

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Direktor: Prof. Dr. med. Nicolai Maass

Im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

An der Christian-Albrechts-Universität

**In situ Lokalisation von Tumorzellen mit Zeichen der
epithelial-mesenchymalen Transition und prognostische
Bedeutung von intratumoralen Lymphozyten beim
invasiv-duktalem Mammakarzinom**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Friederike Irene Hübner

aus Northeim

Kiel, 2017

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Ibrahim Alkatout, M.A., Klinik für
Gynäkologie und Geburtshilfe
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Ole Broch, Klinik für
Anästhesie und operative Intensivmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2018

Zum Druck genehmigt Kiel, den 31.03.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Legende

1 Einleitung

1.1	Epidemiologische und medizinische Bedeutung des Mamma- karzinoms	1
1.2	Histologie des Mammakarzinoms	2
1.3	Aspekte der epithelialen-mesenchymalen Transition	2
1.4	Tumorerfiltrierende lymphatische Zellen als Einflussfaktor im Tumorgewebe	5
1.5	Fragestellung	8

2 Material und Methoden

2.1	Patientenkollektiv	9
2.2	Gewebematerial	10
2.3	Herstellung von Tissue Micro Arrays	11
2.4	Immunhistochemie	
2.4.1	Antikörper	12
2.4.2	Manuell durchgeführte immunhistochemische Färbungen	12
2.4.3	Automatische Färbungen	16
2.4.4	Kontrollen der Färbungen	16
2.5	Histologische Auswertung	17
2.6	Statistische Auswertung	19

3 Ergebnisse

3.1	Beschreibende Statistik der Patientenpopulation	21
3.2	Histologische Ergebnisse	
3.2.1	Snail-positive Zellen	26
3.2.2	CD3-positive Zellen	27
3.2.3	CD8-positive Zellen	28

3.2.4	FOXP3-positive Zellen	30
3.2.5	Immunhistochemische Färbung von Twist	31
3.2.6	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von ZEB1 am Kolon- und Mammakarzinom	32
3.3	Univariate Ereigniszeitanalysen zur Assoziation der Expression von Snail im invasiven Mammakarzinom mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung	34
3.4	Univariate Ereigniszeitanalysen zur Assoziation der Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten im invasiven Mammakarzinom mit der Prognose der Erkrankung	37
3.4.1	CD3-positive Zellen im Tumor	37
3.4.2	CD8-positive Zellen im Tumor	40
3.4.3	FOXP3-positive Zellen im Tumor	43
3.5	Multivariate Überlebenszeitanalysen von FoxP3 sowie Snail im Cox-Regressionsmodell mit der TNM-Klassifikation	45
4	Diskussion	50
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	61
7	Danksagung	71
8	Publikationen und Preise	72
9	Lebenslauf	74

Legende

DCIS	duktales Carcinoma in situ
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
PanCK	Panzytokeratin
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue Micro Array

1 Einleitung

1.1 Epidemiologische und medizinische Bedeutung des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist bei der Frau mit knapp 1,7 Millionen Neuerkrankungen die mit Abstand häufigste Krebserkrankung weltweit und nach Lungenkrebs die am zweithäufigsten auftretende Tumorerkrankung insgesamt. 522.000 registrierte Todesfälle pro Jahr weltweit sind auf das Mammakarzinom zurückzuführen (Ferlay et al., 2013). Auch in Deutschland steht das Mammakarzinom mit einer Inzidenz von zuletzt circa 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr an erster Stelle unter den neu diagnostizierten malignen Tumoren. Laut den aktuellen Inzidenzraten erkrankt eine von acht Frauen in Deutschland in ihrem Leben an einem Mammakarzinom, wovon circa jede vierte Frau bei ihrer Erstdiagnose unter 55 Jahre alt ist. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 64 Jahre (Alkatout, Order et al., 2013). Die überwiegende Anzahl der Erstdiagnosen befindet sich in einem frühen Tumorstadium, wohingegen insgesamt 11 % der Patientinnen bei ihrer Erstdiagnose ein spätes Tumorstadium von T3 oder T4 aufweisen. Es wird vermutet, dass die hohe Anzahl an frühen Diagnosestellungen auf das 2005 eingeführte Mammographie-Screening zurückzuführen ist. In Deutschland beträgt die Anzahl der Sterbefälle rund 17.000 jährlich. Aufgrund der Fortschritte in der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms versterben heutzutage jedoch deutlich weniger Frauen an Brustkrebs als noch vor zehn Jahren. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 88% und wird vor allem durch Rezidiv- und Metastasenbildung beschränkt. (Robert-Koch-Institut, 2012).

Nach histopathologischer Diagnosesicherung des Mammakarzinoms bei abklärungsbedürftigen Befunden durch minimalinvasive Biopsie erfolgt nach Goldstandard für nicht fortgeschrittene Mammakarzinome die brusterhaltende operative Entfernung des Tumors mit anschließender adjuvanter Radiatio (Kreienberg et al., 2012). Für weitere Therapieoptionen wie die neoadjuvante sowie adjuvante Chemotherapie und endokrine Therapie sind das Tumorstadium und Grading sowie Hormon- und Her/2-neu-Status entscheidend (Kreienberg et al., 2012). Als limitierender Faktor für die kurative Therapie gilt nach wie vor die Fernmetastasierung des Mammakarzinoms. Das Potential eines malignen Tumors, invasiv zu wachsen und zu metastasieren hängt von vielen verschiedenen bisher noch überwiegend unbekanntem Faktoren auf

molekularer Ebene ab, die Gegenstand der aktuellen Forschung sind mit dem Ziel, aggressives Tumorwachstum frühzeitig zu erfassen und spezifisch behandeln zu können.

1.2 Histologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom wird histologisch anhand der WHO-Klassifikation in Subtypen eingeteilt. Der häufigste Typ, das invasiv-duktales Mammakarzinom, weist prozentual einen Anteil von 65 – 80 % aller Mammakarzinome auf. Er geht histologisch von entarteten Zellen des Epithels der Milchdrüsengänge aus. Daneben kommen weitere Subtypen mit abnehmender Häufigkeit vor: das invasiv-lobuläre (von Drüsenläppchen ausgehende) mit einer Häufigkeit von 6 – 15 %, das medulläre (3 %), das tubuläre (1 – 15 %), das muzinöse (schleimbildende) (1 – 2 %) und das papilläre (1 – 7 %) Mammakarzinom. Vom invasiv-duktales und vom invasiv lobulären Mammakarzinom lassen sich desweiteren das duktales Carcinoma in Situ (DCIS) und das lobuläre Carcinoma in Situ (LCIS) abgrenzen, welche noch nicht die Basalmembran durchbrochen haben und somit noch nicht in umliegendes Gewebe vorgedrungen sind. Diese werden auch als Vorstufen des invasiven Mammakarzinoms bezeichnet (Lenhard, 2002). Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit dem häufigsten Subtypen, dem invasiv-duktales Mammakarzinom.

