.1	Definition	10
1.3.2	Risikofaktoren für das triple-negative Mammakarzinom	11
1.3.3	Molekulare Struktur des triple-negativen Mammakarzinoms	12
1.3.3.1	Basal-like-Typ	12
1.3.3.2	Claudin-low-Subtyp	12
1.3.4	Aktuelle Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms	13
1.3.5	Neue Therapiemöglichkeiten des triple-negativen Mammakarzinoms	13
1.3.6	Potentielle neue Target-Biomarker und Signaltransduktions- kaskaden	14
1.3.6.1	Notch1-Signalweg	14
1.3.6.2	HIF1 α - und XPB1-Signalweg	15
1.3.6.3	Wnt/ β -Catenin-Signalweg	16
1.3.6.4	LRP6-Signalweg	17
1.3.6.5	MCL1-Signalweg	18
1.3.6.6	FOXP3-Transkriptionsfaktor.....	18
1.4	Fragestellung	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1	Gewebeproben	21
2.2	Material	21
2.2.1	Geräte	21
2.2.2	Reagenzien	22
2.2.3	Bei der ABC-Methode verwendete Chemikalien und Lösungen	24
2.2.4	Verwendete Antikörper	24
2.3	Immunhistochemische Untersuchungen	25
2.3.1	Konservierung der Gewebeproben (Formalinfixierung, Einbetten in Paraffin, Herstellung der Gewebeschnitte)	26
2.3.2	Immunhistochemische Färbungen	27
2.3.2.1	Prinzipien der ABC-Methode.....	27
2.3.2.2	Vorbereitung der Präparate.....	30

2.3.2.3	Immunhistochemische Färbung.....	31
2.3.2.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	32
2.3.2.5	Mikroskopische Untersuchung und Auswertung mittels IRS-Score.....	33
2.4	Statistische Auswertung.....	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Basisdaten	35
3.2	Antikörperfärbungen von TNBC-Tumorgewebe	36
3.3	Korrelationen zwischen der Färbungsintensität und dem Gesamtüberleben.....	39
3.4	Korrelationen zwischen der Färbungsintensität und verschiedenen Tumoreigenschaften.....	47
3.5	Korrelationen zwischen der Färbungsintensität und dem Vorkommen von Tumorrezidiven.....	51
4	DISKUSSION.....	54
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	62
7	ANHANG.....	72
7.1	Verzeichnis der Abkürzungen.....	72
7.2	Verzeichnis der Abbildungen	74
7.3	Verzeichnis der Tabellen.....	76
8	DANKSAGUNG	78
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	80

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Eine vorrangige Aufgabe der aktuellen gynäkologischen Onkologie ist die Suche nach neuen Therapieoptionen für das invasive Mammakarzinom. Das Ziel ist es, Therapiewege zu verbessern und jeder Brustkrebspatientin eine risikoarme, individualisierte und optimierte Therapie zukommen zu lassen. Im Mittelpunkt der gynäkologisch-onkologischen Forschung steht daher unter anderem die Identifizierung und Bestimmung neuer molekularer Targets und die sich daraus ergebende Entwicklung neuer Behandlungsstrategien [97].

Dabei stellt das triple-negative Mammakarzinom (TNBC), ein besonders aggressiver Subtyp des Brustkrebses, eine große Herausforderung dar. Da die Progesteron- und Östrogenrezeptoren sowie der Her2neu- Rezeptor bei dieser Krebsform nur in ausgesprochen geringem Ausmaß, oder gar nicht exprimiert werden, können sie nicht als Angriffspunkte für zielgerichtete Behandlungen dienen und bis heute gibt es keine wirksame und zugelassene Targettherapie gegen das TNBC. Die hier vorliegende Untersuchung soll dazu beitragen herauszufinden, welche alternativen Signaltransduktionsmoleküle in Zukunft als therapeutische Ziele für die Behandlung des TNBC genutzt werden könnten.

1.2 Übersicht über Mammakarzinome

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland erkranken jährlich rund 69.000 Frauen an einem primären Mammakarzinom. Dies macht Brustkrebs mit deutlichem Abstand zur häufigsten Krebserkrankung der Frau (Abbildung 1). Darüber hinaus werden zusätzlich mehr als 6.000 Frauen mit einem Carcinoma in situ diagnostiziert. Auf der Grundlage der bisherigen Inzidenzraten des Robert-Koch-Instituts erkrankt aktuell eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an einer Form von Brustkrebs, wobei bei Diagnosestellung drei von zehn Frauen jünger als 55 Jahre sind [93].

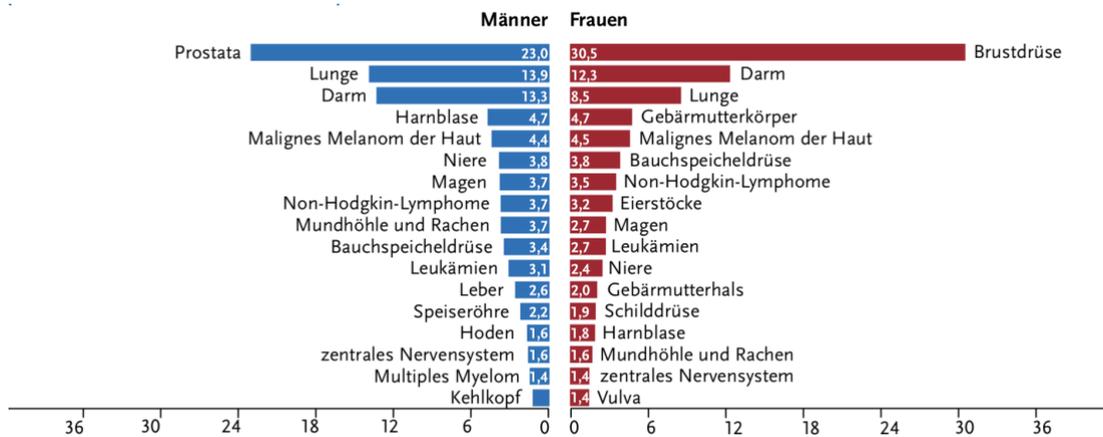


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2013/2014 [93]

Nach der Einführung des Mammographie-Screenings kam es zwischen 2005 und 2009 zu einem Anstieg der Brustkrebsneuerkrankungen, da durch die verbesserte Früherkennung vermehrt sehr frühe Stadien der Erkrankung diagnostiziert werden konnten. Seit dem Jahr 2009 wird allerdings eine leicht rückläufige Inzidenz beobachtet. In Deutschland versterben ca. 18.000 Frauen im Jahr an Brustkrebs. Durch Fortschritte mit aktuellen Therapien konnte das Gesamtüberleben der Patientinnen jedoch deutlich verbessert werden, was zu einem Rückgang der Sterberaten geführt hat (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen zum Mammakarzinom für Deutschland 2013/2014 [93]

Inzidenz	2013		2014		Prognose für 2018	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	670	70.820	650	69.220	700	71.900
rohe Erkrankungsrate ¹	1,7	172,0	1,6	167,7	1,8	173,0
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	1,1	118,3	1,1	114,6	1,1	116,5
mittleres Erkrankungsalter ³	72	64	71	64		
Mortalität	2013		2014		2015	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Sterbefälle	156	17.853	134	17.670	159	18.136
rohe Sterberate ¹	0,4	43,4	0,3	42,8	0,4	43,7
standardisierte Sterberate ^{1,2}	0,2	23,6	0,2	23,0	0,3	23,0
mittleres Sterbealter ³	74	74	73	74	75	75

¹ je 100.000 Personen ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung ³ Median

Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre		10 Jahre	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Prävalenz	2.400	311.400	3.800	559.900
absolute Überlebensrate (2013–2014) ⁴	60	79 (79–81)	45	66 (64–68)
relative Überlebensrate (2013–2014) ⁴	73	88 (87–88)	69	82 (81–83)

⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

1.2.2 Risikofaktoren

Die Entstehung eines Mammakarzinoms erfolgt stets multifaktoriell; dies haben viele molekular-epidemiologische Studien zeigen können. Nur 5-10% der Mammakarzinome werden als hereditär angesehen. Es stehen bei diesen Formen des Mammakarzinoms zwei Proto-Onkogene im Vordergrund, BRCA-1 und BRCA-2, auf die etwa 50% der vererbten Brustkrebsfälle zurückgeführt werden [64].

Patientinnen, die Träger einer solchen genetischen Komponente sind, haben ein Lebenszeitrisiko von 50-85% an einem Mammakarzinom zu erkranken [3]. Natürlich prädisponieren auch andere Faktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms. Zu nennen wären hier unter anderem: höheres Alter der Frau, Adipositas, frühe Menarche, Nulliparität, Nichtstillen oder eine späte Schwangerschaft im Alter von über 30 Jahren [73]. Eine frühe Schwangerschaft

hingegen scheint das Risiko einer Brustkrebserkrankung sogar zu verringern. Weiterhin haben Frauen mit einem späten Eintritt der Menopause ein deutlich erhöhtes Risiko [36, 83]. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien wiesen postmenopausale Frauen, welche einer Hormonersatztherapie zugeführt wurden, ein höheres Risiko auf, ein Mammakarzinom zu entwickeln, als Patientinnen, die keine Hormone erhielten [74]. Neuere Publikationen zeigen jedoch eher einen Vorteil einer postmenopausalen Hormonersatztherapie [98].

1.2.3 Prognosefaktoren

In der Literatur werden prädiktive und prognostische Faktoren beschrieben. Prädiktiv ist ein Faktor, wenn er das positive Ansprechen auf eine ausgewählte Therapie beschreibt. Als prognostisch werden Faktoren beschrieben, die für das Risiko des Versterbens an einem Mammakarzinom sprechen. Beide Faktoren werden genutzt, um eine individuelle risikoadaptierte Therapieempfehlung geben zu können [18].

Der axilläre Lymphknotenbefall ist einer der bedeutendsten prognostischen Marker beim Mammakarzinom. Sollten bei der Erstdiagnose mehr als drei Lymphknoten befallen sein, so ist die Prognose deutlich schlechter und geht mit einer erhöhten Mortalität einher. Darüber hinaus ist das 10-Jahres-Rezidivrisiko bei diesen Patientinnen um fast das Doppelte erhöht und liegt bei etwa 75% [29]. Ebenso prädisponieren die Tumorgröße bei der Erstdiagnose und ein bilaterales Auftreten des Mammakarzinoms für eine deutlich schlechtere Prognose, dabei scheint nicht eine erhöhte Aggressivität des Tumors verantwortlich zu sein, sondern eher das simultane Auftreten des Tumors an sich [66]. Das 1957 von Bloom und Richardson et al. [6] beschriebene Grading ist ein weiterer wichtiger Prognosefaktor. Je höher das Grading eines Tumors ist, desto schlechter ist das Gesamtüberleben der Patientinnen [94]. Auch das Alter spielt, wie oben bereits erwähnt, eine entscheidende Rolle. Goldhirsch et al. konnten 2002 zeigen, dass Patientinnen, die bei der Diagnosestellung unter 35 Jahre alt waren, signifikant mehr hormonrezeptornegative Tumore entwickelten, eine höhere Expression des

Proliferationsmarkers Ki-67 (über 20%) aufwiesen sowie deutlich öfter blutgefäß- und lymphsysteminvasive Tumore aufwiesen [16].

Nach den Leitlinien der AGO (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologie Onkologie e.V.) [2] sind die wichtigsten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms [2] zusammengefasst folgende:

- Tumorgröße
- Lymphknotenstatus
- Fernmetastasen
- Alter
- Histopathologie/Tumorsubtyp
- Grading
- Peritumorale Lymphsystem-/Blutgefäßinvasion
- Übergewicht
- Postoperativer Resektionsstatus

1.2.4 Histopathologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist ein maligner, vom Epithel des Brustdrüsenparenchyms ausgehender Tumor. Die Prädilektionsstelle ist meist einseitig und in über 55% der Fälle ist der obere äußere Quadrant betroffen, etwa 15% treten im oberen inneren Quadranten auf, gefolgt von dem unteren äußeren Quadranten mit 10%. Histopathologisch wird das Mammakarzinom bei 95% der Fälle als ein Adenokarzinom klassifiziert [111].

Die histopathologische Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt anhand einer pathologischen Untersuchung, wobei der Gewebetyp, die Invasivität des Tumors, der Rezeptorstatus und das Grading klassifiziert werden. Eine primäre Unterteilung findet bei der Klassifizierung in nicht invasive (Carcinoma in situ) und invasive Karzinome statt.

Das häufigste in situ-Mammakarzinom ist das DCIS (Ductales carcinoma in situ). Hierbei handelt es sich um eine präkanzeröse Vorstufe des Mammakarzinoms, welche ebenfalls von den Milchgängen der Brustdrüse ausgeht, allerdings noch

nicht invasiv in umliegendes Gewebe einwächst. Das DCIS metastasiert daher nicht; es wird heutzutage dennoch empfohlen jedes DCIS zu behandeln, da hier im Gegensatz zu anderen Präkanzerosen das Risiko besteht (30-50%), dass sich ein invasives Mammakarzinom entwickelt [38] Weiterhin wird eine lobuläre Neoplasie (LN) unterschieden, wobei diese eher eine erhöhte Proliferationsrate des Epithels der Läppchen beschreibt und mit einem erhöhten Risiko für eine Entartung einhergeht [58]. Eine weitere Präkanzerose stellt das Carcinoma lobulare in situ (CLIS) dar, welches von den Läppchen ausgeht und seltener entartet als das DCIS.

Die invasiven Mammakarzinome werden in zwei Hauptklassen unterteilt: duktale und lobuläre Karzinome. Duktale Karzinome stellen mit etwa 80% die häufigste Variante des invasiven Mammakarzinoms dar, deutlich seltener sind die lobulären Karzinome mit einem Anteil von etwa 15-20% [7].

1.2.5 TNM- und UICC-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation wird international verwendet und ist essentiell für eine weitere Therapie- sowie auch Prognoseplanung. Sie beschreibt die anatomischen Befunde am Primärtumor und setzt sich aus der Tumorgröße (T), der Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und der Metastasierung (M) zusammen. Auf der Basis der TNM-Befunde erfolgt die Stadieneinteilung des Tumors nach den Kriterien der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) [122] (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klassifikation der Tumorstadien nach den Kriterien der UICC [122]

Stadium	Primärtumor (T)	Lymphknotenstatus (N)	Fernmetastasen (M)
0	Tis	N0 (keine)	M0
I	T1mic	N0	M0
	T1a (1 – 5 mm)	N0	M0
	T1b (6 – 10 mm)	N0	M0
	T1c (11 – 20 mm)	N0	M0
IIA	T0, T1mic, T1	N1 (1-3 LK in der Axilla und/oder der ipsilateralen Mammaria-Interna-Region)	M0
	T2 (21- 50 mm)	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3 (≥51 mm)	N0	M0
IIIA	T0, T1mic, T1, T2	N2 (4-9 LK in der Axilla)	M0
	T3	N1	M0
IIIB	T4 (Infiltration der Brustwand und/oder der Haut, und/oder ipsilaterale Satellitenmetastasen und/oder inflammatorisches Mammakarzinom)	N0 – 2	M0
IIIC	alle T	N3 (≥10 LK n der Axilla und/oder Befall infra- oder supraclaviculärer LK)	M0
IV	alle T	alle N	M1 (Metastasen außerhalb der Brust und der benachbarten LK-Regionen)

1.2.6 Grading

Das Grading eines malignen Tumors beschreibt die Pathogenitätsbestimmung, welche am Biopsie- oder Operationspräparat durchgeführt wird. Das entnommene Gewebe wird anhand seiner aktuellen Morphologie, der ggf. veränderten Zellstruktur sowie sichtbarer Mitoseraten in drei aufsteigende Malignitätsgrade (Grading) eingeteilt. Tumorzellen, die der Ursprungszelle in ihren Eigenschaften noch sehr ähneln und langsam wachsen, gelten als wenig aggressiv und gut differenziert (G1). Im Gegensatz dazu gelten Tumorzellen, welche dem Ursprungsgewebe nicht mehr zuzuordnen sind, als undifferenziert bzw. entartet und damit als aggressiv (G3) [6].

1.2.7 Hormonrezeptorstatus und molekulare Subtypen

Der Progesteron (PR)- und Östrogenrezeptorstatus (ER) wird heutzutage in jeder Biopsie bzw. jedem Tumorresektat bestimmt und ist einer der wichtigsten etablierten Prognose- und Therapiemarker [26]. Vor ca. 25 Jahren wurde die erste Arbeit zu diesem Thema veröffentlicht [49]. Ein weiterer wichtiger therapeutischer Angriffspunkt ist der HER2/neu-Rezeptor. Dies ist ein epidermaler Wachstumsfaktor, der bei ca. 35% der Patientinnen mit einem invasivem Mammakarzinom exprimiert wird und mit einer schlechteren Prognose korreliert ist [96]. Sobald keiner dieser drei Rezeptoren nachweisbar ist, wird dieser Tumor als ein „triple-negatives Mammakarzinom“ behandelt.

Perou und Sorlie et al. konnten in mehreren Microarray-cDNA-Studien Mammakarzinome anhand der Rezeptorexpression in vier verschiedene molekulare Subtypen klassifizieren (Tabelle 3).

- Luminal-A-Subtyp,
- Luminal-B-Subtyp,
- HER2+-Subtyp,
- Basal-like-Subtyp.

Der Luminal-A-Subtyp kommt mit ca. 24-39% am häufigsten vor, gefolgt vom Basal-like-Subtyp mit ca. 17-37%, Luminal-B-Subtyp mit 10-18% und dem HER2+-Subtyp mit 4-10% [105]. Es grenzen sich also die zwei endokrinempfindlichen Tumorentitäten (Luminal A, B) von den undifferenzierten Tumoren Basal-Like-Subtyp sowie dem HER2-gelenktem Tumor ab [15].

Der Begriff Basal-like-Subtyp wird in der Literatur oft mit dem triple-negativen-Mammakarzinom synonym verwendet, jedoch sind diese Subklassifizierungen je nach Labor und Untersucher nicht hundertprozentig reproduzierbar [120]. Somit entspricht der Basal-like-Subtyp nur zu ca. 80% dem histopathologisch klassifizierten TNBC [89]. Der Luminal-A- und Luminal-B-Subtyp zeigen sich beide Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-positiv sowie beide HER2/neu-negativ.

Eine Differenzierung der beiden letztgenannten Typen erfolgt nur durch die Proliferationsrate, welche sich mit dem Proliferationsmarker Ki-67 bestimmen lässt. Ki-67 wird ebenfalls als prädiktiver Faktor herangezogen, da seine vermehrte Anwesenheit in Studien gezeigt hat, dass Patientinnen besser auf eine neoadjuvante Chemotherapie sowie antihormonelle Therapie ansprechen [113]. Der Luminal-A-Subtyp zeigt eine niedrige, der Luminal-B-Subtyp eine hohe Proliferationsrate. Eine Neigung des Tumors zur gesteigerten Proliferation geht ebenfalls mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher [24]. Über einen einheitlichen Schwellenwert für Ki-67 zur standardisierten Einschätzung der Proliferationsrate und damit Unterscheidung in Luminal-A- oder -B-Subtyp wird aktuell noch kontrovers diskutiert [30].