1.3 Aspekte der epithelialen-mesenchymalen Transition

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen biologischen Prozess, bei dem durch biochemische Veränderungen epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften annehmen und somit die Fähigkeit erlangen, sich aus ihrem physiologischen Zellverband herauszulösen, die Basalmembran zu durchbrechen und in umgebendes Gewebe sowie Lymph- und Blutgefäße vorzudringen und sich hier neu anzupassen (Alkatout, Kabelitz, Kalthoff, & Tiwari, 2008; Wodarz & Nathke, 2007). Dies geschieht zum Einen über eine Dedifferenzierung der Epithelzelle und den Verlust typischer epithelialer Interzellularkontakte sowie der Zellpolarität (Kalluri & Weinberg, 2009). Zum Anderen erwirbt die Zelle mesenchymale morphologische Charakteristika, wodurch sie einen mesenchymalen Phänotyp imitiert und die Basalmembran unerkannt überschreiten kann. Anschließend bilden die migrierenden Zellen meist erneut einen Zellverband und es findet eine Redifferenzierung zu epitheliale Gewebe statt. Zusammenfassend wird auch von einer Transdifferenzierung gespro-

chen (Kalluri & Weinberg, 2009). Die Erstbeschreiber dieses Phänomens waren 1982 Greenburg und Hay (Greenburg & Hay, 1982; Hay, 1995). Die epithelial-mesenchymale Transition kommt sowohl physiologisch als auch pathologisch vor. Im physiologischen Zusammenhang findet man diesen Prozess in der Embryonalentwicklung ebenso wie in der Wundheilung. Pathologisch wird vermutet, dass die EMT entscheidend zur Metastasierung von Tumorzellen beiträgt. Der Prozess ist außerdem bei einzelnen entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn beschrieben worden (Bataille et al., 2008).

Im epithelialen Verband sind epitheliale Zellen sowohl lateral über Desmosomen und Adhärenskontakte und den Transmembranproteinen Cadherine, sowie über tight junctions, sogenannte Verschlusskontakte, miteinander als auch unter anderem über Hemidesmosomen mit der Basalmembran fest vernetzt. Jede Zelle dieses Verbands weist eine Zellpolarität auf. Das bedeutet, dass die apikale (Richtung Oberfläche weisende) sowie die basale (Richtung Basalmembran weisende) Seite der Zelle durch Zellkontakte und Vernetzung festgelegt ist. Die spezifischen Intermediärfilamente des Zytoskeletts der epithelialen Zellen sind die Zytokeratine (Lüllmann-Rauch, 2009).

Im Vergleich dazu weisen mesenchymale Zellen einen insgesamt lockeren Zellverband auf, in dem sich die Bindegewebszellen frei bewegen können. Sie kommunizieren über sogenannte gap junctions miteinander und sind diffus mit der Extrazellulärmatrix vernetzt. Mesenchymale Zellen weisen unter anderem Vimentin als spezifisches Intermediärfilament auf (De Wever et al., 2008).

Um die morphologischen Eigenschaften einer mesenchymalen Zelle anzunehmen und ins Bindegewebe disseminieren zu können, müssen epitheliale Zellen ihre spezifischen Zellkontakte und somit ihre Zellpolarität aufheben. Die Signalwege, die bei Tumorzellen zu EMT führen, sind noch weitgehend ungeklärt. Über genetische und epigenetische Veränderungen werden Tumorsuppressorgene und Protoonkogene in ihrer Aktivität beeinflusst (Kalluri & Weinberg, 2009). In diesem Zusammenhang werden EMT-steuernde Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Snail, ein Zinkfinger-Protein, aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass Zytokine wie TGF β in der Tumormikroumgebung über verschiedene Signalwege wie die Aktivierung von Tyrosinkinase Snail induzieren (Massagué, 2008; Wang, Shi, Chai, Ying, & Zhou,

2013). Die Aktivierung von Snail bewirkt vor allem, dass die Expression von E-Cadherin, eines spezifischen Transmembranproteins in epithelialen Zell-Zell-Kontakten, unterdrückt wird und so als ein entscheidender Faktor zur EMT beiträgt (Alkatout, Wiedermann et al., 2013). Weitere Transkriptionsfaktoren, die die Expression von E-Cadherin herab regulieren sind Slug, Zeb1 und Zeb2, die ebenfalls Zinkfingerproteine sind, sowie Twist, welcher ein Basic-Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor ist (Eckert et al., 2011; Elloul et al., 2005; Peinado, Olmeda, & Cano, 2007; Thiery, 2002). Snail sowie Slug, Zeb1, Zeb2 und Twist beeinflussen sowohl jeder für sich die Expression von E-Cadherin als auch im Zusammenspiel durch Wechselwirkungen miteinander. Sie bewirken letztendlich eine Inhibition des CDH1-Gens, welches für das Protein E-Cadherin codiert. Es sind verschiedene Signalwege beschrieben worden, die zu einer Induktion von EMT durch Hemmung der E-Cadherin-Expression führen. Unter anderem ist der WNT Signalweg bekannt, der durch das intrazelluläre Protein β -Catenin zu einer Erhöhung des Transkriptionsfaktors Slug führt, welcher wiederum EMT potenziert (Schmalhofer, Brabletz, & Brabletz, 2009). Durch eine gezielte experimentelle Hemmung des CDH1-Gens konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Abwesenheit von E-Cadherin eine EMT induziert wird (Drasin, Robin, & Ford, 2011).

In Zellen während des Prozesses der EMT werden durch ähnliche Mechanismen außerdem mesenchymspezifische Proteine wie Vimentin und Desmin exprimiert, was in Mausstudien und Zellkulturen gezeigt werden konnte (Yang & Weinberg, 2008). Dadurch passen sich die Zellen mit ihrem Phänotyp an das mesenchymale Gewebe an.

In vorausgehenden Arbeiten (Alkatout, Wiedermann et al., 2013) sowie weiterer Arbeitsgruppen (Brabletz et al., 2001) wurde ein Unterschied des Gehalts an EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren zwischen der Tumorperipherie und dem Tumorzentrum untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen an der Invasionsfront einen tendenziell höheren Gehalt an Snail, Twist, Slug und Zeb1 aufweisen als im Tumorzentrum. Diese intratumorale Heterogenität zeigt womöglich ein verschiedenes Aktivitätsprofil der Zellen in demselben Tumor, welches zu der Annahme führt, dass vor allem die Zellen an der Invasionsfront die Fähigkeit erlangen, zu metastasieren (Nassar, Radhakrishnan, Cabrero, Cotsonis, & Cohen, 2010).

Schaut man sich nun die EMT spezifisch im Bezug auf das Mammakarzinom an, existieren diverse wissenschaftliche Arbeiten, die sich mit diesem Themenkomplex auseinander gesetzt haben. Es gibt Hinweise darauf, dass eine hohe Snail-mRNA Expression mit einer höheren Rate an Lymphknotenmetastasen sowohl beim Mammakarzinom als auch beim Ovarialkarzinom assoziiert ist (Elloul et al., 2005).

Die Identifikation der Signalwege, die zum Prozess der EMT während der Entstehung von Metastasen beitragen, gilt als ein entscheidender Ansatz für neue Behandlungsmöglichkeiten in der Tumorthherapie (Kalluri & Weinberg, 2009).

Diese Arbeit ist ein Follow-up des letzten Projekts, das ebenfalls unter anderem das Expressionsmuster der EMT-Marker Snail und Twist im invasiven Mammakarzinom sowie desweiteren das Auftreten und das Verteilungsmuster von Tumorstammzellen im Tumorzentrum und an der Invasionsfront untersuchte. In dieser Arbeit wird nun der Fokus auf den Transkriptionsfaktor Snail gelegt sowie an einzelnen Beispielen auch Twist und ZEB1 untersucht. Diese Marker, die EMT induzieren sollen, wurden quantitativ immunhistochemisch in Tissue Micro Arrays aus Tumorgewebeproben von invasiven Mammakarzinomen erfasst und im Hinblick auf die Assoziation mit der Prognose und dem klinischen Verlauf untersucht.

1.4 Tumorinfiltrierende lymphatische Zellen als Einflussfaktor im Tumorgewebe

Mononukleare Immunzellen in der unmittelbaren Umgebung maligner Tumoren, die sich vor allem im Stroma des Tumors und seltener auch direkt in den Tumorzellarealen befinden, werden als tumorinfiltrierende lymphatische Zellen (TIL) bezeichnet (Fu et al., 2013; Zhang, Schiller, Gill, & Coventry, 1998). Bei vielen verschiedenen Tumorarten, wie zum Beispiel beim Melanom, zeigten sich solche TIL (Linnemann et al., 2015). Auch beim Mammakarzinom konnten TIL bereits nachgewiesen werden (Mohammed et al., 2012).

Die Immunzellen werden anhand von spezifischen Oberflächenmarkern und ihren immunologischen Aufgaben eingeteilt. Es werden B- und T-Zellen neben der angeborenen Abwehr als die zwei großen Gruppen der adaptiven Immunabwehr differenziert, wobei T-Zellen und Makrophagen in der Tumorbilogie die größte Rolle zugeschrieben wird (Teixeira, Rothé, Ignatiadis, & Sotiriou, 2016; Zhang et al., 1998). Die

T-Zellen lassen sich anhand ihres CD-Oberflächenprofils in spezifische Untergruppen einteilen. Allen T-Zellen ist der Oberflächenmarker CD3 gemeinsam. T-Helferzellen weisen CD4 auf und zytotoxische T-Zellen exprimieren CD8 an ihrer Oberfläche. Eine spezielle Gruppe bilden die regulatorischen T-Zellen, welche ebenso CD4- als auch CD25 sowie FOXP3-positiv sind. Um diese Zellen sicher zu detektieren, muss der Transkriptionsfaktor FOXP3 (forkhead box protein 3) intrazellulär nachgewiesen werden. Die aktuelle Forschung setzt sich mit der Frage auseinander, welche Bedeutung dem Auftreten von TILS zugeschrieben werden kann (DeNardo & Coussens, 2007; Hadrup, Donia, & Thor Straten, 2013; Kim et al., 2013; Zlobec & Lugli, 2009). Noch ist diese Frage nicht eindeutig geklärt, allerdings existieren konkrete Hinweise, dass sie eine Art körpereigene Immunabwehr darstellen, welche jedoch stark vom individuellen Immunzelltyp abhängt (Mao et al., 2016). Durch Mutationen entstandene tumorspezifische Neoantigene aktivieren T-Helferzellen sowie zytotoxische T-Zellen und lösen eine immunologische Reaktion auf diese aus (Gros et al., 2015; Linnemann et al., 2015). Von größter Relevanz in der Tumorbilogie des Mammakarzinoms sind offenbar einerseits die zytotoxischen T-Zellen, die als treibende Kraft der tumorassoziierten Immunantwort gelten (Ali et al., 2014; S. Liu et al., 2012; Mahmoud et al., 2011) sowie andererseits die regulatorischen FOXP3-positiven T-Zellen, die vermutlich die körpereigene Immunantwort auf den Tumor bremsen und sich somit negativ auf die Prognose der Patientinnen auswirken (Bates et al., 2006; Jiang, Gao, Cai, Wang, & He, 2015; F. Liu et al., 2011; Trzonkowski, Szmit, Mysliwska, Dobyszuk, & Mysliwski, 2004).

Es wird angenommen, dass Immunzellen in der Tumormikroumgebung das Tumorstadium fördern oder hemmen und so als prognostischer Indikator beim Mammakarzinom verwendet werden können (Gingras, Azim, Ignatiadis, & Sotiriou, 2015). Der Nachweis von TILS und die damit verbundene Bedeutung in der Prognose von Brustkrebs eröffnen letztendlich in der Klinik vielversprechende neue therapeutische Möglichkeiten. In der aktuellen Forschung setzen sich mehrere Arbeitsgruppen mit verschiedenen Ansätzen der Immuntherapie beim Mammakarzinom auseinander (Yu et al., 2017). Eine bereits etablierte Therapie ist die monoklonale Antikörpertherapie mit Trastuzumab gegen den tumorassoziierten Oberflächenrezeptor Her2/neu. Es wird daran geforscht, die körpereigene T-Zell-Antwort spezifisch durch Impfstoffe auf die Tumorzellantigene zu sensibilisieren und zu verstärken, um

ein therapeutisch effizientes Level der Immunantwort zu bewirken (Emens, 2012). Weitere Ansätze in der Immuntherapie sind beispielsweise Immuncheckpoint-Antikörper, die immunhemmende Oberflächenmoleküle auf Tumorzellen ausschalten sollen, um so die immunvermittelte Tumorabstoßung zu fördern (Leach, Krummel, & Allison, 1996; Topalian, Drake, & Pardoll, 2015).

Es wird diskutiert, dass der Prozess der EMT mit der Effizienz der körpereigenen antitumoralen Immunantwort in Zusammenhang steht. Es wird angenommen, dass die Veränderungen bei der EMT auch zu einer Immunsuppression und damit auch zur Tumorprogression und zur Bildung von Metastasen beitragen (Kudo-Saito, Shirako, Takeuchi, & Kawakami, 2009). Hierzu existieren Daten, die zeigen, dass eine Herabregulation der EMT mit einer Verhinderung der Induktion von FOXP3-positiven regulatorischen T-Zellen einhergeht und somit die antitumorale Immunreaktion fördert. Darüber hinaus könnte die tumorspezifische zytotoxische T-Zell-Reaktion der TIL von Snail-positiven Tumorzellen inhibiert werden und sich negativ auf die Prognose dieser Patientinnen auswirken (Baritaki & Bonavida, 2010; Ohshio et al., 2013). Tumorzellen, die genau diese Eigenschaften entwickeln, um der antitumoralen Immunantwort zu entgehen, gilt es zu identifizieren und therapeutisch entgegen zu wirken (Salgado et al., 2015).

In dieser Arbeit wurde anhand der Patientenkohorte aus dem Brustkrebszentrum der Frauenklinik des UKSH Campus Kiel in Schleswig-Holstein der Zusammenhang der Quantität und der Zusammensetzung der verschiedenen tumorinfiltrierenden Lymphozyten im invasiv-duktalem Mammakarzinom (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen) mit dem Krankheitsverlauf untersucht. Hierzu wurden uni- und multivariate Analysen durchgeführt, um eine Aussage über die prognostische Bedeutung der TIL treffen zu können.