Tabelle 3: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (modifiziert nach Coates et al. 2015 [15])

Molekularer Subtyp	Subgruppe	Definition	Bezeichnung
Luminal A		<ul style="list-style-type: none"> • ER- und PR positiv • HER2/neu negativ • Ki67 niedrig 	Luminal A-like
Luminal B	HER2/neu negativ	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positiv und/oder • PR-negativ • Ki67 hoch 	Luminal B-like HER2/neu negativ
	HER2/neu positiv	<ul style="list-style-type: none"> • ER-positiv • HER2/neu überexprimiert • Ki67 niedrig oder hoch 	Luminal B-like HER2/neu positiv
HER2 enriched		<ul style="list-style-type: none"> • HER2/neu überexprimiert • ER- und PR negativ 	
Basal like		<ul style="list-style-type: none"> • ER und PR-negativ • HER2/neu negativ 	Große Übereinstimmung mit triple-negativem Mamma-Ca

In einer multivariaten Analyse wurden luminal/HER2- und HER2-angereicherte Tumore mit einem deutlich höheren Vorkommen an Leber-, Hirn- und Lungenmetastasen assoziiert als luminal-A-ähnliche Tumore. Basal-like Tumore hatten eine höhere Rate an Hirn-, Lungen- und Fernknotenmetastasen sowie und ein signifikant öfteres Vorkommen an Leber- und Knochenmetastasen [45].

Für die verschiedenen Mammakarzinom-Subtypen (Tabelle 3) gibt es unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten und unterschiedliche Prognosen. Die Therapie reicht von lokalen Behandlungsmethoden wie der onkologischen Chirurgie und der Strahlenonkologie bis hin zu systemischen Behandlungsmethoden. Dieser multidisziplinäre Ansatz wurde mit einer Senkung der Sterblichkeitsrate bei Mammakarzinomen in Verbindung gebracht [46].

1.3 Triple-negatives Mammakarzinom

1.3.1 Definition

Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC), die aggressivste Form des Brustkrebses, ist pathologisch definiert durch sehr geringe oder nicht vorhandene Expression der Östrogen-, Progesteron- und Her2- (Human epidermal growth factor receptor 2) Rezeptoren [4, 8]. Diese aggressive Form des Brustkrebses kommt oft bei jungen Frauen vor und bringt eine frühe viszerale Metastasierung, ein hohes Rezidivrisiko sowie ein niedriges Gesamtüberleben unabhängig von der Tumorgroße, dem initialen Staging oder dem Lymphknotenbefall mit sich [40, 45]. Die geringe Expression von Hormon- und Her2-Rezeptoren führt dazu, dass sich die Behandlungsmöglichkeiten des TNBC postoperativ meist auf „dose-dense“ oder metronome Chemotherapie (d.h. Platin, Anthrazykline, Taxane) sowie Radiatio beschränken [65]. Neuere Behandlungsstrategien wie Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)- oder VEGF-Inhibitoren zeigen ein verbessertes Gesamtüberleben, besitzen jedoch auch starke Nebenwirkungen [59, 78, 99, 112].

Auch nach den Guidelines der ASCO (American Society of Clinical Oncology) sind TNBC definiert durch das Vorhandensein von <1% immunreaktiver

Zellkerne, <1% Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren und ein Fehlen der Überexpression des humanem epidermale Growth Factor 2 (HER2/neu) [37]. Das basal-like Mammakarzinom wird in der Literatur oft mit dem triple-negativen Mammakarzinom gleichgesetzt. Jedoch haben einige Arbeiten zu diesem Thema mittels immunhistochemischer Methoden zeigen können, dass nicht alle TNBC auch gleich basal-like Tumoren sind und umgekehrt [85]. Wie bereits beschrieben ergibt sich hieraus eine sehr hohe heterogene Malignität der TNBC.

Trotz der großen wissenschaftlichen Aufmerksamkeit und eines guten Ansprechens auf Chemotherapie bleibt das TNBC aktuell die aggressivste Tumorsubklasse des Brustkrebses. Die Prognose ist für die Patientinnen nach wie vor schlecht und eine wirksame zielgerichtete Therapie konnte noch nicht gefunden werden [87]. Eine chinesische retrospektive Studie an 152 Brustkrebspatientinnen mit unterschiedlichen Brustkrebssubtypen und Hirnmetastasen belegte im Jahr 2014, dass Hirnmetastasen schneller in HER2/neu überexprimierten und TNBC-Subtypen entstehen. Das mittlere Überleben betrug beim Luminaltyp 70 Monate, beim Her2/neu überexprimierenden Typ 53 Monate und beim TNBC 40 Monate [127].

1.3.2 Risikofaktoren für das triple-negative Mammakarzinom

Weißer postmenopausale Patientinnen erkranken deutlich seltener an einem TNBC bzw. einem Subtyp, während jüngere Frauen vor allem prämenopausal deutlich häufiger erkranken [68]. Mehrfachschwangerschaften sowie Nichtstillen scheinen unabhängig voneinander mit der TNBC-Entstehung assoziiert zu sein. Jedes Stillen ist unabhängig von der Dauer mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit assoziiert, an einem TNBC zu erkranken [102].

Weiterhin scheinen Patientinnen, welche an einem metabolischen Syndrom leiden, hohe Blutzuckerspiegel, erhöhtes Gewicht, erhöhte Triglyzeride, ein geringes High-Density-Lipoprotein (HDL) aufweisen und dazu unter 50 Jahre alt sind, einem deutlich erhöhtem Risiko ausgesetzt zu sein [21, 110].

1.3.3 Molekulare Struktur des triple-negativen Mammakarzinoms

1.3.3.1 Basal-like-Typ

Der basal-like Subtyp macht einen Anteil von etwa 80% des TNBC aus [22]. Dieser Subtyp wird aufgrund der Ähnlichkeiten im Genexpressionsmuster zu basalen Epithelschichtzellen bezeichnet. Er zeigt keine Expression der Hormonrezeptoren sowie des Her2/neu-Rezeptors, aber eine hohe Expression an anderen Proliferationsfaktoren wie ERG und spezifischen Zytokeratinen wie CK5/6, CK17 sowie Cadherin [75]. In mehreren Studien konnte eine Assoziation zu den hereditären BRCA-Genen hergestellt werden. Demnach ist die Mehrheit der BRCA1-Mammakarzinome vom basal-like Typ [33]. Da man also annehmen muss, dass aufgrund eines Defizits des BRCA-Gens alternative Wege zur DNA-Reparatur aktiv sind, wie beispielsweise der Basen-Exzisionsmechanismus durch die PARP (ADP-Ribose-Polymerase), werden aktuell in vielen Studien PARP-Inhibitoren getestet. Eine Inhibierung von PARP würde somit zur Anhäufung von nicht reparierter DNA-Schädigung sowie zum Zelltod führen [53, 82]. Insgesamt gilt der basal-like-Typ als ein sehr aggressiver Subtyp mit einem schlechten Gesamtüberleben, einer frühzeitigen Metastasierungsrate und einer hohen Sterblichkeit [91].

1.3.3.2 Claudin-low-Subtyp

Einer der aktuell besonders interessanten Subtypen des TNBC ist der Claudin-low-Subtyp, welcher bis zu 40% der TNBC ausmacht. Charakterisiert ist dieser Subtyp durch einen Mangel an Claudinproteinen, welche, ähnlich wie E-Cadherine, Adhäsionsmoleküle sind und somit mitverantwortlich für die Funktionalität der Zellzwischenräume [89]. Bei der molekularen Klassifizierung wiesen Tumore des Claudin-low-Subtyps signifikant mehr epithelial-mesenchymale Zellübergangszustände mit stammzellähnlichen Merkmalen sowie eine Überexpression von proliferationsassoziierten Genen auf [88]. Der Claudin-low-Subtyp besitzt eine geringere Gesamtremissionsrate bei neoadjuvanter Chemotherapie als der basal-like Typ [84].

1.3.4 Aktuelle Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms

Aktuell gibt es keine zugelassene Target-Therapie für das triple-negative Mammakarzinom. Es werden Antrazykline und Taxane zur Therapie des TNBC empfohlen [35], und es wird mit den gleichen Chemotherapieregimes behandelt wie auch andere Mammakarzinom-Subtypen. Carboplatine und platinhaltige Regimes könnten laut der AGO bei TNBC-Patientinnen mit familiärer Prädisposition wie beispielsweise BRCA-Mutationen eine bessere Ansprechrate besitzen [2]. Eine 2008 durchgeführte Studie von Sirohi et al. berichtet über eine Ansprechrate von über 80% nach neoadjuvanter Chemotherapie mit platinhaltigen Zytostatika im Vergleich zu einer etwa 50%igen Ansprechrate bei anderen Tumorsubtypen [103]. Chemotherapien wirken zytotoxisch und schädigen die DNA aller sich schnell teilenden Zellen. Sehr schnell teilende Zellen, wie Krebszellen, sind anfälliger für eine zytotoxische Therapie, aber auch andere sich schnell teilende normale Zellen wie beispielsweise Blutzellen. Hieraus ergeben sich auch die oft immensen Komplikationen einer solchen Therapie.

1.3.5 Neue Therapiemöglichkeiten des triple-negativen Mammakarzinoms

In den letzten Jahrzehnten konnten für die hormonrezeptorpositiven und Her2/neu-Rezeptor exprimierenden Mammakarzinome gezielte endokrine bzw. Antikörpertherapien entwickelt werden. Hierzu zählt zum Beispiel der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Trastuzumab ist nun seit ca. 20 Jahren für die Therapie des Her2/neu-rezeptorexprimierenden Mammakarzinoms zugelassen und führt über eine starke Bindung an den Rezeptor zu einer Hemmung der Proliferationsrate dieser Tumore. Das Disease free survival (DFS) dieser Patientinnen konnte in Studien hierdurch signifikant verbessert werden [95].

Im Gegensatz zu anderen Brustkrebs-Subtypen (ER-positiven, HER2-positiven Subtypen) stehen beim TNBC außer der Verabreichung einer Chemotherapie keine zugelassenen gezielten Behandlungen zur Verfügung. Die Immuntherapie ist eine neue Art der Behandlung von TNBC im Vergleich zur chirurgischen

Behandlung, Chemotherapie, endokrinen Therapie und molekularer Zieltherapie [114]. Es liegt also im Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit, die molekulare Struktur der triple-negativen Mammakarzinome besser zu verstehen, um so neue gezielte Therapieoptionen zu etablieren.

Gemäß dem Cancer Genome Atlas weist TNBC eine höhere PD-L1-mRNA-Expression auf [69]. Laut einer Studie von Liu et al. wurden in TNBC auch höhere CD8+-T-Zellinfiltrationsraten gefunden. Es laufen aktuell mehrere experimentelle Studien, die die Wirkung einer Immuntherapie, welche gezielt auf PD-L1 sowie CD8-T-Lymphozyten abzielt, untersuchen [44]. Auch eine Hemmung der poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) hat einen deutlichen Nutzen in der Therapie des TNBC gezeigt, unabhängig davon, ob dies durch Defekte im BRCA1-, BRCA2-Gen oder durch Defekte anderer Pfade ausgelöst wurde [115]. Gezielte Therapien werden derzeit für TNBC entwickelt bzw. evaluiert, einschließlich der Inhibierung von EGFR, einem weiteren Proliferationsmarker, auch bekannt als HER1, aber all diese möglichen Therapien haben noch keine offizielle Zulassung der FDA (Food and Drug Administration) erlangen können [108].

1.3.6 Potentielle neue Target-Biomarker und Signaltransduktionskaskaden

1.3.6.1 Notch1-Signalweg

Der Notch1-Signalweg ist während der Zellentwicklung entscheidend an der Regulierung des Zellschicksals beteiligt. In bereits differenzierten Geweben ist er auch an der Homöostase beteiligt. Über eine hormonelle Signalübertragung vermittelt er eine interzelluläre Kommunikation via Ligand-Rezeptor-Crosstalk und kann so in den Zellzyklus eingreifen. Notch-Rezeptoren bestehen aus Transmembranproteinen, welche aus funktionellen extrazellulären, Transmembran- und intrazellulären Einheiten zusammengesetzt sind. Notch1 wurde auch als Schlüsselregulator für die Aktivierung von peripheren T-Zellen und die Differenzierung von Effektorzellen in Betracht gezogen, deren Funktionen in diesen Prozessen jedoch noch wenig verstanden sind [126].

Es konnte durch vorhergehende Studien bereits nachgewiesen werden, dass eine Hemmung dieses Signalwegs zu einer Antitumoraktivität durch Zellzyklusarrest, Apoptose und Unterbrechung der Angiogenese führte [90, 128]. Weiterhin könnte der Notch-1-Signalweg mit einer allgemeinen Resistenz gegen aktuelle Chemotherapieregimes in Zusammenhang stehen. Zhang et al. wiesen nach, dass Notch1 über eine Aktivierung von Major vault protein (MVP) für die Progression von epithelialer zu mesenchymaler Zelltransition, wie sie vor allem bei dem Caudin-low-Subtyp des TNBC beobachtet wird, verantwortlich ist [11].

Ein Hauptgrund für das schlechte Gesamtüberleben bei TNBC-Patientinnen wird auf die frühe und schnelle Fernmetastasierung zurückgeführt. Charakteristisch hierfür ist die bereits oben erwähnte epitheliale-mesenchymale Transition [27]. Nach Wang et al. nimmt in soliden TNBC-Tumoren die Notch1-Signalkaskade direkten Einfluss auf das Überleben der Tumorzellen, die Angiogenese sowie die Zelldifferenzierung [50].

1.3.6.2 HIF1 α - und XBP1-Signalweg

XBP1 (X-box-binding-protein) ist ein Transkriptionsfaktor, der maßgeblich an der zellulären Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums sowie an der Expression wichtiger Immunsystembestandteile wie dem humanen Leukozytenantigen (HLA) beteiligt ist [60]. Krebszellen induzieren eine Reihe von alternativen Signaltransduktionskaskaden, um ihr eigenes Überleben beispielsweise trotz unzureichender Vaskularisierung zu gewährleisten. Ein solcher adaptiver Weg ist die Stressreaktion des endoplasmatischen Retikulums (ER), die zum Teil durch den ER-lokalisierten Transmembransensor IRE12 und dessen Substrat XBP1 vermittelt wird. Glimcher et al. haben zeigen können, dass XBP1 in TNBC aktiviert zu sein scheint und eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese sowie bei der Entwicklung des Tumor-Subtyps hat [14].

HIF1 α (Hypoxia-inducing factor) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, welcher an der Regulation der Sauerstoffversorgung einer Zelle beteiligt ist. Es ist bereits seit Jahrzehnten bekannt, dass eine Hypoxie im direkten Umfeld eines Tumors die malignen Zellen maßgeblich beeinflusst. Hypoxische Tumore gehen meistens

mit einem aggressiveren Phänotyp, erhöhter Metastasierungsrate und eine erhöhten Resistenz gegen Radiochemotherapie einher [9]. HIF1 α ist ebenfalls ein Mitglied der Notch-Signalkaskade und steht in Verbindung mit einer schlechten Prognose der betroffenen Patienten durch eine Förderung der Karzinomentstehung sowie der Bildung von Lungenmetastasen. Eine geringere Expression stand hier mit einem langsameren Tumorwachstum, weniger Bildung von Lungenmetastasen sowie einem verlängerten Gesamtüberleben in Zusammenhang [100]. Es wurde bereits beschrieben, dass HIF1 α in TNBC überaktiviert ist [72]. XBP1 scheint in einem Transkriptionskomplex mit HIF1 α die Entwicklung in TNBC über eine Expression von HIF1 α -Zielen und damit mit einer Aktivierung der RNA-Polymerase II zu regulieren. Chen et al. stellten fest, dass unabhängig voneinander analysierte TNBC-Patientengruppen spezifische XBP1-Expressionsmuster aufwiesen, die deutlich mit einer HIF1 α -Signatur und damit schlechtem Gesamtüberleben assoziiert waren [14]. Eine Hemmung von XBP1 führt zu einem verringerten Tumorwachstum, was darauf hindeutet, dass dieser Komplex als therapeutisches Ziel verwendbar sein könnte [14].

1.3.6.3 Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurde erstmals 1982 mit der Identifikation des Maus- Proto-Onkogens Wnt1 in Verbindung gebracht. Später wurde diese Signalkaskade in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert und für die Initiierung der Flügelentwicklung verantwortlich gemacht [5]. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist eine essentielle Transduktionskaskade in der Embryonalentwicklung und der Homöostase im Erwachsenenalter [13]. Eine Beteiligung an der Regulierung des Zellzyklus, des Zellwachstums sowie der Regulierung der Tumorprogression wurden mehrfach beschrieben. 1991 wurde erstmals festgestellt, dass genetische Mutationen im Tumorsuppressorprotein APC (Adenomatous polyposis coli) mit Darmkrebs assoziiert waren [76]. Es konnten weiterhin viele Mutationen, die zur Kanzerogenese beitragen und mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Verbindung stehen, detektiert werden [124]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass eine Aberration dieses Signalwegs definitiv

für die Tumorprogression in Mundbodenkarzinomen verantwortlich zu machen ist [106, 119], dennoch sind die grundlegenden Mechanismen noch nicht aufgeklärt.

TNBC entsprechen, wie bereits beschrieben, zu 90% dem molekularen Muster der Basal-like-Subtypisierung. Dieses weist eine hohe Anzahl an mesenchymalen Tumor-Stammzellen auf [39], welche in der Literatur wiederum für die Tumorentstehung, eine rasche Metastasierung und die Entwicklung einer Radiochemoresistenz verantwortlich gemacht werden [1]. Auf molekularer Ebene spielt die Kern-Transkription von β -Catenin eine entscheidende Rolle in der Tumor-Stammzellbiologie [117]. In Anbetracht der abnormen Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bei verschiedensten Krebsarten wurden bereits viele Versuche unternommen, um therapeutische Targets sowie niedermolekulare Wirkstoffe zu entwickeln, die diesen Pathway blockieren. Beispielsweise hat eine Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit dem potenten Wnt-Antagonisten Dkk1 (Dickkopf1), der auch mit dem LRP6-Rezeptor interagiert, zu einer Hemmung der Epithelproliferation im Colon geführt [51]. Eine Hemmung von Wnt-Rezeptoren ist also bereits therapeutisch nutzbar, da auf diese Weise ein LRP6-Abbau induziert wird [47].

1.3.6.4 LRP6-Signalweg

LRP6 (Low density lipoprotein related protein 6) ist ein essentieller Wnt-Korezeptor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs [62]. LRP6 ist ein Transmembranrezeptor und spielt durch seine Interaktion mit der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade ebenfalls eine große Rolle bei der Regulation der Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration sowie bei der Entwicklung vieler Tumorentitäten. LRP6 scheint keine Korrelation mit dem Östrogen-, Progesteron- oder Her2-Rezeptor zu haben. Allerdings verlängert seine Verwendung als Wirkstoff-Zielrezeptor die Gesamtüberlebenszeit in einem Mausmodell signifikant [63]. Li et al. beobachteten, dass eine Blockade des LRP6-Rezeptors mit dem spezifischem Inhibitor Mesd-Protein in triple-negativen Mammakarzinomen zu einer verringerten Zellmigration und -invasion führte [62]. Mehrere Studien haben darüber hinaus zeigen können, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in TNBC besonders aktiv ist, was unter anderem zu einer Hochregulierung des LRP6

Rezeptors führt. In einer Studie von King et al. verursachte Salinomycin, welches selektiv Brustkrebsstammzellen abtötet, eine Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch eine LRP6-Rezeptorunterdrückung [48]. Der LRP6-Rezeptor stellt also zusammen mit dem oben beschriebenen Wnt/ β -Catenin-Signalweg ein potentielles Target in der molekularen Therapie des TNBC dar.

1.3.6.5 MCL1-Signalweg

MCL1 (Myeloid cell leukemia 1) ist ein antiapoptotisches Protein, welches als Mitglied der Bcl-2-Familie an einer Reihe von Apoptose-regulierenden Prozessen beteiligt ist. Die Bcl-2-Familie stellt eine Klasse von Onkogenen dar, die die Tumorentwicklung nicht durch Hochregulierung der Proliferation fördern, sondern die Lebensfähigkeit der Tumorzellen durch eine Hemmung der Apoptose aufrechterhalten [109]. MCL1 moduliert die mitochondriale Physiologie der Zelle und ist mit einer verstärkten Metastasenbildung sowie einem verminderten DFS assoziiert. Auch MCL1 könnte also von therapeutischem Interesse sein [125]. Die Deletion von MCL1 im Brustdrüsenepithel von gentechnisch veränderten Mäusen zeigte, dass MCL1 eine Voraussetzung für die Tumorentstehung ist. Die Expression von MCL1 ist folglich mit einer schlechten Prognose von TNBC-Patientinnen verbunden und somit ein interessanter Angriffspunkt für molekulare Therapieansätze [10].