1.5 Fragestellung

Diese Arbeit setzt sich mit folgenden Fragestellungen auseinander:

1. Ist die Expression von Snail und Twist im invasiven Mammakarzinom mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung assoziiert?
2. Lassen sich Zeb1-positive Mammakarzinomzellen im Prozess der EMT in situ nachweisen?
3. Ist das Ausmaß und die Zusammensetzung tumorinfiltrierender Lymphozyten mit dem Verlauf der Erkrankung beim invasiven Mammakarzinom assoziiert?

2 Materialien und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In dieser Studie wurden Patientinnen ausgewählt, bei denen in dem Zeitraum von März 1997 – Februar 2009 ein invasiv-duktales Mammakarzinom diagnostiziert wurde. Die Patientinnen wurden zur Primärbehandlung und Nachsorge im Mammazentrum der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am Campus Kiel der Universitätsklinik Schleswig-Holstein betreut.

Aus dem Gesamtkollektiv von 494 Patientinnen mit Mammakarzinom wurden für diese Arbeit 352 Patientinnen einbezogen, bei denen der histologische Subtyp invasiv-duktales Mammakarzinom vorlag.

Die Patientinnen waren im Durchschnitt bei der Erstdiagnose 59 Jahre alt (Minimum: 25,5 Jahre, Maximum 91,5 Jahre) und das mediane Follow-up der Studienteilnehmer betrug 43,2 Monate (Minimum 0,6 Monate, Maximum 136,8 Monate). Die prozentuale Verteilung der Tumorstadien liegt zusammengefasst bei 61,9 % der Patientinnen im Stadium T1, 29,5 % im Stadium T2 und insgesamt 8,5 % im Stadium T3 und T4. Desweiteren wiesen 39,2 % der Frauen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose regionäre Lymphknotenmetastasen (N1, N2, N3) auf, wohingegen bei 58,8 % die Lymphknoten noch nicht befallen waren (N0). In Bezug auf Fernmetastasen sieht die Verteilung wie folgt aus: 89,2 % der 352 Patientinnen waren bei Erstdiagnose frei von Fernmetastasen (M0), demgegenüber befanden sich 4,5 % der Patientinnen zu diesem Zeitpunkt bereits im M1-Stadium mit Fernmetastasierung (auf Grundlage der TNM-Klassifikation der UICC). Fehlende Prozente ergeben sich aus unvollständigen Angaben in der Datenbank des Mammakarzinom-Gesamtkollektivs.

Folgende weitere klinische Parameter aus der Gesamtdatenbank wurden in die Untersuchung einbezogen: histologisches Grading, Resektionsstatus, Hormonrezeptor-Status und Her2neu-Status (seit 2002 in der Routinediagnostik), Bestrahlung, Chemotherapie, endokrine Therapie sowie disease free survival, Todeszeitpunkte und das letzte Follow-up-Datum.

Diese Arbeit wurde von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (D426/10). Zusätzlich haben alle lebenden Patientinnen schriftlich in

die Einsicht ihrer klinischen Daten und die Teilnahme an wissenschaftlichen Studien eingewilligt.

2.2 Gewebematerial

Verwendet wurden Resektatpräparate der Erstumoren von Patientinnen, die sich in der Frauenklinik Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in operativer Behandlung befanden. Diese Präparate sind zur langjährigen Aufbewahrung durch folgende Schritte im Institut für Pathologie fixiert und archiviert worden:

- Fixierung in Formalin
- Einbettung in Paraffin
- Anfertigung von Schnitten mit Schichtdicke 3 μm mittels Schlittenmikrotom
- Wasserbad 45 – 55 °C zur Oberflächenentspannung
- Aufziehung der Schnitte auf beschichtete Objektträger der Firma Paul-Marienfeld-GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland) oder Leica (Solms, Deutschland)
- Trocknung mindestens 12 Stunden im Brutschrank bei 37 °C

Die folgende Abbildung zeigt einen beispielhaften Überblick über die Lokalisation der Stanzen im Tumorareal einer T1 Brustkrebspatientin in einer H&E-Färbung. Die Stanzen wurden in Abstand zur Invasionsfront aus dem Zentrum des Tumors entnommen. Die weißen Aussparungen stellen die Lokalisationen der Stanzen dar.

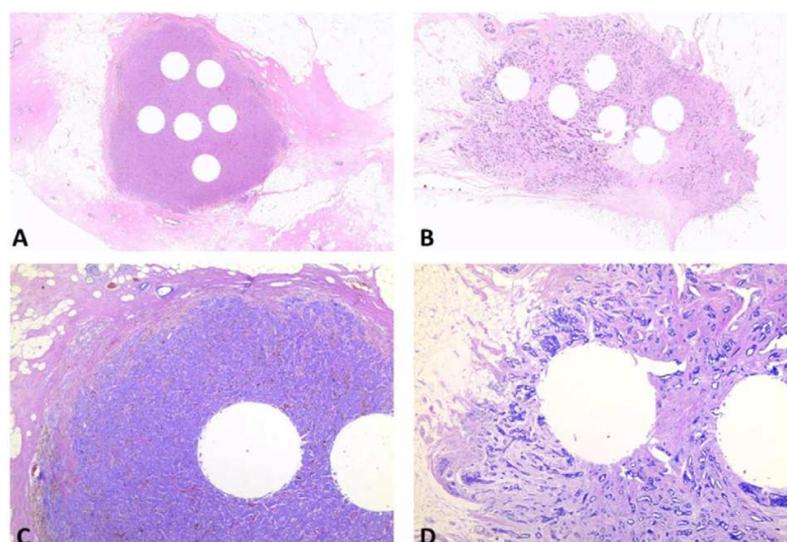


Abbildung 1: (A – D) Stanzareale im Tumor einer T1-Mammakarzinom-Patientin. H&E-Färbung; A/B: Überblick über den gesamten Schnitt; C/D: jeweils 2fache Vergrößerung der Schnitte aus a und b

2.3 Herstellung von Tissue Micro Arrays

Es wurden für die Herstellung der Tissue Micro Arrays mithilfe des manuellen Tissue Arrayer (MTA1, Beecher Instruments, Sun Prairie, USA) aus den Paraffin-Ge-webeblöcken der Mammakarzinome jeweils Stanzungen mit einem Durchmesser von 1 mm intratumoral entnommen und im Folgenden die so gewonnenen Stanzungen in einem neuen Paraffinblock zusammengesetzt sowie anschließend Schnitte angefer-tigt (s. Arbeitsschritte unter 2.2). Die maximale Anzahl der Cores (Stanzschnitte) pro Objektträger beträgt hierbei $N = 70$, wobei jeweils zwei Cores aus unterschiedlichen Tumorarealen desselben Tumors nebeneinander platziert sind. Je Objektträger wur-den zwei Cores mit Kontrollgewebe links oben am Beginn der ersten Reihe der zu untersuchenden Cores mit Mammakarzinomen untergebracht. Dabei handelt es sich um Leber- beziehungsweise Nierengewebe. Die folgende Darstellung zeigt beispiel-haft den Aufbau eines Tissue Micro Arrays.

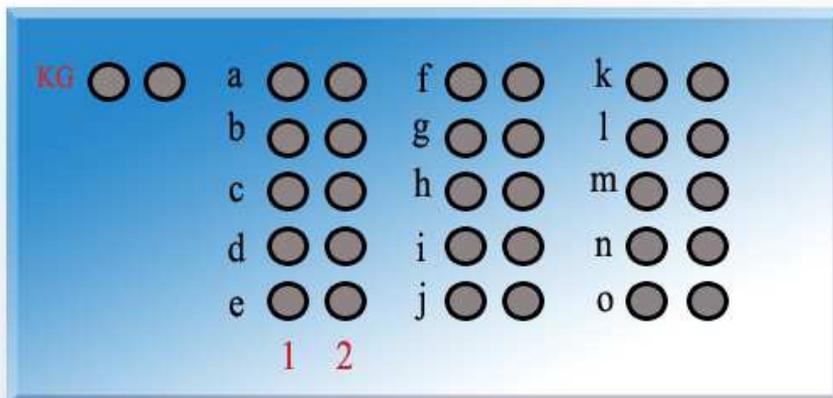


Abbildung 2: Schema der Tissue Micro Arrays auf dem Objektträger

KG: zwei Kontrollgewebe

1 und 2: Core 1 und 2 desselben Tumors

a-o: Patienten

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Antikörper

Bevor die Färbungen an den Tissue Micro Arrays erfolgten, wurden alle verwendeten Antikörper an Gewebeschnitten von Tonsillen, Colonkarzinomen und Mammakarzinomen zunächst auf die Qualität ihres Färbeergebnisses im Vergleich zur aktuellen Literatur und der vorausgegangenen Arbeit (Alkatout et al. 2013) getestet.

Auf dieser Grundlage wurden folgende primäre Antikörper für die immunhistochemische Färbung der TMAs verwendet:

Tabelle 1: Primäre Antikörper sowie Färbeeigenschaften der immunhistochemischen TMA-Färbungen

Anti-körper	Verdün-nung	Host	pH	Färbevorgang	Hersteller	Bestellnr.
CD3	1:100	mouse	6	Bond Automat	NeoMar-	RM-9107-
CD8	1:200	mouse	6	Bond Automat	Dako	M7103
FOXP	1:400	mouse	6	manuell	abcam	ab20034
Snail	1:50	rabbit	6	manuell	Novus bio-	NBP1-
Twist	1:100;	rabbit	6;	manuell/	abcam	ab50581
Zeb1	1:800	rabbit	6	manuell	Sigma	HPA02752
PanCK	1:200	mouse	6	manuell	NeoMar-	MS 343-P

2.4.2 Manuell durchgeführte immunhistochemische Färbungen

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Färbevorgangs am Beispiel der immunhistochemischen Färbung der TMAs mit dem Antikörper FOXP3 beschrieben. Änderungen im Vorgang für die weiteren Antikörper Snail, Twist und Zeb1 werden anschließend erläutert.

Die Objektträger mit den darauf enthaltenen TMAs wurden zu Beginn zehn Minuten in Xylol entparaffiniert, durchliefen anschließend zwei weitere Xylolbäder, um in Folge in einer absteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen 100 %, 98 %, 96 %, 70% rehydriert zu werden. Hierbei passierten die Schnitte jeweils mehrere Behälter derselben Alkoholkonzentration: 100 % dreimal, 98 % zweimal, 96 % zweimal, 70 % einmal. Um die endogene Peroxidase zu blocken, wurden die TMA-Schnitte für zehn Minuten in 200 ml Methanol mit 6 - 8 ml Wasserstoffperoxid überführt. Es schloss

sich ein Spülvorgang mit destilliertem Wasser an. Darauf folgend wurde die Demaskierung der Antigene vorgenommen. Hierzu gab man die Schnitte in einen Dampfkochtopf mit Citratpuffer (Herstellung: 10,5 g Citronensäure-Monohydrat mit 65 ml NaOH (2N) eingestellt) des pH6 und kochte sie für drei Minuten. Nachdem die Schnitte nun dreimal in destilliertem Wasser gespült und in eine Glasküvette mit Tris-Puffer (Herstellung: 5 ml Tween20 (Merck, Hohenbrunn, Deutschland), 9 g Tris-Base, 68,5 g Tris HCl, 7,8 g NaCl) gestellt wurden, konnte im Anschluss der Primärantikörper FOXP3 in der vorher an Tonsillen/Colon/Mamma-Schnitten getesteten Verdünnung 1:400 mit HAMA-Elisa Medac (Wedel, Deutschland) zu jeweils 200 µl pro TMA-Schnitt aufgetropft werden. Die Inkubationszeit betrug insgesamt eine Stunde bei Zimmertemperatur. Nach dieser Zeit schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang in Tris-Puffer an, damit daraufhin der sekundäre Antikörper Histofine – Simple Stain MAX PO (MULTI) Universal Immunoperoxidase Polymer Anti-Mouse-and-Rabbit von Medac (Wedel, Deutschland) zu jeweils vier Tropfen pro Schnitt aufgetropft werden konnte. Der sekundäre Antikörper hatte eine Einwirkzeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Erneut wurde ein dreimaliger Spülvorgang mit Tris-Puffer durchgeführt, bevor im Folgenden jeweils 100 µl DAB + Chromogen Farbstoff von DAKO (Hamburg, Deutschland) auf die Objektträger aufgetragen und für fünf Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurde mit Leitungswasser gespült und die Schnitte nun in eine Küvette mit Hämalun nach Mayer in einer Verdünnung von 1:4 überführt. Hier ließ man die TMAs für fünf Minuten inkubieren, wonach dreimal mit Leitungswasser gespült wurde und anschließend die Schnitte für zehn Minuten in einem Wasserbad bei Zimmertemperatur verweilten. Schließlich durchliefen die Objektträger mit den TMA-Schnitten eine aufsteigende Alkoholreihe in den Konzentrationen 70 %, 96 %, 98 %, 70 % in mehreren oben genannten Behältern, wonach sich zwei Alkohol-Xylolbäder im Mischverhältnis 1:1 und ein reines Xylolbad anschlossen. Zum Schluss konnten die gefärbten TMAs auf den Objektträgern mit einem Deckglas mittels Pertex® der Firma Medite (Burgdorf, Deutschland) abgedeckt und zur mikroskopischen Auswertung fixiert werden.

Snail-Färbung

Die immunhistochemische Färbung der TMAs mit dem Antikörper Snail lief insgesamt identisch zu den Schritten der Färbung mit FOXP3 ab. Der einzige Unterschied besteht in der Konzentration des Primärantikörpers Snail, welche in der Verdünnung mit HAMA-Elisa Medac (Wedel, Deutschland) 1:50 vorlag (siehe Tabelle 1).