1.3.6.6 FOXP3-Transkriptionsfaktor

FOXP3 (Forkhead-Box-P3) ist ein wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Funktion und Entwicklung regulatorischer T-Zellen (Tregs) [31], doch auch Tumorzellen in Brustkrebs, Pankreaskrebs und Melanomen können selbst FOXP3 exprimieren.

FOXP3 ist ein potenter Repressor von mehreren bekannten Onkogenen und stellt somit ein Ziel für neue therapeutische Interventionen bei TNBC dar. Es ist mitverantwortlich für die TNBC-Anfälligkeit und maßgeblich an der Prognose beteiligt, wobei diese stark von der zellulären Lokalisation von FOXP3 abhängt

[61]. Ist FOXP3 im Zytoplasma vorhanden, so ist es ein Marker für eine schlechte Prognose. Wird die Anwesenheit aber im Zellkern bestätigt, so ist FOXP3 ein Marker für ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben [107]. Darüber hinaus könnte die FOXP3-Expression in Tumorzellen ein unabhängiger starker Prognosefaktor für Fernmetastasen in Mammakarzinomen sein [67]. Möglicherweise scheinen FOXP3 aktivierte regulatorische T-Zellen am Tumorfortschritt sowie der folgenden schlechten Prognose beteiligt zu sein [80].

Es wurde mehrfach berichtet, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten (TLS) mit dem klinischen Bild verschiedener maligner Tumoren, einschließlich TNBC, in Verbindung stehen. Dennoch wird die prognostische Wertigkeit von FOXP3 weiterhin kontrovers diskutiert. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass TNBC mit nachgewiesenem FOXP3 sowie tumorinfiltrierenden Lymphozyten deutlich weniger empfindlich auf Chemotherapien ansprechen und somit mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert waren [14, 70]. Nach Oda et al. soll dagegen der Nachweis von FOXP3 mit TLS für eine bessere Prognose und ein besseres Therapieansprechen stehen [79].

1.4 Fragestellung

Es besteht ein dringender Bedarf an neuen Strategien in der Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms, die auf inter- und intrazelluläre Signaltransduktionswege, aber auch auf die Zelladhäsion sowie Zellproliferation abzielen.

Ziel dieser Studie ist es, neue Angriffspunkte für eine mögliche Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms zu ermitteln. Brustkrebserkrankungen, die der triple-negativen Subgruppe zugeordnet werden unterscheiden sich oft in anderen Tumorcharakteristika voneinander, so dass möglicherweise für die verschiedenen Unterklassen des TNBC verschiedene therapeutische Ansätze gefunden werden müssen. Als Angriffspunkte für Therapeutika bieten sich Moleküle und Proteine an, die an einer Signaltransduktionskaskade beteiligt sind, welche die Funktionen sowie Zellwachstum und- differenzierung, Zelladhäsion

und Apoptose reguliert. Der mTOR-, Hedgehog-, Wnt/ β -Catenin- oder Notch-Signalweg stellen hier wichtige potentielle Targets dar.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung sollen immunhistochemisch die Expressionen von HIF1 α , Notch1, LRP6, β -Catenin, MCL1, XBC1 und FOXP3 und die Korrelationen zwischen ihnen dargestellt werden. Außerdem sollen die Zusammenhänge der etwa vorhandenen Expression mit dem Überleben der Patientinnen, der TumorgroÙe, dem Tumorstaging und dem Metastasierungsgrad analysiert werden. Es sollen somit Zielgene und Regulatoren aus verschiedenen Pathways identifiziert werden, die als potentielle Angriffspunkte für mögliche neue onkologische Therapien dienen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Gemäß der Erklärung von Helsinki liegt für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit ein positives Votum der Ethikkommission der LMU München vor (LMU 048-08 und 148-12).

Bei der Untersuchung kamen Gewebeproben von Patientinnen zur Verwendung, die sich zwischen 2001 und 2002 an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der LMU einer operativen Behandlung ihres Mammakarzinoms unterzogen hatten. Intraoperativ wurde den Patientinnen Tumorgewebe zur histopathologischen Beurteilung entnommen. Diese Gewebeproben wurden in der Abteilung für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in Paraffin eingebettet und der Östrogen-, Progesteron- sowie der Her2-Status bestimmt.

Es wurden die in Paraffin eingebetteten Tumorpräparate von 31 Patientinnen (Durchschnittsalter 62 Jahre) ausgewählt, deren Östrogen-, Progesteron- sowie Her2-Bestimmungen negativ ausgefallen waren, d.h. die Patientinnen waren an einem triple-negativen Karzinom (TNBC) erkrankt. Die Tumorproben dieser 31 Patientinnen wurden in der Abteilung für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München neuerlich pathologisch klassifiziert (vgl. Tabelle 6, S. 35).

An diesen Gewebeproben wurden in der Folge die immunhistochemischen Untersuchungen vollzogen, die in der Forschungsarbeit beschrieben werden.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips advanced	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Dispenser	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger Superfrost Ultra Plus® inkl. Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Kühlschrank	Bosch GmbH, Stuttgart
Schnellkochtopf vitafit®	Fissler GmbH, Idar-Oberstein
Kochfeld Typ THL 2597	Rommelsbacher, Dinkelsbühl
Schlittenmikrotom Hn40	Reichert-Jung, Leica, Wetzlar
Mikroskop Leitz Diaplan	Leitz, Wetzlar
Mikroskopkamera KY-F55BE	JVC, Japan

2.2.2 Reagenzien

Die Paraffinschnitte wurden mit Xylol der Firma J.T.Baker (Deventer, Niederlande) entparaffiniert. Die Alkohole sowie das während des immunhistochemischen Färbeprozesses verwendete saure Hämalaun nach P. Mayer stammten aus der Apotheke Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde 30%iges Wasserstoffperoxid der Firma VWR International S.A.S (Briare, Frankreich) mit Methanol der Firma Merck KGaA (Darmstadt) gemischt. Die Demaskierung durch Hitzevorbehandlung erfolgte mit Natrium-Citratpuffer (pH=6,0), bestehend aus Lösung A [21,01g 0,1M Zitronensäure (Firma Merck KGaA, Darmstadt) in einem

Liter destilliertem Wasser] und Lösung B [29,41g 0,1M Natrium-Citrat (Firma Merck KGaA, Darmstadt) in einem Liter destilliertem Wasser].

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser der Firma Noll Karl W. Wasserdestillation (München) beziehungsweise mit PBS (Phosphate-Borate-Saline)-Puffer (Dulbecco) der Firma Biochrom AG (Berlin) gewaschen.

Als Detektionssysteme dienten Vectastain® ABC KIT für Mouse-IgG- und Rabbit-IgG-Antikörper der Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA). Für die Substratfärbung bezogen wir DAB (3,3 Diaminobenzidin) und Chromogen von Dako North America Inc. (Carpinteria, USA).

Als Negativkontrollseren wurden je nach Herkunft des verwendeten Primäantikörpers entweder Maus-isotypspezifische Kontrollreagenzien (X0931; Klon Dak-GO1) der Firma Dako oder präimmunes Kaninchenserum (HK408; Rabbit Super SensNegative Control, 17ml) der Firma BioGenex (BioGenex Laboratories; San Ramon, USA) benutzt.

Weiterhin wurde zum Eindecken der Paraffinschnitte Thermo Scientific Shandon Consul-Mount der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) verwendet.

2.2.3 Bei der ABC-Methode verwendete Chemikalien und Lösungen

- Na-Citratpuffer-Gebrauchslösung: 18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B + 900ml Aqua dest. (Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Lösung A: 21.01g 0,1M Zitronensäure (Merck#244, Darmstadt)) + 1l Aqua dest. (Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Lösung B: 29,41g 0,1M Na-Citrat (Merck #6448, Darmstadt) + 1l Aqua dest. (Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Vectatain Elite mouse-IgG-Kit:
Blockierserum = drei Tropfen Normalserum auf 10 ml steriles PBS
Sekundärantikörper = biotinierter Link-Antikörper, welcher den ABC-Komplex bindet = drei Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Antimouse-Ig (blaue Flasche) + 10 ml PBS
- ABC-Komplex = Ansetzen aus vier Tropfen Reagenz A + vier Tropfen Reagenz B + 10ml steriles PBS (Diese Lösung muss dreißig Minuten vor dem Gebrauch ruhen.)
- DAB (3,3 Diaminobenzidin) = zwei Tropfen Puffer + zwei Tropfen DAB Chromogen + 2 ml destilliertes Wasser (Aqua dest.)

2.2.4 Verwendete Antikörper

Die Tumor-Paraffinschnitte jeder Patientin wurden einzeln mit den in Tabelle 5 genannten Antikörpern angefärbt.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
Anti-HIF1 α Klon: ESEE122	Monoklonaler Rabbit-IgG- Antikörper	1:2000	Sigma Aldrich	SAB5200017
Anti-Beta- Catenin	Polyklonaler Rabbit-IgG- Antikörper	1:300	Diagnostic Biosystems	RP 080
Anti-XBP1 Klon: 7494	Monoklonaler Rabbit-IgG Antikörper	1:400	Sigma Aldrich	AV38553
Anti-FOXP3		1:300	Abcam	AB20034
Anti- NOTCH1 Klon: mN1A	Monoklonaler Mouse-IgG- Antikörper	1:100	Sigma Aldrich	N6786
Anti-MCL1 Klon: Y37	Monoklonaler Rabbit-IgG- Antikörper	1:1000	Abcam	AB32087
Anti-LRP6	Rabbit-IgG- Antikörper	1:80	Millipore	06-017

2.3 Immunhistochemische Untersuchungen

In der Immunhistochemie wird die spezifische Bindung von Antikörpern genutzt, um Antigene an einem histologischen/pathologischen Präparat sichtbar zu machen. Wenn ein Gewebeschnitt mit einem Antikörper inkubiert wird, um ein bestimmtes Antigen (hier: Signaltransduktionsmoleküle) nachzuweisen, muss diese Bindung sichtbar gemacht werden. Ein primär bindender Antikörper wird also durch Bindung an einen fluoreszierenden Farbstoff markiert. Außerdem

können auch Enzyme an den Antikörper binden, welche dann in einem weiteren Schritt immunhistochemisch nachgewiesen werden.

2.3.1 Konservierung der Gewebeproben (Formalinfixierung, Einbetten in Paraffin, Herstellung der Gewebeschnitte)

Die folgenden Einzelschritte zur Konservierung, d.h. Fixierung, Einbettung des Gewebes in Paraffin sowie das Schneiden der Gewebeschnitte am Mikrotom wurden von Labormitarbeiterinnen der Frauenklinik Maistraße, Universitätsklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München, durchgeführt. Dennoch sollen diese Schritte hier zum Gesamtverständnis der Methodik erläutert werden.

Eine Konservierung des zu untersuchenden Gewebes ist notwendig, da sonst degenerative Prozesse eine spätere Analyse des Gewebes unmöglich machen. Um diese Autolyse der Präparate zu verhindern und Antigene nachweisen zu können, wird das Präparat in neutral gepuffertem NBF (Neutral buffered formalin) fixiert. NBF besteht aus Formalin, welches um das Zehnfache unter anderem mit anorganischen Salzen verdünnt wurde, um einen neutralen pH-Wert zu gewährleisten. Die Fixierung wird durch das Binden des Formalins an basische Aminosäuren hervorgerufen. Durch die Bildung von Methylbrücken entsteht ein Netz aus Formaldehyd- und Eiweißmolekülen. Hieraus resultiert eine verringerte Permeabilität für Makromoleküle, während die Struktur der Eiweiße unverändert bleibt.

Obwohl es zu einer schnellen Penetration der Formaldehydmoleküle durch das Gewebe kommt, gehen die übrigen chemischen Prozesse nur langsam vor sich. Die Dauer ist dabei von der Größe des zu fixierenden Gewebestückes abhängig. Bei den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Proben hat der Fixationsprozess bis zu 24 Stunden gedauert.

Bevor die formalinfixierten Präparate in Paraffin eingebettet werden können, muss das Formaldehyd mit Wasser ausgewaschen werden.

Da Paraffin sich überall dort im Gewebe anlagert, wo sich auch Wasser befindet, muss den Präparaten vor dem Einbetten mit einem Lösungsmittel das Wasser

entzogen werden. Hierzu werden als Lösungsmittel Xylol sowie mehrere siebzigprozentige und absolute Alkohole in Reihe verwendet. Das Lösungsmittel Xylol arbeitet hierbei als Intermedium, da es sich mit Wasser, aber auch mit den Alkoholen mischt. Auf diese Weise werden die Präparate weitestgehend entwässert, so dass dann eine Einbettung in Paraffin folgen kann.

Es wird hierzu flüssiges, auf 60°C erhitztes Paraffin um die in Metallformen gegebenen Präparate gegossen. Die Paraffinblöcke lässt man anschließend abkühlen.

Für die mikroskopische Untersuchung werden von den Paraffinblöcken mit einem Schlittenmikrotom 2-3 µm dicke Gewebeschnitte anfertigt. Anschließend werden diese Schnitte auf für die Immunhistochemie speziell hergestellte Objektträger („SuperFrostPlus“, Firma Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen. Bei diesen Objektträgern soll eine bestimmte positive Ladung der Oberflächen für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte sorgen. Die Gewebeschnitte werden auf den Objektträgern bei ca. 56-58° Celsius zwölf Stunden lang getrocknet, was ebenfalls die Haftung noch verbessert.

2.3.2 Immunhistochemische Färbungen

2.3.2.1 Prinzipien der ABC-Methode

Die Reaktionen, welche durch die Spezifität und Affinität von immunologischen Antikörpern stattfinden, kann man in der Immunhistochemie zu genauen Lokalisation der Epitope gesuchter Antikörper nutzen. Als Epitope bezeichnet man Sequenzen von ca. 10 Aminosäuren, gegen welche die Antigenbindungsstellen des speziell verwendeten Antikörpers gerichtet sind. Dieses immunhistochemische Verfahren teilt sich in zwei Schritte. Es wird als erstes ein primärer Antikörper verwendet, welcher spezifisch an ein Epitop des untersuchten Antigens bindet. In einem nächsten Schritt muss dieser erste Antikörper sichtbar gemacht werden. Für dieses Vorgehen gibt es indirekte und direkte Methoden. Bei der direkten Methode wird der primär gebundene Antikörper mit einem zusätzlichem Markermolekül z.B. einem fluoreszierenden

Marker gekoppelt, der in einem weiteren Schritt sichtbar gemacht wird. Bei der indirekten Methode wird die Antikörper-Antigen-Reaktion mit der Hilfe weiterer chemisch-immunologischer Reaktionen dargestellt. Es werden hierfür in der Regel Antikörper verwendet, welche an den ersten bereits gebundenen Antikörper binden und gleichzeitig ein zusätzliches Makromolekül tragen [7].

Für die vorliegende Untersuchung wurde die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) verwendet. Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) basiert auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glycoprotein (Tetramer) mit einem Molekulargewicht von 68kDa und vier Bindungsstellen für Biotin. Da es teilweise zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin kommt, wurde auf gentechnischem Weg das reinere Produkt Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert. Für die ABC-Methode verwendet man einen Brückenantikörper, der biotinyliert ist, das heißt mit Biotin markiert wurde.

Bei Biotin handelt es sich um ein wasserlösliches Vitamin der Gruppe B, das sich gut an einen Brückenantikörper koppeln lässt und somit die Verbindung zum ABC-Komplex herstellt. Es wird dabei ein Multi-Link-Antikörper aus Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies (z.B. Maus, Kaninchen, etc.) verwendet.

An den biotinylierten Brückenantikörper bindet sich der Avidin-Biotin-Komplex, in dem an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird (Abbildung 2). An den Komplex ist außerdem ein Enzym gekoppelt, hier: Peroxidase.

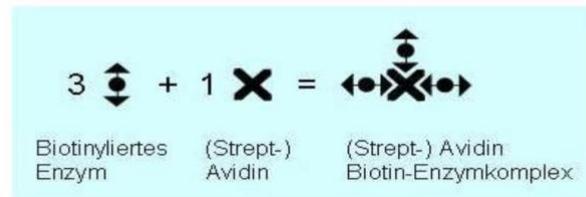
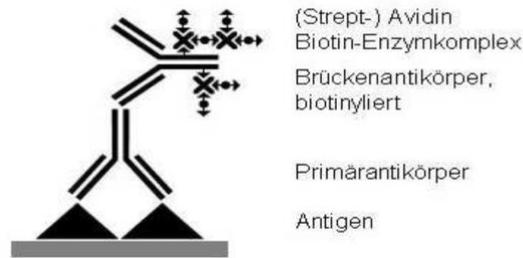


Abbildung 2: Prinzip der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) [77]

Das Enzym Peroxidase für die Konjugation eines Komplexes wird aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen und hat ein Molekulargewicht von 40 kDa. Endogene Peroxidase findet sich hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten, weniger in Dünndarmgewebe und in Nervenzellen. Es kommt zu einer Farbreaktion, indem das Enzym Peroxidase mit dem Substratpuffer H_2O_2 als Katalysator und dem jeweiligen Chromogen (DAB = 3,3 Diaminobenzidin) ein farbiges Endprodukt bildet. Im Falle von DAB ist dieses in organischen Lösungsmitteln unlöslich [77].

Die Detektion der monoklonalen Primärantikörper erfolgte mit der oben erläuterten Streptavidin-Biotin-Methode. Es wurde hierfür weiterhin das Detektionssystem Vectastain Elite mouse-IgG-Kit verwendet (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA).

2.3.2.2 Vorbereitung der Präparate

Die Paraffinschnitte wurden für zwanzig Minuten in Xylol (J. T. Baker, Deventer, Holland) entparaffiniert und anschließend für ca. fünf Minuten in 100% Ethanol (hergestellt durch: Apotheke der LMU) geschwenkt. Die endogene Peroxidase (hergestellt durch: Apotheke der LMU) wurde durch 20-minütiges Verbleiben in 3% H₂O₂-Methanol (= 3 ml 30% H₂O₂ + 97 ml Methanol) blockiert. Im Weiteren wurden die Gewebeschnitte in einer Alkoholreihe von 100%-, 96%- und 70% Ethanol durch zweimaliges zweiminütiges Spülen rehydriert, so dass Ethanolreste mit destilliertem Wasser herausgewaschen wurden.

Zum Darstellen der zu untersuchenden Antigene ist es nötig, eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung vorzunehmen. Durch diese Antigendemaskierung können die verwendeten o.g. Antikörper auch Epitope binden, welche vorher durch Aldehydvernetzung maskiert waren. Das, wie oben beschrieben, durch Formalin verursachte Eiweißmolekülnetz wird durch das Erhitzen der Gewebeschnitte in einem Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,0 wieder aufgehoben [77].

Die Antigendemaskierung erfolgte hier wurde durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit einem Na-Citratpuffer pH 6,0. Hierzu wurde ein handelsüblicher Schnellkochtopf mit Citrat-Puffer befüllt und schnellstmöglich bei maximaler Hitzestufe, d.h. innerhalb von 6 Minuten, zum Kochen gebracht. Nun wurden die Gewebeschnitte in die kochende Citrat-Puffer-Lösung platziert und der Deckel des Schnellkochtopfes verschlossen. Nach fünfminütigem Kochen wurde die Hitzestufe auf Null gestellt. Nach weiteren 5 Minuten wurde der Topf in ein kaltes Wasserbecken verbracht und konnte hier langsam abkühlen. Nach 5minütigem Abdampfen des Schnellkochtopfes wurde der Deckel geöffnet und vorsichtig kaltes Leitungswasser zum Citrat-Puffer hinzulaufengelassen. Hiernach wurden die Gewebeschnitte in destilliertem Wasser abgespült und dann 2 mal 2 Minuten in PBS (Biochrom AG, Berlin) gewaschen.