Twist-Färbung

Anlässlich der starken unspezifischen Hintergrundfärbung des Bindegewebes bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Twist-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 wurden anschließend Verdünnungen von 1:200 und 1:300 eingesetzt. Hierbei trat die Problematik auf, dass einerseits der Hintergrund zwar noch schwach gefärbt war, jedoch andererseits keine Kernfärbungen zu beobachten waren. Infolgedessen wurden Parameter zur Demaskierung der Antigene Schritt für Schritt an Gewebeschnitten mit Mammakarzinom ausgetestet und verändert. Dabei sind Pufferlösungen der pH-Werte 6, 8 und 9 sowie Proteinase K zum Einsatz gekommen. Allerdings zeigten die Veränderungen der Parameter keine verbesserte Qualität der Färbung, sodass zwar anschließend an wenigen TMA-Schnitten die Färbung ausgetestet, jedoch aufgrund ähnlicher Ergebnisse wie zuvor bei Mammakarzinom-Ganzschnitten nicht weiter ausgewertet wurde.

Zeb1-Färbung

Sowohl für die Mamma-Ganzschnitte als auch für die TMA-Schnitte wurden diverse Änderungen im Färbeprotokoll mit dem Antikörper Zeb1 vorgenommen. Hier wurde nach dem Färbeprotokoll von Anja Schmitt, Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Freiburg, vorgegangen (Schmalhofer et al., 2009).

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte wie vorher bei der FOXP3-Färbung beschrieben (siehe oben), allerdings beließ man die Präparate für insgesamt 15 Minuten in Xylol. Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger in 2 Liter 10 mM Citratpuffer mit 1 ml Tween (#244.1000 Merck, Hohenbrunn, Deutschland) bei pH6 für drei Minuten gekocht. Für fünf Minuten sind die Schnitte anschließend in destilliertem

Wasser zum Abkühlen belassen worden, damit im Folgenden die Peroxidase-Blocking-Solution von DAKO (#S2023, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten auf die Schnitte einwirken konnte. Nach dreimaligem Spülen und fünf minütigem Verharren im Tris-Puffer konnte der Primärantikörper Zeb1 (HPA027524, Sigma, Steinheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:800 mit HAMA-Elisa Medac (Wedel, Deutschland) zugegeben werden. Pro TMA-Schnitt wurden hierbei 200 µl verwendet. Die Schnitte lagerten anschließend über Nacht zur Inkubation bei 4 °C in einer feuchten Kammer im Kühlschrank. Am nächsten Tag erfolgte das weitere Vorgehen wie bei der oben beschriebenen FOXP3-Färbung: Der sekundäre Antikörper Histofine wirkte 30 Minuten ein, danach folgten der DAB Farbstoff von DAKO für vier Minuten sowie die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für fünf Minuten und zuletzt die aufsteigende Alkoholreihe mitsamt Xylol und das Eindecken der Schnitte mit Deckgläsern.

Bei der Zeb1-Färbung von Gewebe-Ganzschnitten wurde zusätzlich eine zweite Färbung mit dem Antikörper PanCK (Pancytokeratin) zur Markierung der Zellen mit epithelialen Eigenschaften durchgeführt. Hierzu wurde nach dem Schritt mit dem DAB Farbstoff von DAKO und anschließendem Waschvorgang in Tris-Puffer der Primärantikörper PanCK von Neomarkers in einer Verdünnung von 1:200 mit HAMA-Elisa aufgetragen. Dieser Antikörper inkubierte für eine Stunde. Es schloss sich ein dreimaliges Spülen mit Tris-Puffer an und nach 20-minütigem Einwirken des Enhancers (Ultravision LP Large Volume Detection System AP Polymer, Thermo-Scientific, USA) sowie mehrmaligem Spülen konnte der sekundäre Antikörper (Large Volume AP Polymer, Thermo Scientific, USA) für 30 Minuten inkubieren. Der Antikörper-Antigen-Komplex wurde mit dem Permanent AP Red Chromogen + Permanent AP Red Buffer (Thermo-Scientific, USA) 1:16, welcher sich als rötlicher Farbstoff darstellt, sichtbar gemacht. Die Einwirkzeit betrug hierbei zehn Minuten. Nach anschließendem Spülen konnte die Gegenfärbung mit Hämalaun für zwei Minuten sowie die Entwässerung mittels der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol und das abschließende Deckeln der Präparate durchgeführt werden.

2.4.3 Automatische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern, die CD3 und CD8 markieren sollen sowie E-Cadherin und Vimentin an Beispielschnitten, werden im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins Campus Kiel automatisch in der Routine durchgeführt. Dies ermöglichte, dass die TMA-Schnitte mittels des Färbeautomaten Bond der Firma Leica Microsystems (Newcastle, UK) gefärbt werden konnten. Hierfür wurde das Polymer Refine Detection System von Leica verwendet (Bestellnummer: DS9800, Newcastle, UK). Im ersten Schritt fand die Blockung der endogenen Peroxidaseaktivität durch die Inkubation der Schnitte mit 3 – 4 %igem Wasserstoffperoxid statt. Daran schloss sich die Demaskierung der Antigene an. Diese wurde mit einem Citratpuffer des pH6 vorgenommen, wobei man den Puffer für CD3 30 Minuten und für CD8 insgesamt 20 Minuten einwirken ließ. Anschließend erfolgte ein Waschgang, damit danach der primäre Antikörper CD3/CD8 für 15 - 20 Minuten inkubieren konnte. Zur Detektion des jeweiligen Primäantikörpers wurde vom Automaten ein spezifischer Post-Primary-IgG-Linker-Reagenz in Tris-Puffer (z.B. rabbit-anti-mouse-IgG) eingesetzt. Danach erfolgte ein Waschgang und anschließend wurde zur weiteren Verstärkung des Signals ein zweites Polymer (z.B. anti-rabbit-Poly-HRP-IgG) in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung verwendet, welches an den vorigen Post-Primary-IgG bindet. Nach nochmaligem Waschen erfolgte die Zugabe des DAB Farbstoffes von DAKO. Diese 66 mM 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung mit Stabilisator musste zehn Minuten einwirken und dient als Substratchromogen der farblichen Markierung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Zum Schluss wurde die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt, welches fünf Minuten auf den Präparaten verblieb. Nachdem die Schnitte in destilliertes Wasser überführt wurden, konnten sie nun zur weiteren Verwendung mit Deckgläsern abgedeckt und fixiert werden.

2.4.4 Kontrollen der Färbungen

Jeder durchgeführte Färbevorgang wurde internen Kontrollen unterzogen. Hierzu dienten Gewebeschnitte von Colonkarzinom, Tonsille oder Mammakarzinom. Jeweils ein Kontrollgewebe wurde bei jeder Färbung unter denselben Bedingungen wie die TMA-Schnitte mit gefärbt und im Nachhinein auf Färbemuster und Plausibilität über-

prüft. Da ihr Färbeverhalten bekannt war, konnten so die Färbungen der Tissue Micro Arrays auf Validität überprüft werden.

Als zweite interne Kontrolle der Färbungen wurden Kontrollstanzen von Nierengewebe auf jedem TMA-Objektträger mit gefärbt. Dank ihrem bekannten Färbemuster konnte man ebenso Aussagen über die Stimmigkeit der Färbung treffen und gegebenenfalls bei unzureichender Qualität der Färbungen diese unter anderen Färbebedingungen wiederholen.

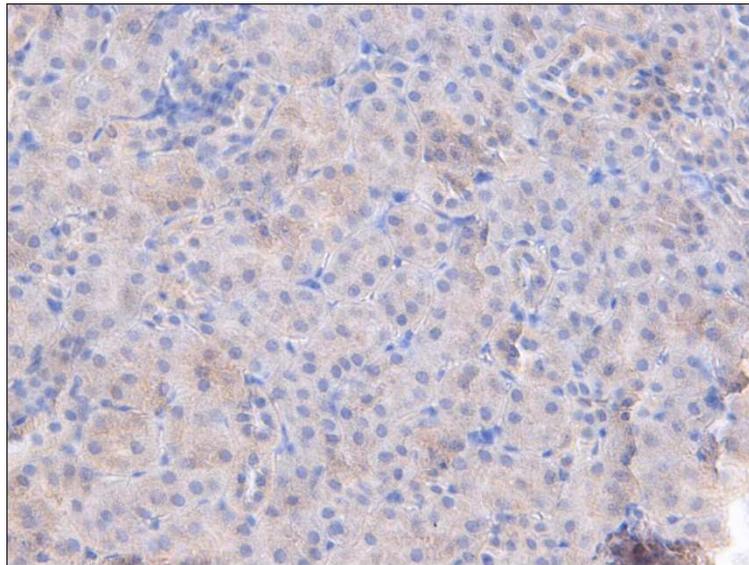


Abbildung 3: Beispiel: Nierengewebe als TMA-Kontrolle bei der FOXP3-Färbung; Hämalaun blau und FOXP3-Antikörper-Färbung braun dargestellt in 400facher Vergrößerung

2.5 Histologische Auswertung

Die visuelle Auswertung der immunhistochemischen Tissue Micro Array Färbungen wurde an einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss (Axiophot, Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) durchgeführt. Nachdem eine Übersicht mit der 50fachen und 100fachen Vergrößerung gewonnen wurde, konnte man in der 200fachen Vergrößerung an der jeweiligen Stanze (Core) ein Areal bestimmen, in welchem möglichst viel Tumorgewebe vorhanden war. In der 400fachen Vergrößerung erfolgte die Auswertung mittels eines Zähllokulars, welches eine quadratische Zählkammer zur besseren Übersicht in zehn gleichgroße Quadrate auf 10 mm x 10 mm unterteilt. Anhand der Größe der gesamten Zählkammer wurde die Größe des High Power Fields festgelegt, in dem die Zellzahl der positiv markierten Zellen quantitativ bestimmt wurde. Pro Core wurden zwei High Power Fields ausgezählt, sodass pro Tumorpatient je vier Tumoreale auf positive Zellen untersucht und ausgezählt wurden.

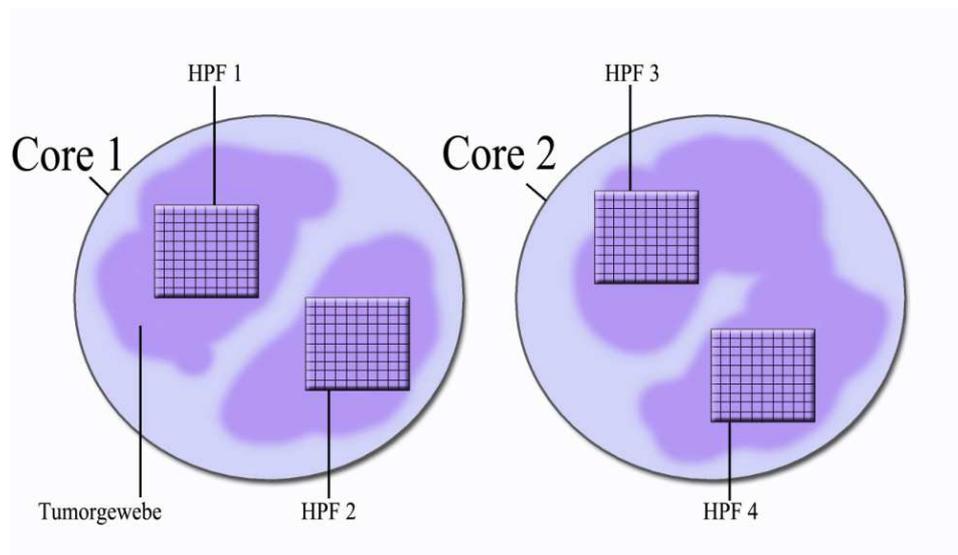


Abbildung 4: Schema der mikroskopischen Auswertung der Cores

HPF: high power field

Raster: Zählkular

Es wurden alle Zellen ausgezählt, die sich innerhalb dieser Kammer befanden. Randständige Zellen, die ein positives Signal zeigten, sind mitgezählt worden, wenn der Anschnitt der Zelle zu mindestens der Hälfte in der Kammer lag.

Bei Snail und Zeb1 Färbungen wurde darauf geachtet, dass eine Kernfärbung zu sehen ist. Falls dies nicht der Fall war, wurden die Zellen nicht als positiv gewertet. Außerdem sind Präparate ausgemustert worden, wenn sich eine zu starke Hintergrundfärbung zeigte, sodass Zellen nicht sicher als positiv zu werten waren. Bei CD3 und CD8 Färbungen wurde darauf Wert gelegt, dass die positiven Zellen dicht in und um das Tumorgewebe verteilt waren.

Desweiteren sind Präparate nicht beurteilt worden, wenn weniger als die Hälfte der Fläche des High Power Fields keine Tumorzellen zeigte.

Bei den Zeb1 Färbungen sind sowohl Ganzschnitte von Colonkarzinom und Mammakarzinom als auch TMA-Schnitte ausgewertet worden. Die Auswertung erfolgte hier jedoch rein beschreibend und nicht quantitativ im Vergleich zu den Färbungen mit den Antikörpern FOXP3, CD3 und CD8. Hierbei schaute man sich vergleichend Tumoreale an, die an der Invasionsfront lagen und Tumoreale, die näher am Tumorzentrum platziert waren, um eine Aussage über die Tendenz der Verteilung der positiven Zeb1-Zellen treffen zu können.

Sowohl von den Tissue Micro Arrays als auch von den Ganzschnitten der Gewebe wurden beispielhaft Fotos von repräsentativen Arealen über eine Mikroskopkamera aufgenommen. Die Kamera stammt von der Firma Jenoptik AG und entspricht dem Typ ProgRes CF. Die Gewebebilder wurden mittels des Software Programms ProgRes® CapturePro 2.7 auf den Computer übertragen. Separat konnten manuelle Helligkeitseinstellungen und ein jeweiliger Weißabgleich mit der Software vorgenommen werden und die Bilder anschließend digital gespeichert werden.

2.6 Statistische Auswertung

In der mikroskopischen Auswertung wurden im Vorfeld jeweils vier High Power Fields pro Tumor auf positive Zellen ausgezählt. Aus diesen vier Ergebnissen sind nun jeweils die Mittelwerte gebildet worden, sodass pro Tumor ein relevanter Wert in die statistische Auswertung einfließt. In einigen wenigen Fällen war ungenügend Tumormasse für vier High Power Fields vorhanden, sodass hier aus zwei bis drei High Power Fields Mittelwerte gebildet wurden.