2.3.2.3 Immunhistochemische Färbung

Zunächst wurde ein Blockierserum mit einer Einwirkzeit von fünf Minuten aufgetragen und danach wieder abgetragen. Das Blockierserum sättigt elektrostatische Ladungen im Gewebe ab und verhindert so, dass die Immunoglobuline sich durch eine hydrophobe Bindung unspezifisch an Strukturen wie Membranen oder Fettgewebe binden; es wird mit diesem ersten Schritt also eine unspezifische Anfärbung der Gewebeschnitte verhindert.

Anschließend wurde einer der Primärantikörper (Tabelle 5, S. 25) aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von sechzehn Stunden über Nacht wurden die Präparate erneut 2 mal 2 Minuten in PBS-Lösung geschwenkt. Hiernach wurde der Sekundärantikörper für weitere zwanzig Minuten aufgetragen und wieder 2 mal 2 Minuten in PBS-Lösung abgewaschen. Als Nächstes wurde der ABC-Komplex nochmals für dreißig Minuten aufgetragen, und wiederum 2 mal 2 Minuten in PBS-Lösung gewaschen.

Die Substratanfärbung erfolgte mit DAB (Dako North America, Carinteria, USA) für dreißig Sekunden mit anschließendem Waschen für zwei mal zwei Minuten in destilliertem Wasser.

Mit Hilfe der Substrat-Chromogen-Reaktion kann nicht unterschieden werden, ob das Enzym Peroxidase im Gewebe lokalisiert war oder ob es nachträglich hinzugegeben wurde (ABC-System plus Peroxidase). Um eine etwa im Gewebe vorhandene Peroxidase zu deaktivieren, wurden die Gewebeschnitte in H_2O_2 erneut beimpft. Zeigten sich Erythrozyten im Gewebeschnitt nach der immunhistochemischen Anfärbung ohne Eigenfarbe war die Blockierung erfolgreich.

Das Chromogen kann mit Hilfe des Katalysators H_2O_2 den Farbstoff DAB (3,3 Diaminobenzidin) ausbilden:

- bräunliche Farbe
- in Wasser unlöslich
- löslich in u.g. aufsteigender Alkoholreihe und Xylol
- Gegenfärbung möglich mit saurem Hämalaun nach Mayer

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit saurem Hämalaun, pH 5,0 (Apotheke LMU) nach Mayer für weitere zwei Minuten gegengefärbt und hiernach für fünf Minuten unter Leitungswasser gebläut.

Bei diesem pH-Wert färben sich nur der Zellkerne, weil nur sie noch eine negative Ladung besitzen. Es lagern sich die basischen Ionen des Farbstoffs an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Zellkern-DNA. Das Bläuen der Gewebeschnitte erfolgt in Leitungswasser in alkalischem Milieu. Zum Ende des Färbeprozesses wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 96%, 100% Ethanol) entwässert. Hiernach erfolgte schließlich die Aufhellung in Carbolxylol (Apotheke LMU) und Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland).

Die fertigen Gewebeschnitte wurden am Ende zur Haltbarmachung mit Deckgläschen („Consul-Mount“, Firma Shandon, Pittsburgh, USA) eingedeckt. Für diese Deckgläschen gilt, dass sie den gleichen Brechungsindex wie Glas haben müssen, um die Färbung und Auswertung nicht zu verfälschen.

Als Negativkontrolle wurden Anfärbungen erstellt, in denen der Primärantikörper durch normales Mausserum in der gleichen Lösung, ersetzt wurde. Positiv angefärbte Zellen zeigten eine bräunliche Färbung, die Negativkontrollen waren so wie ungefärbte Zellen blau.

Positivkontrollen wurden von Gewebe erstellt, welches das Antigen sicher enthält. Diese Färbungen liefen bei den anderen Färbungen stets mit, um sicherzustellen, dass die Anfärbung der Präparate auch gelungen ist.

2.3.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Es wurde je ein Gewebeschnitt erst in Xylol für ca. zwanzig Minuten entparaffiniert und im Anschluss in einer absteigenden Ethanolreihe durch kurzes Schwenken der Schnitte in 100%, 70%, 50% Ethanol rehydriert und dann in destilliertem Wasser gespült. Weiterhin wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in einer Hämalaun-Lösung (Apotheke LMU) gebadet, dann für weitere zehn Minuten unter Leitungswasser gebläut. Im Weiteren wurden diese Schnitte

dann für fünf Minuten in ein Eosinbad (Chroma Gesellschaft, Köngen) getaucht und die Farbe rasch mit Leitungswasser abgespült. Hiernach konnte die erneute Dehydrierung in wie oben genannt aufsteigendem Ethanolbad von 70% zu 100% und schließlich in Xylol durchgeführt werden. Auch hier erfolgte schlussendlich die Eindeckung mit Einschlussmittel („Consul-Mount“, Shandon, Pittsburgh, USA) sowie mit Deckgläschen (R. Langenbrinck, Teningen).

Bei dieser Färbemethode erhält man eine blaue Kernfärbung durch die Hämalaun-Reaktion nach Mayer sowie eine rote Zytoplasmaanfärbung durch die Eosinlösung.

2.3.2.5 Mikroskopische Untersuchung und Auswertung mittels IRS-Score

Die Färbung der Proben wurde von zwei unabhängigen Personen mit einem Leitz Diaplan Lichtmikroskop (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar) beobachtet und ausgewertet.

Die Bewertung der Expression aller Antigene LRP6, MCL1, FOXP3, NOTCH1, β -Catenin, XBP1 wurde lichtmikroskopisch mit Hilfe des semiquantitativen immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner durchgeführt [92]. Der IRS bewertet getrennt die Intensität und Verteilung der immunhistochemischen Färbung.

Die Intensität der Farbreaktion wird in 4 Kategorien beurteilt:

- 0 keine erkennbare Färbung,
- 1 schwache Färbung,
- 2 mäßige Färbung,
- 3 starke Färbung.

Es wird jeweils die maximale Intensität herangezogen – auch wenn sie nur auf einzelne Zellen zutrifft.

Die Verteilung der Färbung wird in Prozentsätzen nach folgenden Kategorien angegeben:

- 0 keine Färbung,
- 1 1- 10% der Zellen angefärbt,
- 2 11-50% der Zellen angefärbt,
- 3 51-80% der Zellen angefärbt,
- 4 >80% der Zellen angefärbt.

Beide Werte werden multipliziert und ergeben einen Score von 0-12 Punkten [92].

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc. Headquarters, Chicago, USA), Version 22.0 durchgeführt.

Für die statistische Analyse wurden die Färbeintensitäten nach dem Median des IRS-Scores in die Gruppen starke/schwache Anfärbung dichotomisiert.

Zur Überprüfung von Korrelationen zwischen der Färbungsintensität und den Tumorparametern wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test eingesetzt.

Überlebenskurven wurden durch Kaplan-Meier-Analyse erzeugt. Hierzu wurden die angefärbten Präparate zu jedem Signaltransduktionsmolekül in die Kategorien starke und schwache Färbung dichotomisiert und die Ergebnisse beider Färbungs-Kategorien mit Hilfe des nichtparametrischen Log-Rank-Tests mit den Kategorien des zu untersuchenden Parameters verglichen.

Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ gewählt. Zusätzlich wurden p-Werte $p \geq 0,05$ bis $p \leq 0,1$ als grenzwertig signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Basisdaten

In der folgenden Tabelle 6 sind die Basisdaten und Tumorklassifizierung der TNBC-Tumoren von 31 Patientinnen zu finden.

Tabelle 6: Basisdaten der TNBC-Patientinnen (n = 31)

* Mehrfachnennungen möglich

Parameter	Kategorien	Anzahl
TumorgroÙe	pT1	19
	pT2	8
	pT3	1
	pT4	2
	pTx	1
Beteiligte Lymphknoten	pN0	17
	pN1	11
	pN2	2
	pNx	1
Metastasen	pM0	20
	pM1	1
	pMx	10
Grading	G1	1
	G2	7
	G3	14
	Gx	9
Histologie	Duktal	18
	Lobular	4
	Medullär	7
	Andere	2
Therapie*	Operation	31
	Chemotherapie	8
	Radiatio	22
	Hormontherapie	2

Parameter	Kategorien	Anzahl
Outcome	Progression	5
	Rezidiv	8
	keine Angabe	18
Überleben	<1 Jahr	2
	1 Jahr bis ≤5 Jahre	9
	5 Jahre bis ≤10 Jahre	19
	≥ 10 Jahre	1

3.2 Antikörperfärbungen von TNBC-Tumorgewebe

Die Färbungen von TNBC-Tumorgewebe mit Antikörpern gegen die verschiedenen Signaltransduktionsmoleküle wurden nach der in Kapitel 2.3 (S. 25ff) beschriebenen Methodik durchgeführt. Es gelang hiermit die Anfärbung aller zur Untersuchung anstehenden Moleküle, wie die folgenden Abbildungen in der Übersicht zeigen.

Die Fotos wurden in 10- und 25-facher Vergrößerung aufgenommen. Hierbei sind die braunen Strukturen das Ergebnis der DAB-Färbung, während sich die Kerne durch die Gegenfärbung mit Hämalaun darstellen ließen.

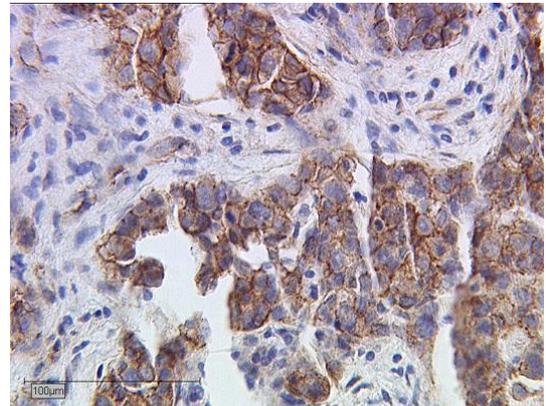
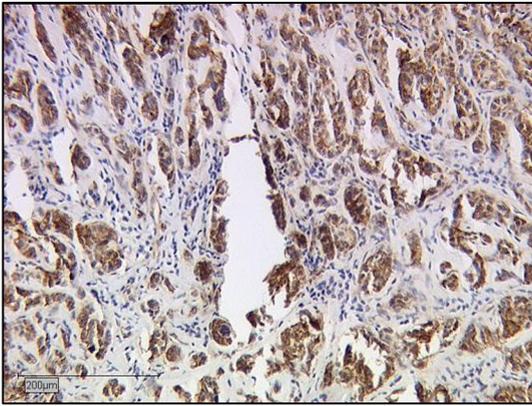


Abbildung 3: β -Catenin-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe
links: 10fache Vergrößerung, rechts: 25fache Vergrößerung

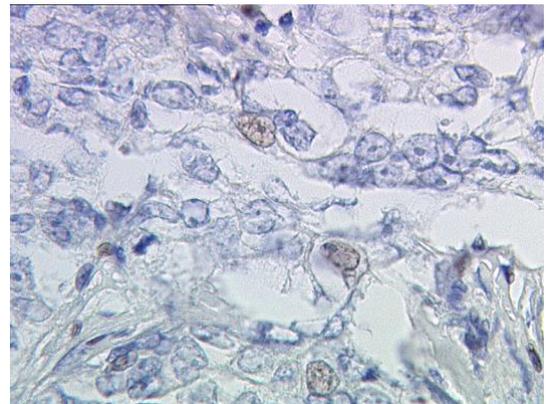
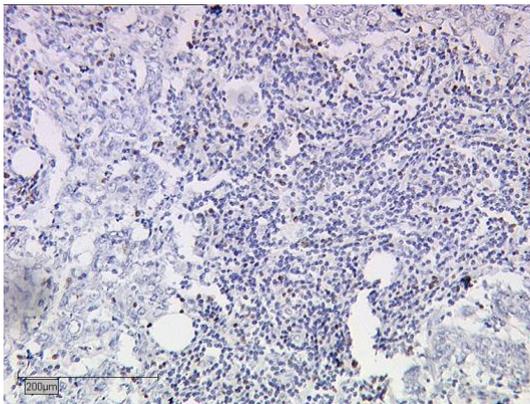


Abbildung 4: FOXP3-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe
links: 10fache Vergrößerung, rechts: 25fache Vergrößerung

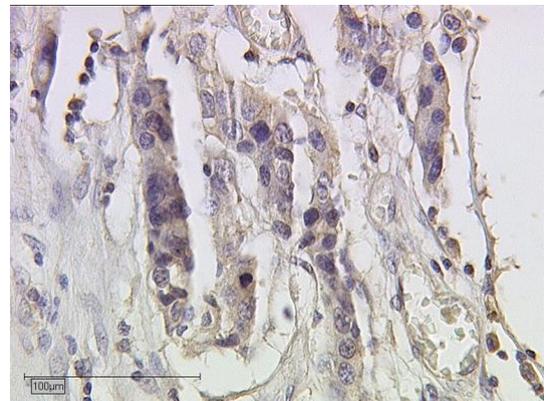
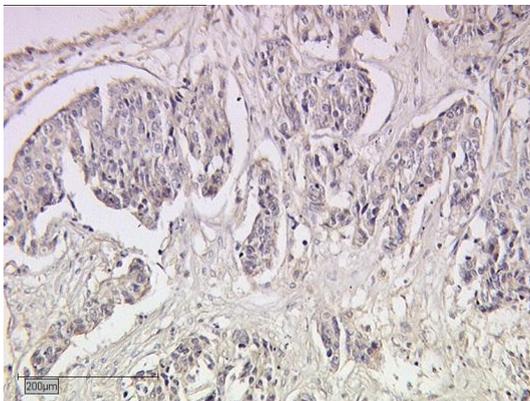


Abbildung 5: HIF1 α Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe
links: 10fache Vergrößerung, rechts: 25fache Vergrößerung

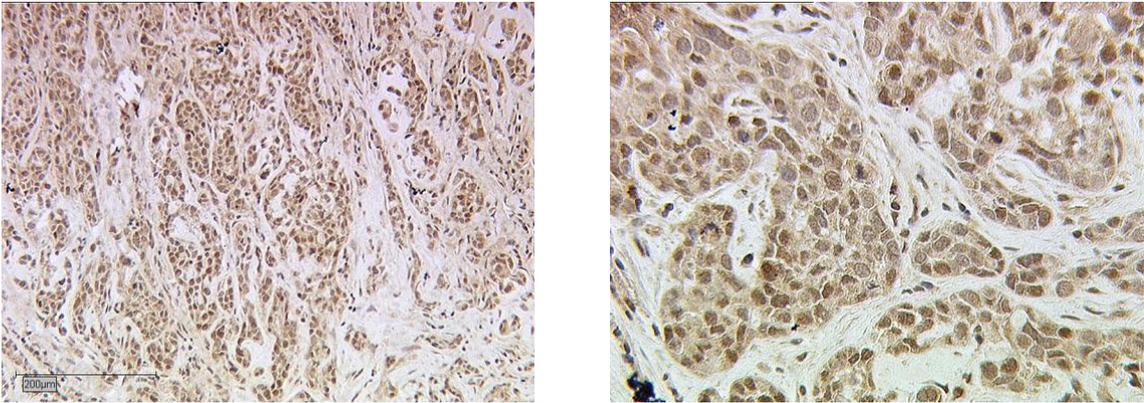


Abbildung 6: LRP6- Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe
links: 10fache Vergrößerung, rechts: 25fache Vergrößerung

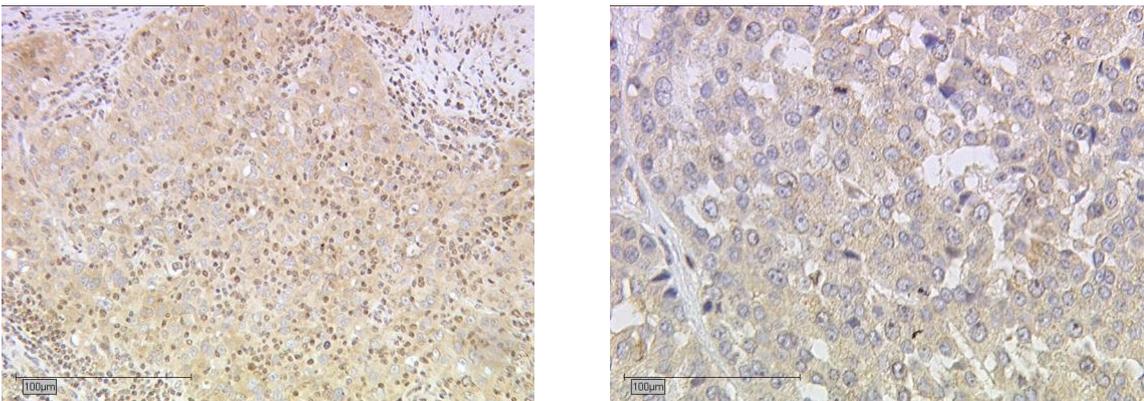


Abbildung 7: MCL1-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe
links: 10fache Vergrößerung, rechts: 25fache Vergrößerung

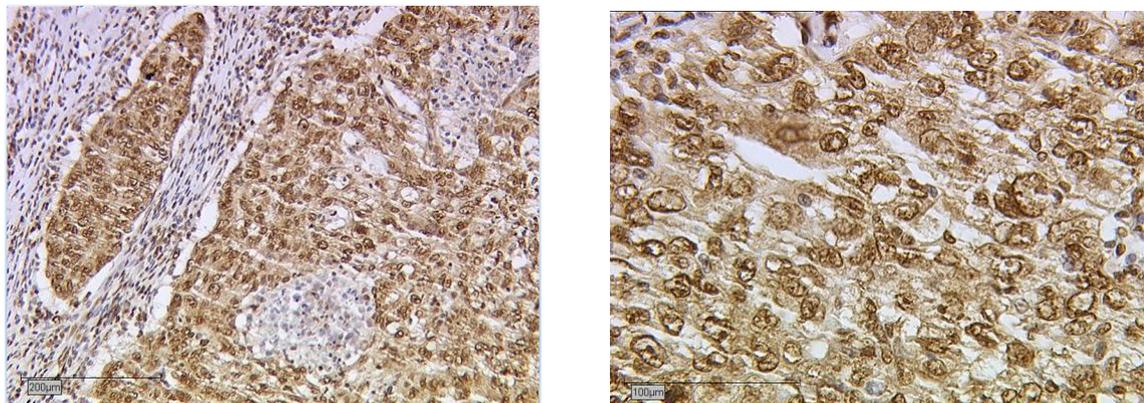


Abbildung 8: NOTCH1- Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe
links: 10fache Vergrößerung, rechts: 25fache Vergrößerung

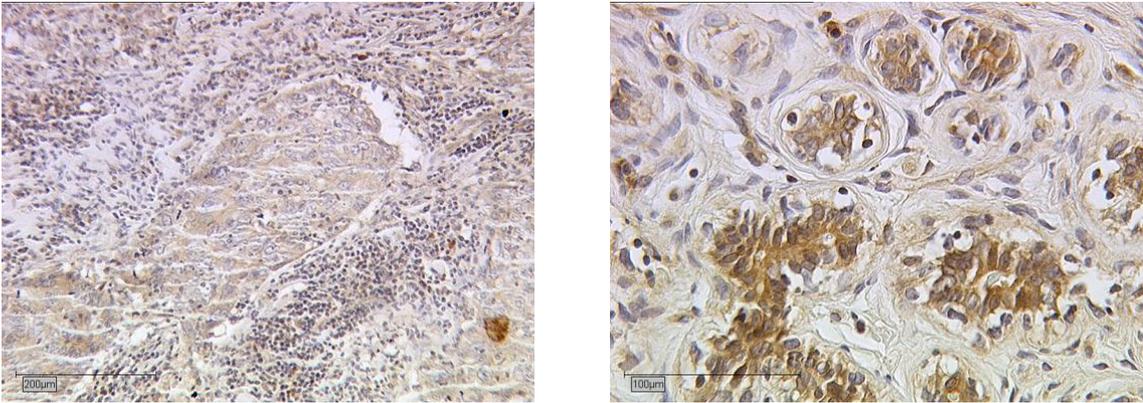


Abbildung 9: XBP1-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe
links: 10fache Vergrößerung, rechts: 25fache Vergrößerung

3.3 Korrelationen zwischen der Färbungsintensität und dem Gesamtüberleben

Zwei Moleküle zeigten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Färbungsintensität und dem Gesamtüberleben der TNBC-Patientinnen: Die FOXP3-Färbung des Tumorzentrums ($p = 0,015$) und die zytoplasmatische HIF1 α -Färbung ($p = 0,004$) (Tabelle 7).

Aus der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 10 (S. 41) wird deutlich, dass Patientinnen mit einer starken Anfärbbarkeit des FOXP3-Proteins im Tumorzentrum deutlich länger überlebten als Patientinnen, deren Tumorzentrum nur eine schwache Anfärbbarkeit von FOXP3 aufwies.

Dagegen überlebten Patientinnen mit einer starken HIF1 α -Färbung des Zytoplasmas hoch signifikant kürzer als diejenigen mit einer nur schwachen HIF1 α -Anfärbbarkeit (Abbildung 14, S. 44).

Für die HIF1 α -Kernfärbung und die FOXP3-Färbung peritumoraler Lymphozyten (TLS) sowie den Tumor selbst bestanden keine Korrelationen zum Gesamtüberleben. Dies gilt auch für alle weiteren untersuchten Signalmoleküle.

Tabelle 7: Gesamtüberleben und Färbungsintensität (statistisch signifikante Ergebnisse sind grau unterlegt)

(CT=Tumorzentrum-Lymphozyten, TLS= Tumor infiltrierende Lymphozyten, Tum=Tumorzellen)

Angefärbtes Signalmolekül	p-Wert (Log-Rank-Test)
β -Catenin-Zytoplasmafärbung	0,193
β -Catenin-Zellkernfärbung	0,293
HIF1 α -Zytoplasmafärbung	0,004
HIF1 α -Zellkernfärbung	0,934
LRP6	0,289
MCL1-Zytoplasmafärbung	0,739
MCL1-Zellkernfärbung	0,203
Notch1-Zytoplasmafärbung	0,283
Notch1-Zellkernfärbung	0,821
XBP1	0,319
FoxP3-CT	0,015
FoxP3-TLS	0,230
FoxP3-Tum	0,433

Die folgenden Abbildungen zeigen die Kaplan Meier Überlebenskurven in Korrelation zur Intensität der Färbung. Es wurde jeweils eine starke oder schwache Anfärbbarkeit des jeweiligen Signaltransduktionsmoleküls zur Überlebenszeit in Beziehung gesetzt.

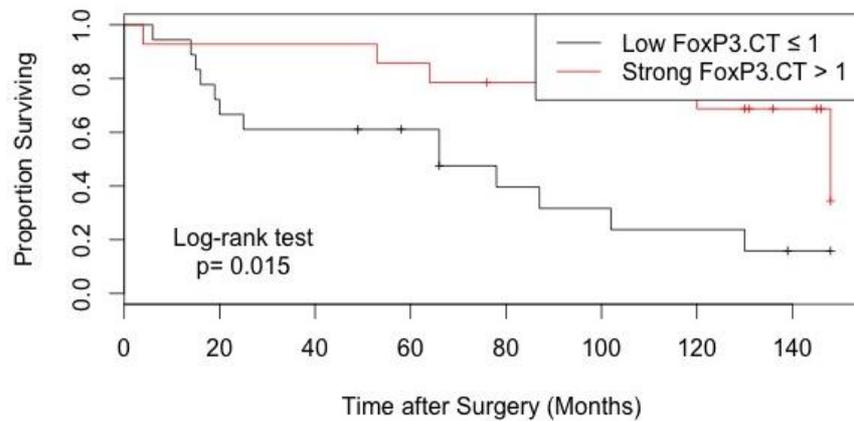


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der FOX-P3-Anfärbung des Tumorzentrums (CT) – Log-Rank-Test: signifikant ($p = 0,015$)

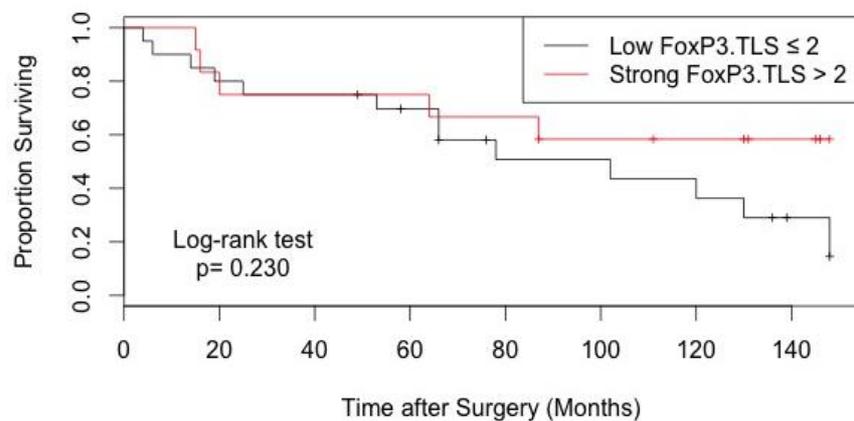


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der FOX-P3-Anfärbung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TLS) – Log-Rank-Test: nicht signifikant

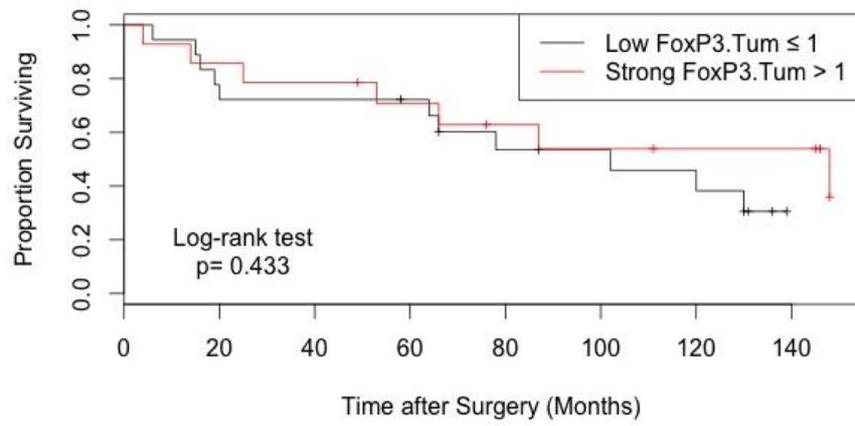


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der FOX-P3-Anfärbung deTumors (Tum) – Log-Rank-Test: nicht signifikant

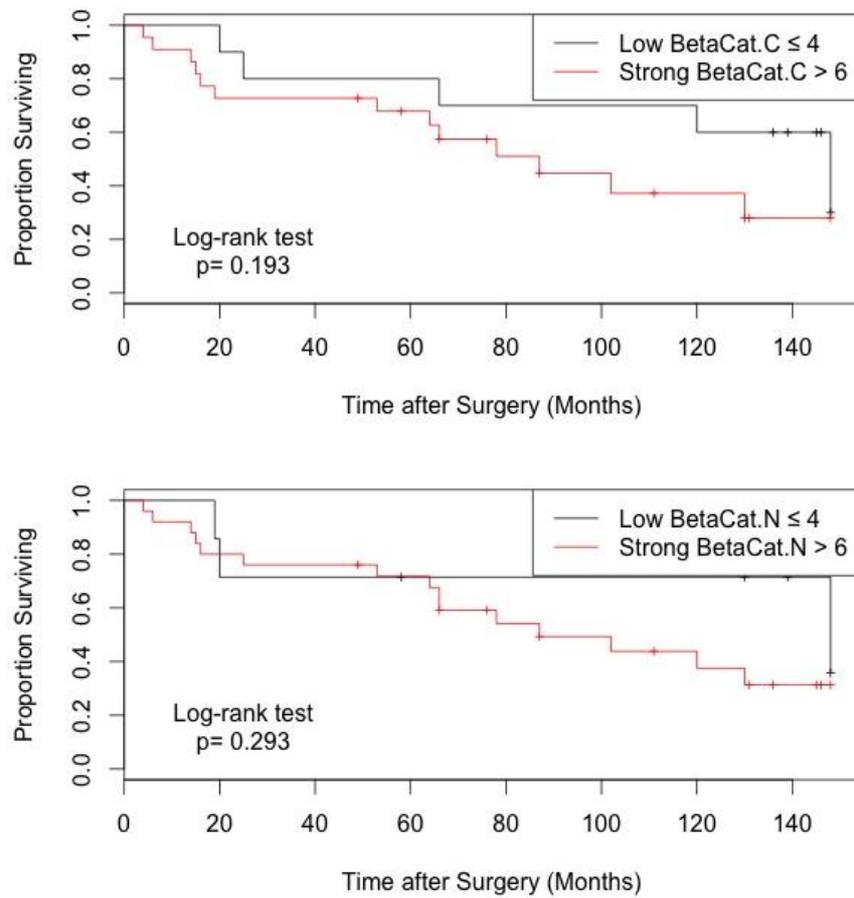


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der β -Catenin-Färbung.
Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: nicht signifikant
Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant

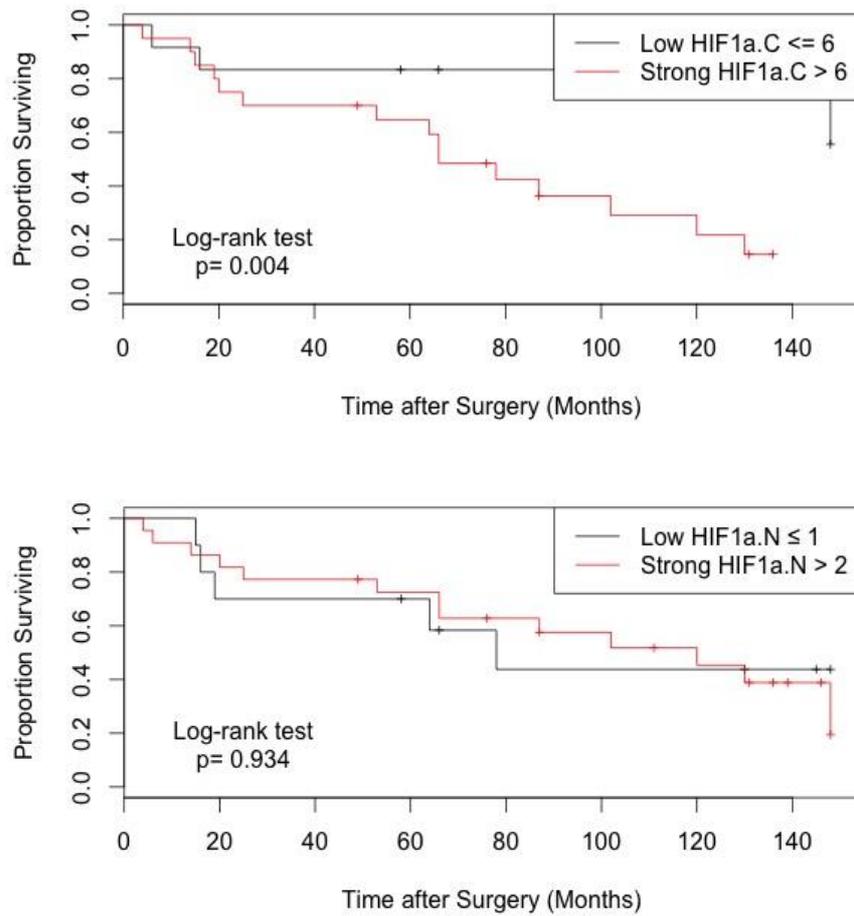


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der HIF1 α -Färbung.

Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: signifikant ($p = 0,004$)
Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant

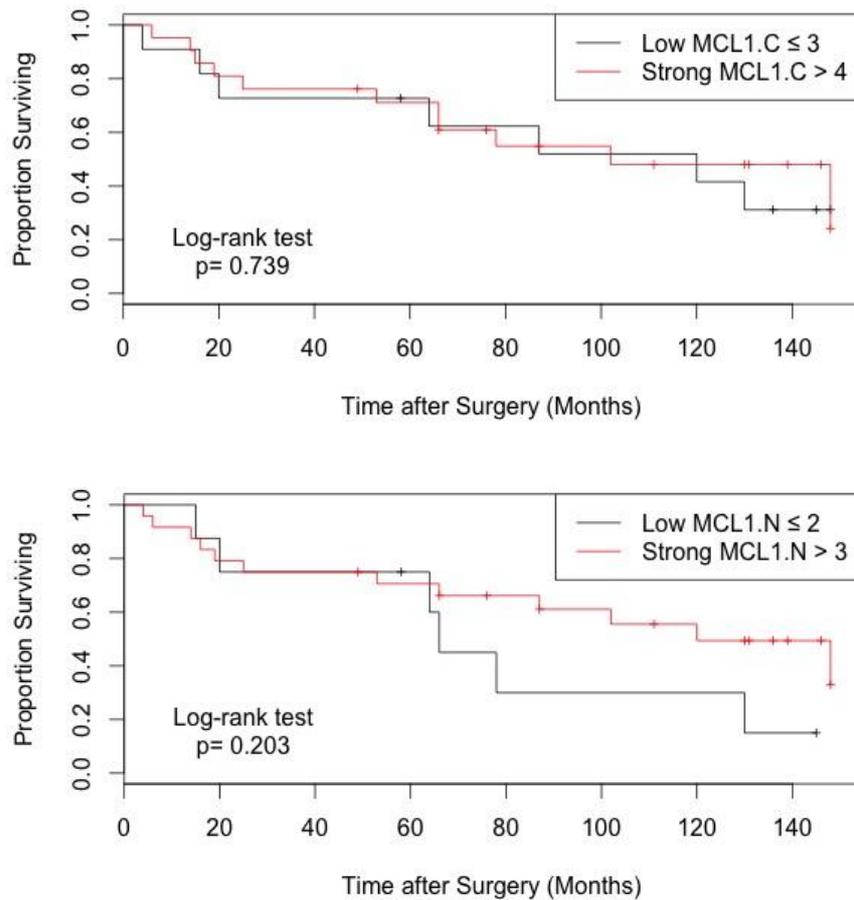


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der MCL1-Färbung.

Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: nicht signifikant

Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant

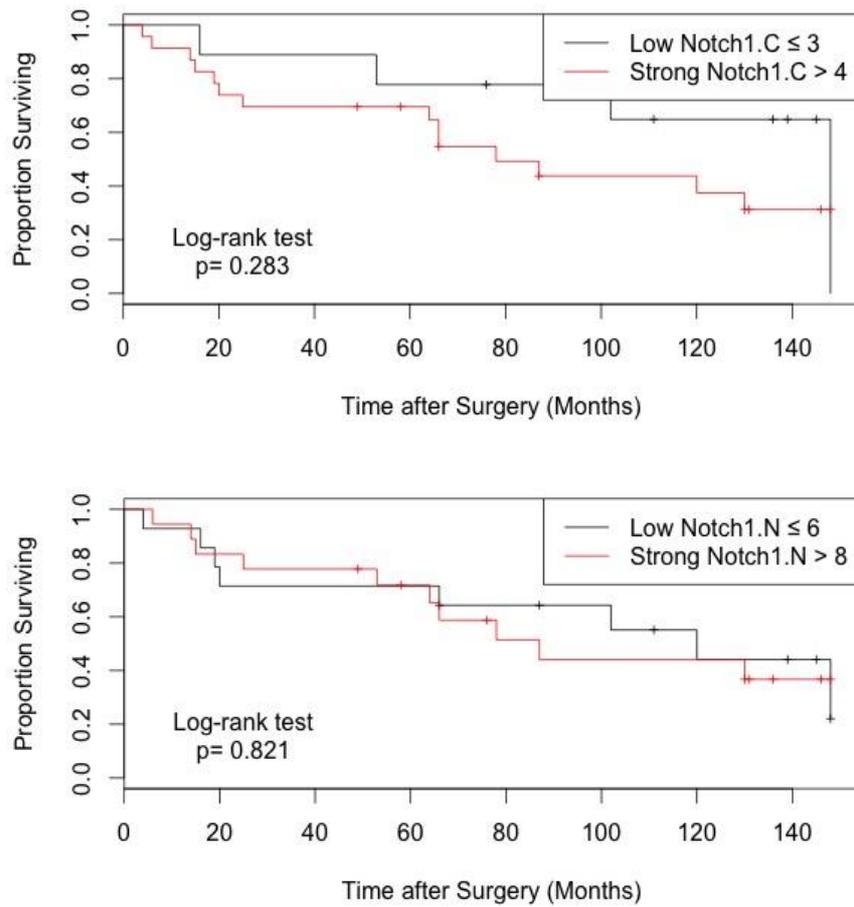


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der Notch1-Färbung.
Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: nicht signifikant
Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant

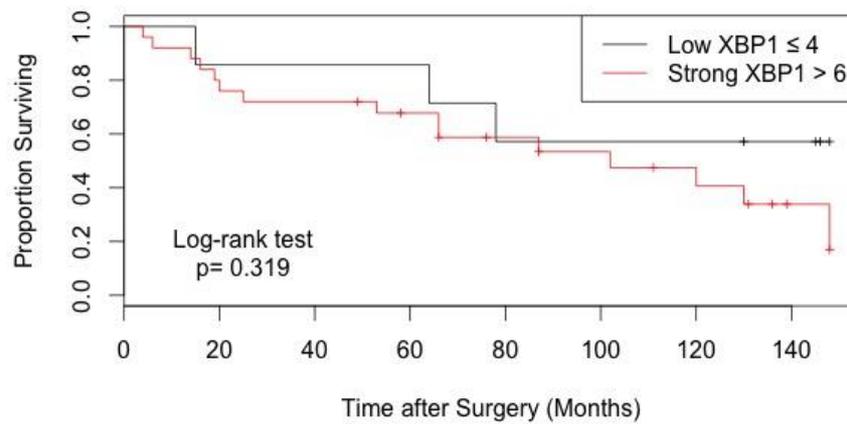


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der XBP1-Färbung. Log-Rank-Test: nicht signifikant

3.4 Korrelationen zwischen der Färbungsintensität und verschiedenen Tumoreigenschaften

In der folgenden Tabelle 8 sind als Ergebnisse des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests die Korrelationen zwischen der Anfärbbarkeit der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle und verschiedenen Tumoreigenschaften dargestellt.

Tabelle 8: Korrelationen der Anfärbarkeit der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle mit verschiedenen Tumoreigenschaften. Kruskal-Wallis-Test. Fett: statistisch signifikante p-Werte ($p \leq 0,05$); kursiv: grenzwertig signifikante Werte ($p \geq 0,05$ bis $p \leq 0,1$).

Tumor Merkmal	HIF1 α		β -Catenin		XBP1	Notch1		MCI1		LRP6	FoxP3	
	Zyto-plasma	Kern	Zyto-plasma	Kern		Zyto-plasma	Kern	Zyto-plasma	Kern		Zyto-plasma	Kern
Grading	0,030	0,269	0,980	0,516	0,225	0,530	0,537	0,302	0,279	0,43	0,711	0,445
Größe	0,849	0,331	0,384	0,701	0,154	0,112	0,369	0,672	0,705	0,355	0,282	0,368
Lymphknoten-Beteiligung	0,208	0,751	0,377	0,656	0,615	0,049	<i>0,063</i>	0,605	0,233	0,154	0,189	0,707
Metastasen	0,704	0,982	0,189	0,659	0,921	0,294	0,706	0,769	0,938	0,458	0,667	0,627
Histologie	0,594	0,317	0,192	0,426	0,984	0,350	0,315	0,426	0,556	0,315	0,755	0,392
Menopausal state	0,750	0,591	<i>0,068</i>	0,609	0,767	0,476	0,298	0,557	0,151	0,801	0,663	0,542

Es zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der HIF1 α -Anfärbarkeit im Zytoplasma und dem Tumorgrading ($p = 0,030$) (Abbildung 18).

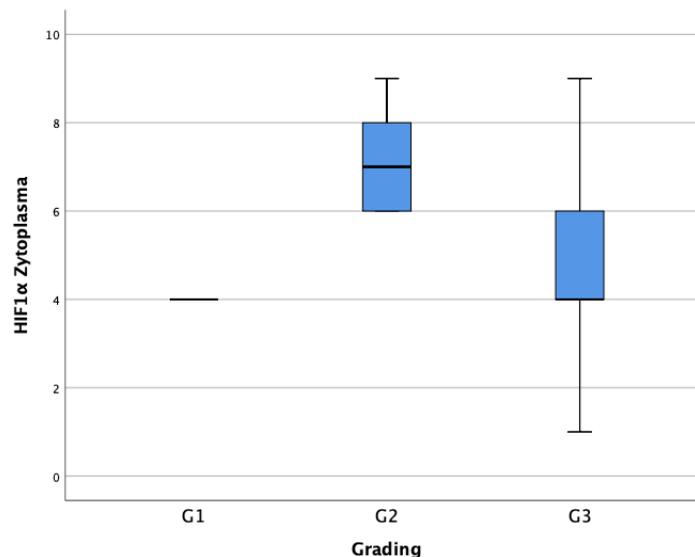


Abbildung 18: Anfärbarkeit von HIF1 α im Zytoplasma in Abhängigkeit vom Tumorgrading – Kruskal-Wallis-Test: signifikant ($p = 0,30$)

Die statistische Testung des Zusammenhangs zwischen der zytoplasmatischen β -Catenin-Anfärbarkeit und dem menopausalen Status verfehlte mit $p = 0,068$ knapp die Grenze zur statistischen Signifikanz (Abbildung 19).

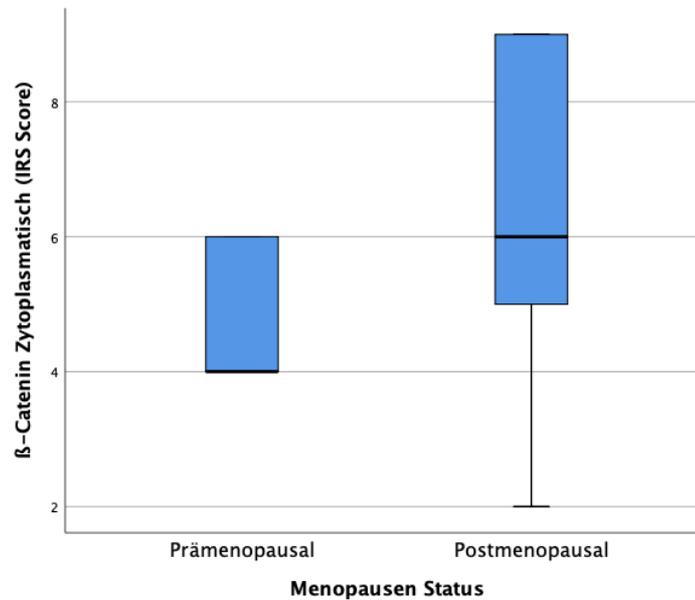


Abbildung 19: Anfärbarkeit von β -Catenin im Zytoplasma in Abhängigkeit vom menopausalen Status. Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,068$)

Außerdem wurde eine Assoziation zwischen der Notch1-Färbung und dem Lymphknotenstatus nachgewiesen. Der Test war für die zytoplasmatische Anfärbarkeit mit $p = 0,049$ statistisch signifikant und wies für die nukleäre Anfärbarkeit mit $p = 0,063$ eine Borderline-Signifikanz auf (Abbildung 20).

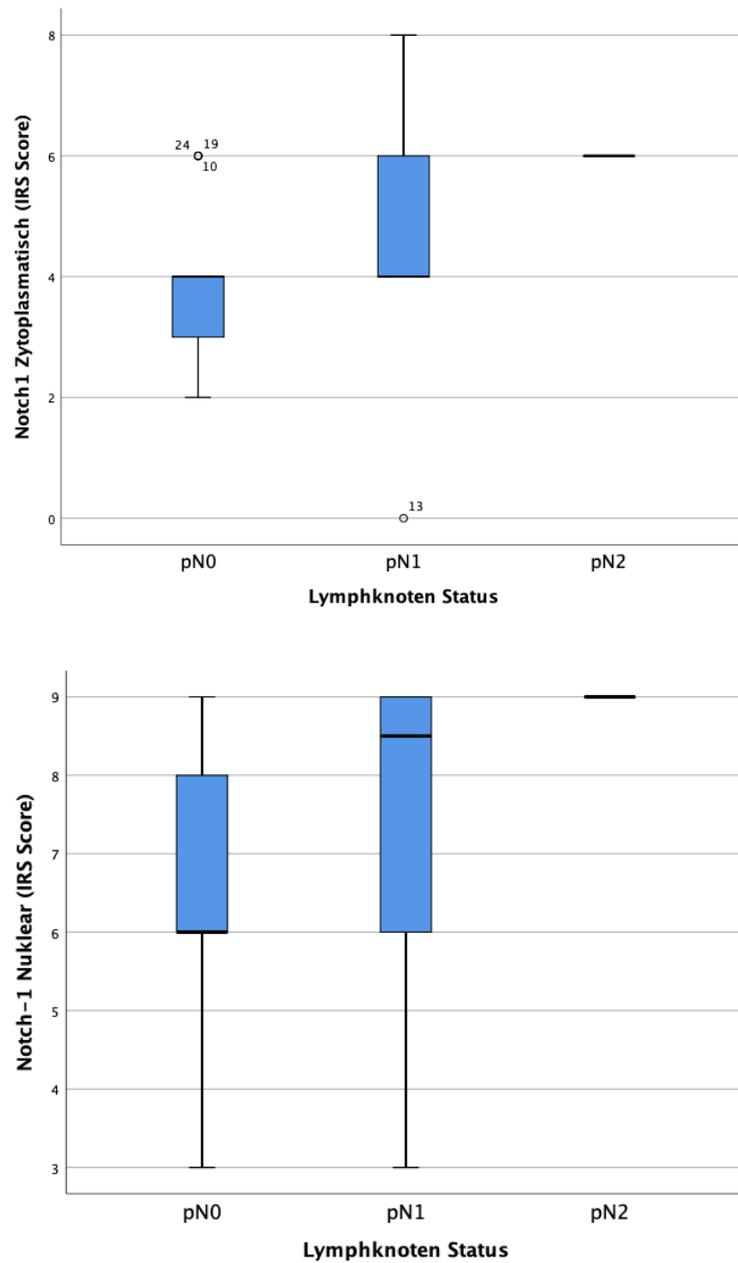


Abbildung 20: Anfärbarkeit von Notch1 in Abhängigkeit vom Lymphknoten-Status.
 Oben: zytoplasmatisch; Kruskal-Wallis-Test: signifikant ($p = 0,049$)
 Unten: nukleär; Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,063$).

Für die übrigen Tumorparameter wie Tumorgröße, Metastasierung und Histologie konnten keine signifikanten Korrelationen zur Anfärbarkeit von HIF1 α

und Notch1 gefunden werden. Auch für die Signalmoleküle nukleäres HIF1 α , nukleäres β -Catenin, XBP1, MCL1, LRP6 und FOXP3 konnte kein Einfluss auf die untersuchten Tumoreigenschaften nachgewiesen werden.

3.5 Korrelationen zwischen der Färbungsintensität und dem Vorkommen von Tumorrezidiven

Abschließend wurde untersucht, ob das Vorhandensein der Signaltransduktionsmoleküle mit Lokal-, Lymphknoten- oder Metastasenrezidiven korreliert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Korrelationen der Anfärbbarkeit der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle mit verschiedenen Rezidiven (Tumor, Lymphknoten, Metastasen). Kruskal-Wallis-Test.
Fett: statistisch signifikante p-Werte ($p \leq 0,05$); kursiv: grenzwertig signifikante Werte ($p \geq 0,05$ bis $p \leq 0,1$).

Art des Rezidivs	HIF1 α		β -Catenin		XBP1	Notch1		MCL1		LRP6	FoxP3	
	Zyto-plasma	Kern	Zyto-plasma	Kern		Zyto-plasma	Kern	Zyto-plasma	Kern		Zyto-plasma	Kern
Lokal	0,188	0,787	0,946	0,209	0,909	0,188	0,163	0,621	0,112	0,270	0,448	0,083
Lymphknoten	0,312	0,953	0,239	0,018	0,059	0,312	0,418	0,638	0,241	0,470	0,508	0,906
Metastasen	0,896	0,965	0,007	0,100	0,225	0,370	0,082	0,387	0,560	0,426	0,661	0,761

Bei β -Catenin korrelierte die Kernfärbung mit einem Wiederauftreten von Lymphknotenmetastasen ($p = 0,018$, Abbildung 21) während die zytoplasmatische Färbung mit dem Auftreten von Metastasenrezidiven verbunden war ($p = 0,007$, Abbildung 22). Die nukleäre β -Catenin-Färbung korrelierte ebenfalls, allerdings nur grenzwertig, mit dem Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,100$, Abbildung 23).

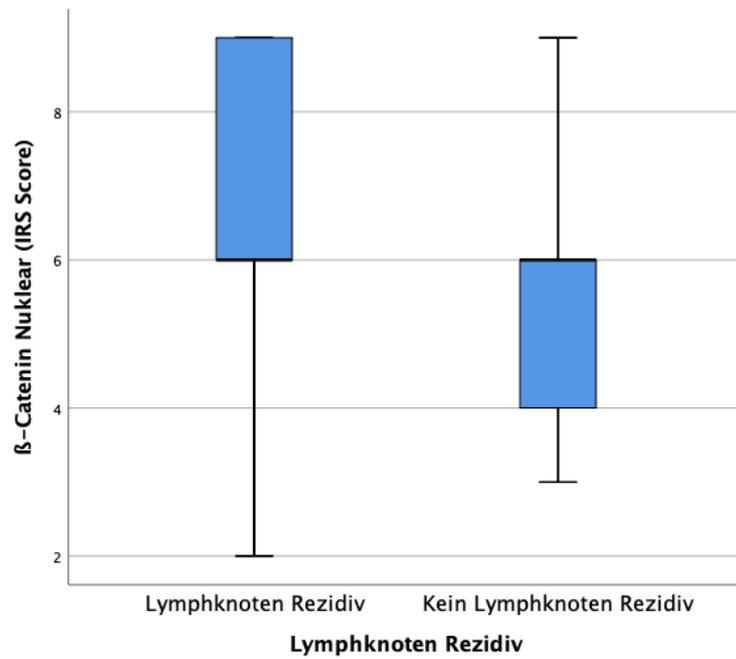


Abbildung 21: Anfärbarkeit von β -Catenin im Zellkern bei Lymphknotenmetastasen. Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,018$)

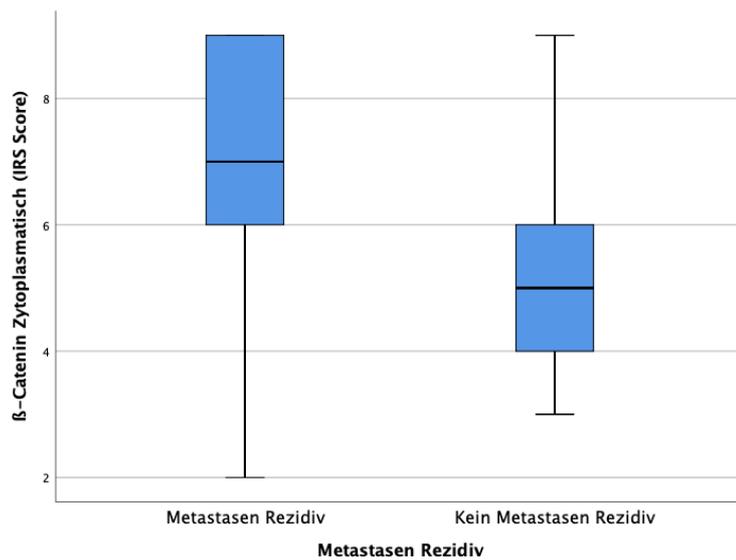


Abbildung 22: Anfärbarkeit von β -Catenin im Zytoplasma bei Fernmetastasen. Kruskal-Wallis-Test: signifikant ($p = 0,007$)

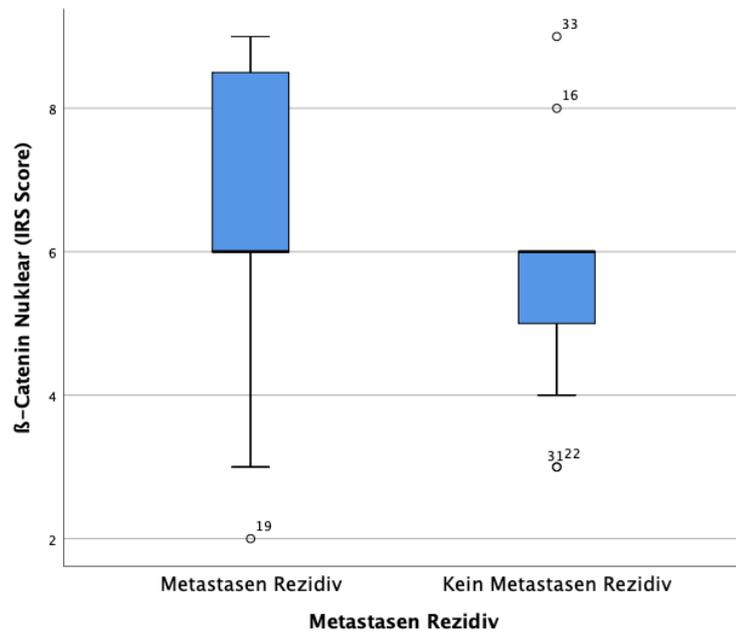


Abbildung 23: Anfärbarkeit von β -Catenin im Zellkern bei Fernmetastasen.
Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,1$)

Für drei weitere Signaltransduktionsmoleküle wurden ebenfalls grenzwertige Signifikanzen gefunden: XBP-1 könnte mit einem Lymphknotenrezidiv in Verbindung gebracht werden ($p = 0,059$), die nukleäre Notch1-Färbung zeigte eine grenzwertige Korrelation mit der Fernmetastasenbildung ($p = 0,082$) und die FOXP3-Kernfärbung scheint mit dem Auftreten von Lokalrezidiven in Zusammenhang zu stehen ($p = 0,083$) (Tabelle 9).

Keine statistischen Auffälligkeiten zeigten sich hingegen für die Färbungen: HIF1 α , zytoplasmatische Notch1, zytoplasmatische FOXP3, MCL1 und LRP6 (Tabelle 9).

4 Diskussion

Brustkrebs ist nach Ferlay et al. die zweithäufigste Krebsart weltweit. Von allen Brustkrebssubtypen macht der triple-negative Brustkrebs (TNBC) ca. 20% aus [12]. TNBC zeichnet sich dadurch aus, dass der Progesteronrezeptor (PR), der Östrogenrezeptor (ER) und auch der HER2/neu-Rezeptor nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert werden. TNBC-Patientinnen haben im Vergleich zu anderen Brustkrebssubtypen ein deutlich höheres Risiko an lokalen Rezidiven, Lymphknoten-, Lungen- oder Hirnmetastasen zu versterben. Die Mehrheit der TNBC-Patientinnen entwickelt innerhalb der ersten 3 Jahre nach der Diagnose Metastasen; Patientinnen, die in dieser Zeit keine Metastasen zeigen, haben ähnliche Überlebensraten wie Patienten mit ER-positivem Brustkrebs [20].

Die neoadjuvante Chemotherapie hat sich in der Vergangenheit als eine wirksame Behandlung erwiesen. Die Therapieregimes umfassen Taxane, Anthrazycline und platinhaltige Schemata. Patientinnen, die mit einer neoadjuvanten Chemotherapie behandelt wurden und zum Zeitpunkt der Operation eine komplette Remission der Erkrankung zeigen, haben ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben sowie krankheitsfreies Überleben [28]. Patientinnen mit einem Residuum nach neoadjuvanter Therapie haben ein sechsmal erhöhtes Risiko von Fernmetastasen und ein zwölfmal erhöhtes Risiko zu versterben [57]. Zur Zeit ist die Chemotherapie die einzig zugelassene Therapie des TNBC.

Eine gezielte Target-Therapie wurde bisher weder durch die amerikanische FDA (Food and Drug Administration) noch die EMA (European Medicine Agency) zugelassen [55]. Viele Studien der letzten Jahre haben jedoch durch eine Subtypisierung des TNBC auf molekularer Ebene eine Reihe möglicher Targets für eine potenzielle gezielte Therapie gefunden und die Suche nach weiteren Targets steht noch immer im Mittelpunkt aktueller Grundlagenforschung. Die Priorität bei der Suche nach künftigen Angriffspunkten für eine gezielte Therapie sollte auch der Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen den jeweiligen Zielmolekülen und epidemiologischen, klinischen und damit prognostischen Eigenschaften der TNBC eingeräumt werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde daher eine Kombination von Markermolekülen aus TNBC-Gewebeproben mit ausgewählten Tumor- und Patientencharakteristika korreliert, worin auch die Neuheit dieser Studie besteht. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass einige der analysierten Signaltransduktionsmoleküle eine Korrelation zur Inzidenz von Patienten- und Tumormerkmalen zeigen und darüber hinaus mit verschiedenen Tumorrezidiven korrelieren. Ein Nachteil der vorgestellten Studie ist die kleine Anzahl der Patientenproben, die für die Analyse zur Verfügung standen. Daher können die Ergebnisse nur als vorläufig angesehen werden. Die ermittelten Daten zeigen jedoch bereits eindeutige Tendenzen auf, die sich durch die Analyse eines größeren Patientenkollektivs mit einer höheren Probenzahl statistisch vermutlich noch signifikant verbessern ließe. Weiterhin stimmen die Daten mit aktueller publizierter Literatur überein.

Die hier gezeigte Korrelation von HIF1 α mit dem histologischen Grading wurde bereits für Eierstockkrebs beschrieben [43], so dass dieser Faktor möglicherweise für die weitere prognostische Bewertung und klinische Behandlung eine Rolle spielen könnte. Andere Studien haben zeigen können, dass HIF1 α bei TNBC neben der Korrelation zu einem hohen Grading (G3) ebenfalls über eine Regulation der Tumorzellmigration und Tumorinvasion zu einem schlechten Gesamtüberleben und somit schlechter Prognose beiträgt [118]. In der vorliegenden Untersuchung konnte in TNBC-Tumorgewebe die Korrelation von HIF1 α mit einem postoperativen G2-Grading mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden ($p = 0,030$).

Weiterhin zeigten sich Zusammenhänge zwischen den Signalmolekülen und dem Gesamtüberleben von TNBC-Patientinnen. Beispielsweise bestand eine signifikante Korrelation zwischen der zytoplasmatischen HIF1 α -Anfärbung und dem Gesamtüberleben der Patientinnen ($p = 0,004$). Interessanterweise decken sich die hier gewonnenen Erkenntnisse ebenfalls mit aktueller Literatur. Neuere Veröffentlichungen wie beispielsweise die Arbeitsgruppe Jin et al. wiesen nach, dass eine Überexpression von HIF1 α mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist [42]. Allerdings war diese Überexpression vor allem bei TNBC-Patientinnen vorhanden, welche bereits eine Radiochemotherapie erhalten hatten [42]. In Anbetracht dieser Ergebnisse wäre eine weitere Unterteilung

unserer Patientinnen in die Subgruppen „prä“ und „post“ Radiochemotherapie vielleicht sinnvoll gewesen. Dennoch sind die Ergebnisse bezüglich HIF1 α dieser Arbeit kongruent zu aktuell publizierten Studien und prädestinieren HIF1 α damit als ein mögliches molekulares Target in der künftigen TNBC-Therapie.

Wir fanden jedoch keine Korrelationen der Tumormerkmale mit den Molekülen XBP1, MCL1, LRP6 und FOXP3, es war ebenfalls keine Beziehung zwischen den Molekülen und der TumorgroÙe, Fernmetastasen, Formations- und Tumorhistologie nachweisbar. Zusätzlich untersuchten wir die Kohärenz zwischen den verschiedenen Signalmolekülen und der Bildung von Rezidiven wie Lymphknotenrezidiv, Lokalrezidiv oder Fernmetastasenbildung. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression von β -Catenin und der Inzidenz von Rezidiv-Metastasierung. Frühere Veröffentlichungen zeigten bereits, dass β -Catenin eine definitive Rolle bei der Metastasenbildung durch Wechselwirkungen mit dem ECM1 (extrazelluläres Matrixprotein 1) spielt, was zu einer erhöhten Entwicklung und Stabilität von Krebszellen führt [101].

Darüber hinaus verstärkt die Anwesenheit von β -Catenin die Wirkung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und auch des uPA (Urokinase Plasminogen Aktivator), was ebenfalls zu einer Stabilisierung von Tumorzellen beiträgt [23]. Die Hemmung von β -Catenin scheint die Metastasenbildung negativ zu beeinflussen [56, 116]. β -Catenin spielt jedoch auch eine Rolle beim Wiederauftreten von Lymphknotenmetastasen [101]. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die Abfärbung von β -Catenin im Zytoplasma von TNBC-Präparaten signifikant mit einem Metastasen-Rezidiv korreliert ($p = 0,007$). Auch eine Zellkernanfärbung korrelierte signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen-Rezidiv ($p = 0,018$). Insgesamt deuten unsere Ergebnisse, ebenso wie andere neuere Studien, darauf hin, dass β -Catenin an der Fernmetastasierung von TNBC beteiligt zu sein scheint. Auch Dey et al. wiesen eine Hochregulation des Wnt- β -Catenin-Signalwegs in TNBC-Tumoren nach und konstatieren, dass dieser Signalweg maßgeblich an der Metastasierung beteiligt ist [17].

Darüber hinaus kann die Verbindung zwischen β -Catenin mit dem menopausalem Stadium der Patientin von klinischer Relevanz sein. Wie bereits

Wang et al. herausfanden, beeinflusst der Wnt-Signalweg die Pathogenese der postmenopausalen Osteoporose [11]. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar nur der Trend eines Zusammenhangs zwischen dem β -Catenin-Nachweis im Zytoplasma von TNBC-Präparaten und dem menopausalen Status der Patientinnen festgestellt werden, in Zusammenschau der Ergebnisse ist aber eine Verbindung zwischen postmenopausalem Status und einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs denkbar und dies könnte mit der Überexpression von β -Catenin in TNBC zusammenhängen. Es ist wünschenswert, dass künftige Studien diese Signaltransduktionskaskade als potentiell Target für die Therapie des TNBC in Betracht ziehen, denn der Wnt/ β -Catenin-Weg trägt ebenfalls zur Radioresistenz von TNBC-Zellen bei. Niclosamid, ein potenter Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, könnte in der Lage sein, die Radioresistenz aufzuheben und somit die TNBC-Therapie verbessern [71].

Eine weitere signifikante Korrelation konnte hier zwischen der Anfärbung des Moleküls NOTCH1 im Zytoplasma und Zellkern von TNBC-Präparaten und einer positiven Lymphknoteninfiltration gezeigt werden. Wnt/ β -Catenin und Notch1 sind normalerweise verantwortlich für die Milchdrüsenmorphogenese während der embryonalen Entwicklung. Es wurde aber schon häufiger beobachtet, dass diese beiden Signaltransduktionswege auch während der Tumorgenese hochreguliert werden, wodurch ggf. eine weitere mögliche Behandlungsoption durch eine Blockade dieser Signalwege entsteht [81]. Die Rolle von Notch1 in Lymphknoten befallenden, infiltrierenden ductalen Karzinomen wurde bereits in der Literatur beschrieben, weiterhin wird die Beteiligung von Notch1 im epithelial-mesenchymalen-Metastasierungsweg [54] vermutet. Darüber hinaus zeigten Patienten mit hoher Expression von Notch1 ein schlechteres Gesamtüberleben sowie ein kürzeres krankheitsfreies Überleben (DFS) [52]. Das in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen NOTCH1 und schlechtem Gesamtüberleben gezeigt werden konnte, ist vermutlich im Wesentlichen auf das sehr kleine Patientenkollektiv zurückzuführen. Vor Kurzem wurde berichtet, dass die microRNA miR9 in Zusammenhang mit Notch1 steht und an der Suppression von Tumorwachstum beteiligt zu sein scheint [56]. Darüber hinaus konnte die ATPase a2V-ATPase identifiziert werden, welche für die Etablierung des Notch1-Rezeptors notwendig ist. Ein Mangel dieser ATPase führte zu einer Unterbrechung der Notch-Signalgebung und somit der

Entwicklung der Brustdrüse. Auch dies könnte einen neuen Therapieansatz in der Brustkrebsbehandlung darstellen [116]. Die auffallende Assoziation von Notch1 und dem Vorhandensein von Fernmetastasen, die sich in dieser Arbeit fand, ist schon früher beschrieben worden [23] und scheint via Angiogenese stattzufinden. Zusammenfassend ist auch NOTCH1 als ein potentielles Target in der künftigen TNBC-Therapie zu werten.

Eher neu ist die Kohärenz von XBP1 und Lymphknoten-Rezidiven sowie FOXP3 und dem Auftreten von lokalen Rezidiven. Es konnte aber interessanterweise bereits gezeigt werden, dass die XBP1-Expression in TNBC eine Korrelation zu HIF1 α hat und somit ebenfalls mit einer schlechten Prognose verbunden ist [14]. Da in dieser Arbeit nur ein Trend eines Zusammenhangs zwischen Lymphknoten-Rezidiven und XBP1 Anfärbung gezeigt werden konnte, sind vertiefende Studien hierzu wünschenswert. Chen et al. [14] sprechen XBP1 eine Schlüsselfunktion in TNBC zu. XBP1 bietet also ebenfalls ein künftigen Angriffspunkt für eine potentielle Targettherapie des TNBC. Jiang et al. [41] gehen ebenfalls von einer zum jetzigen Forschungsstand deutlich unterbewerteten Rolle von XBP1 aus, was die Bedeutung der vorliegenden Untersuchung zu dieser Signaltransduktionskaskade unterstreicht.

Die FOXP3-Färbung des Tumorzentrums ergab eine signifikante Korrelation zum Gesamtüberleben von TNBC-Patientinnen ($p = 0,015$), wohingegen für die tumorinfiltrierenden FOXP3-positiven Lymphozyten und die peritumorale FOXP3-positiven Lymphozyten keine signifikante Korrelation in Bezug auf das Gesamtüberleben gezeigt werden konnte. FOXP3 ist ein Marker für CD8 $^{+}$ -regulatorische T-Lymphozyten. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, wird die Rolle des FOXP3 kontrovers diskutiert. Überwiegend ist man aber der Meinung, dass der Nachweis FOXP3-positiver Lymphozyten mit einer schlechten Prognose einhergeht [61]. Ebenfalls spricht eine Zytoplasmaanfärbung der TNBC-Zellen für eine schlechte Prognose [19]. Hier konnte nun das Vorhandensein zentrotumoraler FOXP3-positiver Lymphozyten mit einem schlechten Gesamtüberleben in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus zeigte sich zumindest der Trend eines Zusammenhangs zwischen FOXP3 und einem Lokalrezidiv ($p=0,083$). Wie bereits in anderen Studien aufgezeigt [19], scheint FOXP3 ein wichtiger prognostischer Marker für den TNBC-Verlauf

zu sein. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich eine FOXP3-Expression vor und nach einer Chemotherapie verhält, um den prognostischen Wert weiter zu spezifizieren. Minour et al. beschreiben tumorinfiltrierende FOXP3-positive Lymphozyten bei residualen TNBC nach Chemotherapie [70], was ebenfalls ein Argument für weitergehene Studien zum Verhalten FOXP3-positiver Lymphozyten vor und nach Chemotherapie ist. Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit kongruent zu aktueller Literatur, dass auch FOXP3 ein potentielles Target in der zukünftigen molekularen Therapie des TNBC ist.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Triple-negativer Brustkrebs (TNBC) ist eine sehr aggressive Brustkrebsform mit hohen Proliferations- und Metastasierungsraten. Durch die allenfalls nur sehr geringe Expression des Progesteron-, Östrogen- und Her2-Rezeptors ist der TNBC schlecht behandelbar, und es fehlen wirksame zielgerichtete Therapien. Daher war es das Anliegen dieser Arbeit, Zusammenhänge zwischen einigen intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen und dem Gesamtüberleben, weiteren prognostischen Parametern und der Rezidivneigung zu untersuchen.

Methodik: Es standen 31 paraffineingebettete Gewebeschnitte von TNBC-Patientinnen zur Verfügung, die immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern auf die Anfärbbarkeit der Signalmoleküle HIF1 α , β -Catenin, FOXP3, Notch1, MCL1, LRP6 und XBP1 untersucht wurden. Die Farbintensität wurde mit dem immunreaktiven Score (IRS) beurteilt und mit statistischen Methoden sowie Kaplan-Meier-Kurven zu den klinischen und tumorspezifischen Parametern in Beziehung gesetzt.

Ergebnisse: Es bestanden statistisch signifikante Korrelationen zwischen dem Gesamtüberleben der TNBC-Patientinnen und 1. der Intensität der FOXP3-Färbung des Tumorzentrums ($p = 0,015$) sowie 2. der zytoplasmatischen HIF1 α -Färbung ($p = 0,004$). Hinsichtlich der Tumoreigenschaften zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der HIF1 α -Anfärbbarkeit im Zytoplasma und dem Tumorgrading ($p = 0,030$) sowie zwischen der zytoplasmatischen Notch1-Färbung und dem Lymphknotenstatus ($p = 0,049$). Weitere grenzwertig signifikante Korrelationen lagen für die nukleäre Notch1-Färbung und den Lymphknotenstatus ($p = 0,0463$) sowie die zytoplasmatische β -Catenin-Anfärbbarkeit und den menopausalen Status ($p = 0,068$) vor. In Bezug auf verschiedene Rezidivformen korrelierte die Kernfärbung des β -Catenin mit einem Wiederauftreten von Lymphknotenmetastasen ($p = 0,018$), während die zytoplasmatische Färbung mit dem Auftreten von Metastasenrezidiven verbunden war ($p = 0,007$). Die nukleäre β -Catenin-Färbung korrelierte ebenfalls, allerdings nur grenzwertig, mit dem Auftreten von Fernmetastasen ($p = 0,100$). Für drei weitere Signaltransduktionsmoleküle wurden ebenfalls grenzwertig

signifikante Korrelationen festgestellt: XBP-1 mit einem Lymphknotenrezidiv ($p = 0,059$), die nukleäre Notch1-Färbung mit der Fernmetastasenbildung ($p = 0,082$) und die FOXP3-Kernfärbung mit dem Auftreten von Lokalrezidiven ($p = 0,083$).

Schlussfolgerung: Ein Großteil der hier ausgewählten Signaltransduktionskaskaden scheinen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit als Ziel für neue zielgerichtete Therapien des TNBC zu eignen. Die Ergebnisse sollten zu weiterführenden Untersuchungen ermutigen, um die Schlüsselfunktionen der hier behandelten Signaltransduktionsmoleküle weiter aufzuklären und herauszufinden, wie und mit welchen Substanzen sie sich am besten blockieren lassen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Adorno-Cruz V, Kibria G, Liu X, Doherty M, Junk DJ, Guan D et al. 2015. Cancer stem cells: targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Cancer Res*, 75, 924-9.
- 2 Ago 2019. Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome. Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e. V., München, W. Zuckschwerdt Verlag.
- 3 Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL et al. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72, 1117-30.
- 4 Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V et al. 2011. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*, 24, 157-67.
- 5 Baker NE 1987. Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *Embo j*, 6, 1765-73.
- 6 Bloom HJ, Richardson WW 1957. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, 11, 359-77.
- 7 Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H 2012. Pathologie, München, Urban & Fischer in Elsevier.
- 8 Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C 2005. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*, 23, 7350-60.
- 9 Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR et al. 1996. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res*, 56, 941-3.
- 10 Campbell KJ, Dhayade S, Ferrari N, Sims AH, Johnson E, Mason SM et al. 2018. MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell Death Dis*, 9, 19.
- 11 Cao YW, Li WQ, Wan GX, Li YX, Du XM, Li YC et al. 2014. Correlation and prognostic value of SIRT1 and Notch1 signaling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 33, 97.
- 12 Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L 2010. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol*, 7, 683-92.
- 13 Cha B, Geng X, Mahamud MR, Fu J, Mukherjee A, Kim Y et al. 2016. Mechanotransduction activates canonical Wnt/beta-catenin signaling to

- promote lymphatic vascular patterning and the development of lymphatic and lymphovenous valves. *Genes Dev*, 30, 1454-69.
- 14 Chen X, Iliopoulos D, Zhang Q, Tang Q, Greenblatt MB, Hatziapostolou M et al. 2014. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1alpha pathway. *Nature*, 508, 103-107.
- 15 Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M et al. 2015. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*, 26, 1533-46.
- 16 Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, Orlando L, Viale G, Renne G et al. 2002. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol*, 13, 273-9.
- 17 De P, Carlson JH, Wu H, Marcus A, Leyland-Jones B, Dey N 2016. Wnt-beta-catenin pathway signals metastasis-associated tumor cell phenotypes in triple negative breast cancers. *Oncotarget*, 7, 43124-43149.
- 18 Decker T, Hungermann D, Bocker W 2009. [Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer: update 2009]. *Pathologe*, 30, 49-55.
- 19 Demir L, Yigit S, Ellidokuz H, Erten C, Somali I, Kucukzeybek Y et al. 2013. Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs. *Clin Exp Metastasis*, 30, 1047-62.
- 20 Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA et al. 2007. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 13, 4429-34.
- 21 Dibaba DT, Braithwaite D, Akinyemiju T 2018. Metabolic Syndrome and the Risk of Breast Cancer and Subtypes by Race, Menopause and BMI. *Cancers (Basel)*, 10.
- 22 Ding YC, Steele L, Warden C, Wilczynski S, Mortimer J, Yuan Y et al. 2019. Molecular subtypes of triple-negative breast cancer in women of different race and ethnicity. *Oncotarget*, 10, 198-208.
- 23 Dong Y, Zhang T, Li J, Deng H, Song Y, Zhai D et al. 2014. Oridonin inhibits tumor growth and metastasis through anti-angiogenesis by blocking the Notch signaling. *PLoS One*, 9, e113830.
- 24 Dowsett M, Nielsen TO, A'hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J et al. 2011. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*, 103, 1656-64.
- 25 Early breast cancer trialists' collaborative group (Ebcctg) 1990. *Treatment of early breast cancer: worldwide evidence 1985– 1990*, vol 1, Oxford, Oxford University Press.
- 26 Edge SB, Hortobagyi GN, Giuliano AE 2019. New and important changes in breast cancer TNM: incorporation of biologic factors into staging. *Expert Rev Anticancer Ther*, 1-10.

- 27 Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett JM 2016. EMT in Breast Carcinoma-A Review. *J Clin Med*, 5.
- 28 Fisher CS, Ma CX, Gillanders WE, Aft RL, Eberlein TJ, Gao F et al. 2012. Neoadjuvant chemotherapy is associated with improved survival compared with adjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer only after complete pathologic response. *Ann Surg Oncol*, 19, 253-8.
- 29 Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM et al. 2000. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 966-78.
- 30 Focke CM, Van Diest PJ, Decker T 2016. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. *Breast Cancer Res Treat*, 159, 257-63.
- 31 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4, 330-6.
- 32 Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS 2010. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 363, 1938-48.
- 33 Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N et al. 2003. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1482-5.
- 34 Gnant M, Harbeck N, Thomssen C 2011. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)*, 6, 136-141.
- 35 Goldhirsch A 2013. Personalized adjuvant therapies: lessons from the past: the opening address by the St. Gallen 2013 award recipient. *Breast*, 22 Suppl 2, S3-7.
- 36 Grann VR, Patel PR, Jacobson JS, Warner E, Heitjan DF, Ashby-Thompson M et al. 2011. Comparative effectiveness of screening and prevention strategies among BRCA1/2-affected mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat*, 125, 837-47.
- 37 Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S 2010. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*, 6, 195-7.
- 38 Hanna WM, Parra-Herran C, Lu FI, Slodkowska E, Rakovitch E, Nofech-Mozes S 2019. Ductal carcinoma in situ of the breast: an update for the pathologist in the era of individualized risk assessment and tailored therapies. *Mod Pathol*.
- 39 Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS et al. 2009. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*, 69, 4116-24.
- 40 Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C et al. 2009. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-

- positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol*, 27, 1168-76.
- 41 Jiang D, Turner B, Song J, Li R, Diehn M, Le QT et al. 2017. Comprehensive Analysis of the Unfolded Protein Response in Breast Cancer Subtypes. *JCO Precis Oncol*, 2017.
- 42 Jin MS, Lee H, Park IA, Chung YR, Im SA, Lee KH et al. 2016. Overexpression of HIF1alpha and CAXI predicts poor outcome in early-stage triple negative breast cancer. *Virchows Arch*, 469, 183-90.
- 43 Jin Y, Wang H, Liang X, Ma J, Wang Y 2014. Pathological and prognostic significance of hypoxia-inducible factor 1alpha expression in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*, 35, 8149-59.
- 44 Katz H, Alsharedi M 2017. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol*, 35, 13.
- 45 Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH et al. 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*, 28, 3271-7.
- 46 Kesson EM, Allardice GM, George WD, Burns HJ, Morrison DS 2012. Effects of multidisciplinary team working on breast cancer survival: retrospective, comparative, interventional cohort study of 13 722 women. *Bmj*, 344, e2718.
- 47 Kim MH, Koo JS, Lee S 2013. FOXP3 expression is related to high Ki-67 index and poor prognosis in lymph node-positive breast cancer patients. *Oncology*, 85, 128-36.
- 48 King TD, Suto MJ, Li Y 2012. The Wnt/beta-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *J Cell Biochem*, 113, 13-8.
- 49 Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, Mcguire WL 1977. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res*, 37, 4669-71.
- 50 Kong P, Chen L, Yu M, Tao J, Liu J, Wang Y et al. 2018. miR-3178 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting Notch1 in triple-negative breast cancer. *Cell Death Dis*, 9, 1059.
- 51 Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J et al. 2004. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 266-71.
- 52 Kumar KJ, Vani MG, Chueh PJ, Mau JL, Wang SY 2015. Antrodin C inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via suppression of Smad2/3 and beta-catenin signaling pathways. *PLoS One*, 10, e0117111.
- 53 Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan CM, Cochran C, Gumbs C et al. 1996. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet*, 13, 238-40.

- 54 Lee KM, Nam K, Oh S, Lim J, Kim RK, Shim D et al. 2015. ECM1 regulates tumor metastasis and CSC-like property through stabilization of beta-catenin. *Oncogene*, 34, 6055-65.
- 55 Lehmann BD, Pietenpol JA, Tan AR 2015. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, e31-9.
- 56 Li X, Liang W, Liu J, Lin C, Wu S, Song L et al. 2014. Transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1 promotes proliferation and tumorigenicity in human breast cancer via activation of beta-catenin signaling. *Breast Cancer Res*, 16, 465.
- 57 Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA et al. 2008. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1275-81.
- 58 Lindemann K, Resau J, Nahrig J, Kort E, Leeser B, Annecke K et al. 2007. Differential expression of c-Met, its ligand HGF/SF and HER2/neu in DCIS and adjacent normal breast tissue. *Histopathology*, 51, 54-62.
- 59 Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Elmberger G, Skoog L, Lehtio J et al. 2009. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 20, 1639-46.
- 60 Liou HC, Boothby MR, Finn PW, Davidon R, Nabavi N, Zeleznik-Le NJ et al. 1990. A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science*, 247, 1581-4.
- 61 Lopes LF, Guembarovski RL, Guembarovski AL, Kishima MO, Campos CZ, Oda JM et al. 2014. FOXP3 transcription factor: a candidate marker for susceptibility and prognosis in triple negative breast cancer. *Biomed Res Int*, 2014, 341654.
- 62 Ma J, Lu W, Chen D, Xu B, Li Y 2017. Role of Wnt Co-Receptor LRP6 in Triple Negative Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *J Cell Biochem*, 118, 2968-2976.
- 63 Mahamodhossen YA, Liu W, Rong-Rong Z 2013. Triple-negative breast cancer: new perspectives for novel therapies. *Med Oncol*, 30, 653.
- 64 Martin AM, Blackwood MA, Antin-Ozerkis D, Shih HA, Calzone K, Colligon TA et al. 2001. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast-ovarian families from a breast cancer risk evaluation clinic. *J Clin Oncol*, 19, 2247-53.
- 65 Mehta RS 2008. Dose-dense and/or metronomic schedules of specific chemotherapies consolidate the chemosensitivity of triple-negative breast cancer: a step toward reversing triple-negative paradox. *J Clin Oncol*, 26, 3286-8; author reply 3288.
- 66 Mejdahl MK, Wohlfahrt J, Holm M, Balslev E, Knoop AS, Tjonneland A et al. 2019. Breast cancer mortality in synchronous bilateral breast cancer patients. *Br J Cancer*.

- 67 Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Menard S et al. 2009. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*, 27, 1746-52.
- 68 Metelkova A, Skalova A, Finek J [Breast Cancer in Young Women - Correlation of Clinical Histomorphological, and Molecular-genetic Features of Breast Carcinoma in Women Younger than 35 Years of Age]. *Klin Onkol*, 30, 202-209.
- 69 Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S et al. 2014. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*, 2, 361-70.
- 70 Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Hirakawa H, Takahashi Y, Nakagawa S et al. 2015. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res*, 17, 124.
- 71 Mohammadi-Yeganeh S, Mansouri A, Paryan M 2015. Targeting of miR9/NOTCH1 interaction reduces metastatic behavior in triple-negative breast cancer. *Chem Biol Drug Des*, 86, 1185-91.
- 72 Montagner M, Enzo E, Forcato M, Zanconato F, Parenti A, Rampazzo E et al. 2012. SHARP1 suppresses breast cancer metastasis by promoting degradation of hypoxia-inducible factors. *Nature*, 487, 380-4.
- 73 Nattenmuller CJ, Kriegsmann M, Sookthai D, Fortner RT, Steffen A, Walter B et al. 2018. Obesity as risk factor for subtypes of breast cancer: results from a prospective cohort study. *BMC Cancer*, 18, 616.
- 74 Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD 2002. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *Jama*, 288, 872-81.
- 75 Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z et al. 2004. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10, 5367-74.
- 76 Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A et al. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253, 665-9.
- 77 Noll S, Schaub-Kuhnen S 2000. *Praxis der Immunhistochemie*, München, Urban & Fischer.
- 78 O'shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C et al. 2011. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 364, 205-14.
- 79 Oda N, Shimazu K, Naoi Y, Morimoto K, Shimomura A, Shimoda M et al. 2012. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 136, 107-16.
- 80 Ohara M, Yamaguchi Y, Matsuura K, Murakami S, Arihiro K, Okada M 2009. Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and

- progression in primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 58, 441-7.
- 81 Pamarthy S, Mao L, Katara GK, Fleetwood S, Kulshreshta A, Gilman-Sachs A et al. 2016. The V-ATPase $\alpha 2$ isoform controls mammary gland development through Notch and TGF- β signaling. *Cell Death Dis*, 7, e2443.
- 82 Papadimitriou M, Mountzios G, Papadimitriou CA 2018. The role of PARP inhibition in triple-negative breast cancer: Unraveling the wide spectrum of synthetic lethality. *Cancer Treat Rev*, 67, 34-44.
- 83 Paul C, Skegg DC, Spears GF 1990. Oral contraceptives and risk of breast cancer. *Int J Cancer*, 46, 366-73.
- 84 Peddi PF, Ellis MJ, Ma C 2012. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *Int J Breast Cancer*, 2012, 217185.
- 85 Perou CM 2011. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*, 16 Suppl 1, 61-70.
- 86 Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-52.
- 87 Podo F, Buydens LM, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS et al. 2010. Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol*, 4, 209-29.
- 88 Prado-Vazquez G, Gamez-Pozo A, Trilla-Fuertes L, Arevalillo JM, Zapater-Moros A, Ferrer-Gomez M et al. 2019. A novel approach to triple-negative breast cancer molecular classification reveals a luminal immune-positive subgroup with good prognoses. *Sci Rep*, 9, 1538.
- 89 Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L et al. 2013. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*, 142, 237-55.
- 90 Qiu M, Peng Q, Jiang I, Carroll C, Han G, Rymer I et al. 2013. Specific inhibition of Notch1 signaling enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in triple negative breast cancer through reduction of cancer stem cells. *Cancer Lett*, 328, 261-70.
- 91 Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO 2008. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*, 26, 2568-81.
- 92 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]. *Pathologe*, 8, 138-40.
- 93 Robert koch-Institut 2017. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 11. Ausgabe, Berlin, Robert-Koch-Institut.

- 94 Roldan-Villalobos R, Artacho-Perula E, Ruiz-Moruno FJ 1996. Grading and prognosis of infiltrating ductal breast carcinoma by mean nuclear volume estimates. *Anal Quant Cytol Histol*, 18, 158-66.
- 95 Saad ED, Squifflet P, Burzykowski T, Quinaux E, Delaloge S, Mavroudis D et al. 2019. Disease-free survival as a surrogate for overall survival in patients with HER2-positive, early breast cancer in trials of adjuvant trastuzumab for up to 1 year: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*.
- 96 Savino M, Garrubba M, Parrella P, Baorda F, Copetti M, Murgo R et al. 2007. Development of real-time quantitative reverse transcription-PCR for Her2 detection in peripheral blood from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta*, 384, 52-6.
- 97 Sawyers CL 2008. The cancer biomarker problem. *Nature*, 452, 548-52.
- 98 Schuetz F, Diel IJ, Poeschel M, Von Holst T, Solomayer EF, Lange S et al. 2007. Reduced incidence of distant metastases and lower mortality in 1072 patients with breast cancer with a history of hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol*, 196, 342.e1-9.
- 99 Schutz FA, Jardim DL, Je Y, Choueiri TK 2011. Haematologic toxicities associated with the addition of bevacizumab in cancer patients. *Eur J Cancer*, 47, 1161-74.
- 100 Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, Ingels JF, Jensen LC, Smith KD et al. 2012. Hypoxia-inducible factor 1alpha promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 14, R6.
- 101 Sehgal P, Kumar N, Praveen Kumar VR, Patil S, Bhattacharya A, Vijaya Kumar M et al. 2013. Regulation of protumorigenic pathways by insulin like growth factor binding protein2 and its association along with beta-catenin in breast cancer lymph node metastasis. *Mol Cancer*, 12, 63.
- 102 Shinde SS, Forman MR, Kuerer HM, Yan K, Peintinger F, Hunt KK et al. 2010. Higher parity and shorter breastfeeding duration: association with triple-negative phenotype of breast cancer. *Cancer*, 116, 4933-43.
- 103 Sirohi B, Arnedos M, Popat S, Ashley S, Nerurkar A, Walsh G et al. 2008. Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 19, 1847-52.
- 104 Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10869-74.
- 105 Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A et al. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8418-23.
- 106 Steinhart Z, Pavlovic Z, Chandrashekhar M, Hart T, Wang X, Zhang X et al. 2017. Genome-wide CRISPR screens reveal a Wnt-FZD5 signaling circuit as a druggable vulnerability of RNF43-mutant pancreatic tumors. *Nat Med*, 23, 60-68.

- 107 Takenaka M, Seki N, Toh U, Hattori S, Kawahara A, Yamaguchi T et al. 2013. FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis. *Mol Clin Oncol*, 1, 625-632.
- 108 Tan AR, Swain SM 2008. Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Cancer J*, 14, 343-51.
- 109 Thomas LW, Lam C, Edwards SW 2010. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett*, 584, 2981-9.
- 110 Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ et al. 2009. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control*, 20, 1071-82.
- 111 Trocchi P, Ursin G, Kuss O, Ruschke K, Schmidt-Pokrzywniak A, Holzhausen HJ et al. 2012. Mammographic density and inter-observer variability of pathologic evaluation of core biopsies among women with mammographic abnormalities. *BMC Cancer*, 12, 554.
- 112 Von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H et al. 2012. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 366, 299-309.
- 113 Von Minckwitz G, Schmitt WD, Loibl S, Muller BM, Blohmer JU, Sinn BV et al. 2013. Ki67 measured after neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Clin Cancer Res*, 19, 4521-31.
- 114 Wang X, Qi Y, Kong X, Zhai J, Li Y, Song Y et al. 2019. Immunological therapy: A novel thriving area for triple-negative breast cancer treatment. *Cancer Lett*, 442, 409-428.
- 115 Wang X, Shi Y, Huang D, Guan X 2018. Emerging therapeutic modalities of PARP inhibitors in breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 68, 62-68.
- 116 Wang Y, Bu F, Royer C, Serres S, Larkin JR, Soto MS et al. 2014. ASPP2 controls epithelial plasticity and inhibits metastasis through beta-catenin-dependent regulation of ZEB1. *Nat Cell Biol*, 16, 1092-104.
- 117 Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, North TE, Goessling W, Feng Z et al. 2010. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*, 327, 1650-3.
- 118 Wang Y, Zhang G, Han J 2019. HIF1A-AS2 predicts poor prognosis and regulates cell migration and invasion in triple-negative breast cancer. *J Cell Biochem*.
- 119 Wang ZY, Hu M, Dai MH, Xiong J, Zhang S, Wu HJ et al. 2018. Upregulation of the long non-coding RNA AFAP1-AS1 affects the proliferation, invasion and survival of tongue squamous cell carcinoma via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cancer*, 17, 3.
- 120 Weigelt B, Mackay A, A'hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M et al. 2010. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*, 11, 339-49.
- 121 Who. 2015. Available: www.who.int.
- 122 Wittekind C 2017. *Klassifikation maligner Tumoren*. 8. Auflage, Weinheim, Wiley-VCH.

- 123 Wwww.Cancer.Gov. 2015. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Available: www.cancer.gov 2015].
- 124 Xue G, Romano E, Massi D, Mandala M 2016. Wnt/beta-catenin signaling in melanoma: Preclinical rationale and novel therapeutic insights. *Cancer Treat Rev*, 49, 1-12.
- 125 Yang L, Perez AA, Fujie S, Warden C, Li J, Wang Y et al. 2014. Wnt modulates MCL1 to control cell survival in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 124.
- 126 Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, Guidos CJ 2010. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol*, 28, 343-65.
- 127 Zhang T, Li Q, Xu B, Zhang P, Yuan P, Ma F et al. 2014. [Breast cancer brain metastases: clinical and prognostic characteristics of different biological subtypes]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 36, 697-702.
- 128 Zhu H, Bhaijee F, Ishaq N, Pepper DJ, Backus K, Brown AS et al. 2013. Correlation of Notch1, pAKT and nuclear NF-kappaB expression in triple negative breast cancer. *Am J Cancer Res*, 3, 230-9.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
APC	Adenomatous polyposis coli
ASCO	American society of clinical oncology
BCL	B-cell lymphoma
Ca	Karzinom
CD	Cluster of differentiation
CK	Zytokeratin
CLIS	Carcinoma lobulare in situ
CT	Tumorzentrum-Lymphozyten
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DFS	Disease free survival
Dkk	Dickkopf
EBCTCG	Early breast cancer trialists' collaborative group
ECM	extrazelluläres Matrixprotein
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMA	European medicine agency
ER	Östrogen-Rezeptor auch: Endoplasmatisches Retikulum
FDA	Food and drug administration

FOXP3	Forkhead-Box-P3
HDL	High density-Lipoprotein
Her	Human epidermal growth factor receptor
HIF	Hypoxia-inducing factor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IRS	Immune Reactive Score
kDa	Kilodalton
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LN	Lobuläre Neoplasie
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MCL	Myeloid cell leukemia
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MVP	Major vault protein
NBF	Neutral buffered formalin
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
PARP	poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate-Borate-Saline
PD-L1	Programmed death ligand 1
PR	Progesteron-Rezeptor
pTNM	Pathologisch bestimmte Tumorstadien
TLS	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen
Treg	Regulatorische T-Zellen

Tum	Tumorzellen
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XBP	X-box-binding-protein

7.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2013/2014 [93]	2
Abbildung 2: Prinzip der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) [77].....	29
Abbildung 3: β -Catenin-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe	37
Abbildung 4: FOXP3-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe	37
Abbildung 5: HIF1 α Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe.....	37
Abbildung 6: LRP6- Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe	38
Abbildung 7: MCL1-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe.....	38
Abbildung 8: NOTCH1- Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe	38
Abbildung 9: XBP1-Anfärbung in TNBC-Tumorgewebe	39
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der FOX-P3-Anfärbung des Tumorzentrums (CT) – Log-Rank-Test: signifikant ($p = 0,015$)	41
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der FOX-P3-Anfärbung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TLS) – Log-Rank-Test: nicht signifikant.....	41

- Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der FOX-P3-Anfärbung de Tumors (Tum) – Log-Rank-Test: nicht signifikant.....42
- Abbildung 13: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der β -Catenin-Färbung. Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: nicht signifikant Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant.....43
- Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der HIF1 α -Färbung. Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: signifikant ($p = 0,004$) Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant.....44
- Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der MCL1-Färbung. Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: nicht signifikant Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant45
- Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der Notch1-Färbung. Oben: Anfärbung des Zytoplasmas. Log-Rank-Test: nicht signifikant Unten: Anfärbung des Zellkerns. Log-Rank-Test: nicht signifikant46
- Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve zur Korrelation des Gesamtüberlebens (OS) mit der XBP1-Färbung. Log-Rank-Test: nicht signifikant.....47
- Abbildung 18: Anfärbbarkeit von HIF1 α im Zytoplasma in Abhängigkeit vom Tumorgrading – Kruskal-Wallis-Test: signifikant ($p = 0,30$)48
- Abbildung 19: Anfärbbarkeit von β -Catenin im Zytoplasma in Abhängigkeit vom menopausalen Status. Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,068$).....49
- Abbildung 20: Anfärbbarkeit von Notch1 in Abhängigkeit vom Lymphknoten-Status. Oben: zytoplasmatisch; Kruskal-Wallis-Test: signifikant ($p = 0,049$) Unten: nukleär; Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,063$)..50

Abbildung 21: Anfärbarkeit von β -Catenin im Zellkern bei Lymphknotenmetastasen. Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,018$).....	52
Abbildung 22: Anfärbarkeit von β -Catenin im Zytoplasma bei Fernmetastasen. Kruskal-Wallis-Test: signifikant ($p = 0,007$)	52
Abbildung 23: Anfärbarkeit von β -Catenin im Zellkern bei Fernmetastasen. Kruskal-Wallis-Test: grenzwertig signifikant ($p = 0,1$)	53

7.3 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen zum Mammakarzinom für Deutschland 2013/2014 [93].....	3
Tabelle 2: Klassifikation der Tumorstadien nach den Kriterien der UICC [122]	7
Tabelle 3: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (modifiziert nach Coates et al. 2015 [15])	9
Tabelle 4: Verwendete Geräte.....	22
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	25
Tabelle 6: Basisdaten der TNBC-Patientinnen ($n = 31$)	35
Tabelle 7: Gesamtüberleben und Färbungsintensität (statistisch signifikante Ergebnisse sind grau unterlegt).....	40
Tabelle 8: Korrelationen der Anfärbarkeit der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle mit verschiedenen Tumoreigenschaften. Kruskal-Wallis-Test. Fett: statistisch signifikante p-Werte ($p \leq 0,05$); kursiv: grenzwertig signifikante Werte ($p \geq 0,05$ bis $p \leq 0,1$).	48

Tabelle 9: Korrelationen der Anfärbarkeit der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle mit verschiedenen Rezidiven (Tumor, Lymphknoten, Metastasen). Kruskal-Wallis-Test. Fett: statistisch signifikante p-Werte ($p \leq 0,05$); kursiv: grenzwertig signifikante Werte ($p \geq 0,05$ bis $p \leq 0,1$).....51

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuallererst bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke. Mit einem solchen Mentor, der stets alles überblickt und immer ein konstruktives Feedback gibt, macht es tatsächlich Spass eine Dissertation zu verfassen. Ein besseres und großzügigeres Oberhaupt kann sich eine universitäre Laboreinheit wirklich nicht wünschen.

Herzlich bedanke ich mich bei meinem medizinischen Betreuer Herrn PD Dr. Dr. med. Ulrich Andergassen für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit sowie die allzeitliche positive Art und sein überdurchschnittliches Engagement für seine gesamte Arbeitsgruppe. Besser hätte die Stimmung nicht sein können.

Natürlich gilt ganz besonderer Dank auch meiner naturwissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Alexandra Kölbl. Die gute Seele des Labors. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit noch heute nicht zustande gekommen. Liebe Alex, vielen Dank für deine Unterstützung.

Nicht vergessen darf man das ganze Team der Tumorphistologie. Auch hier konnte die Atmosphäre nicht besser sein. Ganz besonders möchte ich Frau Christina Kuhn, Frau Simone Hoffmann und Herrn Christoph Freier für ihre bedingungslose Hilfsbereitschaft und stets konstruktiven Ideen danken.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, die in den sechs Jahren meines Medizinstudiums viel Liebe und Nerven in mich investiert haben und immer für mich da waren. Danke Mami und Papi, alles was ich heute bin, verdanke ich Euch!

Zuletzt geht der größte Dank an meine Freundin, Theresa Vilsmaier, die mich in den letzten 6 Jahren unseres Lebens, in allen Dingen unnachgiebig liebevoll überredet, motiviert, verstanden und begleitet hat. Danke Theresa für deine bedingungslose Unterstützung!

Non quia difficilia sunt non audemus, sed quia non audemus difficilia sunt

Publikationen dieser Arbeit

Do signal transduction cascades influence survival in triple-negative breast cancer? – a preliminary study

Jan-Niclas Mumm¹, Alexandra C. Kölbl¹, Udo Jeschke¹, Ulrich Andergassen¹¹ Department of Obstetrics and Gynaecology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Maistrasse 11, 80337 Munich, Germany

ONCO TARGETS AND THERAPY (2016;9:3163-3169;doi:10.2147/OTT.S101677)

Triple-negative breast cancer: new therapeutic options via signalling transduction cascades

Alexandra C. Kölbl, **Jan-Niclas Mumm**¹, Udo Jeschke¹, Ulrich Andergassen¹¹ Department of Obstetrics and Gynaecology, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Maistrasse 11, 80337 Munich, Germany

ONCOLOGY RESEARCH (2017May;37(5):3055-3060;doi: 10.3892/or2017.5512)

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Jan-Niclas Mumm, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Identifikation molekularer Targets für die Therapie
des triple-negativen Mammakarzinoms

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 26.05.2020

Ort, Datum

Jan-Niclas Mumm

Jan-Niclas Mumm