Für die Statistik der Arbeit konnte die Beratung und Mitarbeit von Herrn Dipl.-Inform. Hedderich, Leiter des Fachbereichs Biometrie und statistische Auswertungsprogramme des Instituts für Medizinische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel, in Anspruch genommen werden.

Die Auswertung erfolgte mithilfe des statistischen Software Programms IBM SPSS Statistics 20 und des Statistikprogramms R! Version 3120 (Betreiber: R Development Core Team).

Aus der Gesamtdatenbank der Patientinnen mit duktal-invasivem Mammakarzinom mit Erstdiagnose 1997 - 2009 der gynäkologischen Klinik des Campus Kiel wurden nach aktuellem Literaturstand Werte selektiert, die vor allem für die Prognose der Tumorpatienten von Bedeutung sind: Alter, histologisches Grading, Tumorstadium pT, Lymphknotenmetastasen N, Fernmetastasen M, Resektionsstatus nach OP, Hormonrezeptorstatus (Östrogen-, Progesteron-, Her2neu-Status) und Lokalrezidive. Weitere epidemiologische Daten, die aus dieser Gesamtdatenbank verwendet wurden, sind Therapieverfahren (Chemotherapie, Bestrahlung, Operation, endokrine Therapie), Disease Free Survival und das Gesamtüberleben.

Für diese Daten wurden im Rahmen der deskriptiven Statistik jeweils absolute und relative Häufigkeiten in der Kohorte beschrieben. Desweiteren sind die Verteilungen des Patientenalters und der Follow-up Zeit in Diagrammen dargestellt worden.

Ebenso wurden Häufigkeitsdiagramme der vier zu untersuchenden Marker CD3, CD8, FOXP3, Snail erstellt.

Zur Assoziations- und Regressionsanalyse sind jeweils Kreuztabellen der vier Marker untereinander wie auch mit den Prognosefaktoren und den Überlebenszeit-Daten angefertigt sowie der Chi-Quadrat-Test durchgeführt worden. Die Ergebnisse wurden jeweils auf statistische Signifikanz auf einem Signifikanzniveau von 5 % geprüft (p-Wert).

Die Tumoren wurden anhand der Häufigkeiten der verschiedenen Marker-positiven Zellen in Gruppen unterteilt. Hierbei orientierte sich die Gruppenzugehörigkeit und der jeweilige Cut-off an den Perzentilen, sodass sich folgende Einteilungen ergaben:

Tabelle 2: Gruppeneinteilungen anhand der Häufigkeiten der Marker-positiven Zellen

	CD3	CD8	FOXP3	Snail
Anzahl positiver Zellen im Tumorgewebe	0	0	0	0
	≤ 20	≤ 5	> 0	≤ 20
	> 20	> 5		> 20

Für diese Gruppen wurden innerhalb des zugehörigen Markers vergleichende Überlebenszeitkurven (overall survival, disease free survival) nach Kaplan-Meier erstellt.

Um die Zusammenhängigkeits- bzw. Abhängigkeitsstrukturen der Marker untereinander sowie des TNM-Stadiums bezogen auf das Gesamtüberleben (overall survival) zu untersuchen, wurde weiterhin eine Cox-Regression für Snail und FOXP3 in drei Schritten durchgeführt. Dabei wurde die Hazard Ratio für beide Faktoren berechnet. Diese setzt das Sterberisiko von Patientinnen, die Snail oder FOXP3-positiv waren, zu Patientinnen mit negativem Tumor, in ein relatives Verhältnis zueinander., sodass eine Aussage darüber getroffen werden kann, um ein Wievielfaches das Risiko am Snail oder FOXP3-positiven Mammakarzinom zu versterben erhöht oder verringert ist im Vergleich zu negativen Mammakarzinomen.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibende Statistik der Patientenpopulation

Die Population von Patientinnen mit invasiv-duktalem Mammakarzinom, die an dieser Studie teilgenommen haben, zeigt die Altersstruktur wie in Abbildung 4 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Altersverteilung einer Gauß'schen Glockenkurve gleicht. Der Mittelwert mit 58,96 Jahren entspricht somit annähernd dem Median von 59,68 Jahren wie man der Tabelle 4 entnehmen kann. Bei einer Gesamtzahl von 352 Patientinnen ist die jüngste Patientin bei der Diagnostizierung eines Mammakarzinoms 25 Jahre alt gewesen und die älteste Patientin hatte ein Alter von 91 Jahren. 25 % der Patientinnen dieser Arbeit waren bei Erstdiagnose unter 50 Jahren (s. Tabelle 4).

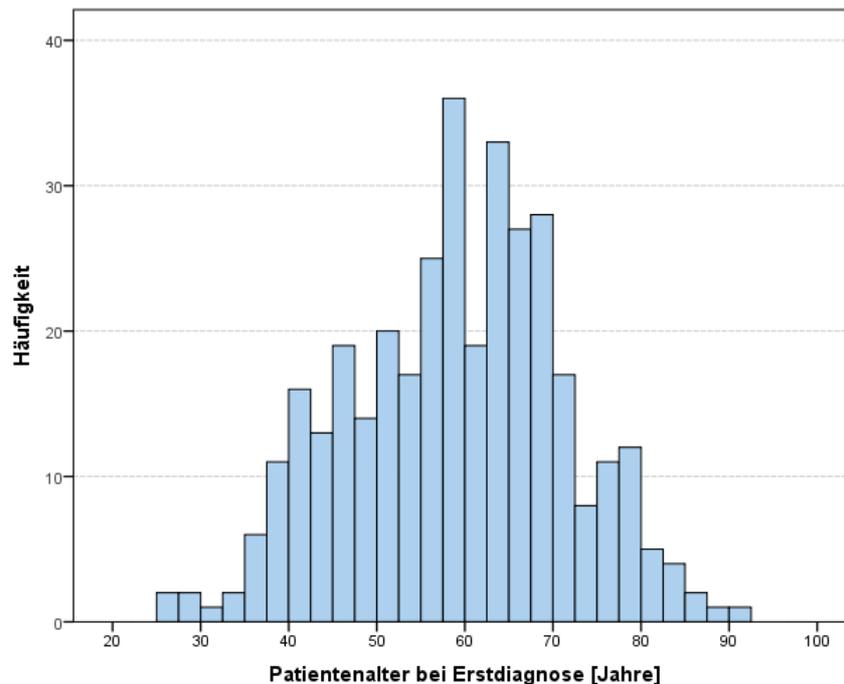


Abbildung 5: Altersstruktur der untersuchten Patientenpopulation
x-Achse: Patientenalter bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms
y-Achse: absolute Häufigkeiten (Patientenanzahl)

Die mittlere Beobachtungszeit der untersuchten Patientenpopulation beträgt 48 Monate, wobei die minimale Follow up Zeit 0,6 Monate und die maximale Follow up Zeit 136,8 Monate aufweist. 50 % der Patientinnen liegen unter einer Beobachtungszeit von 43,2 Monaten (s. Tabelle 3).

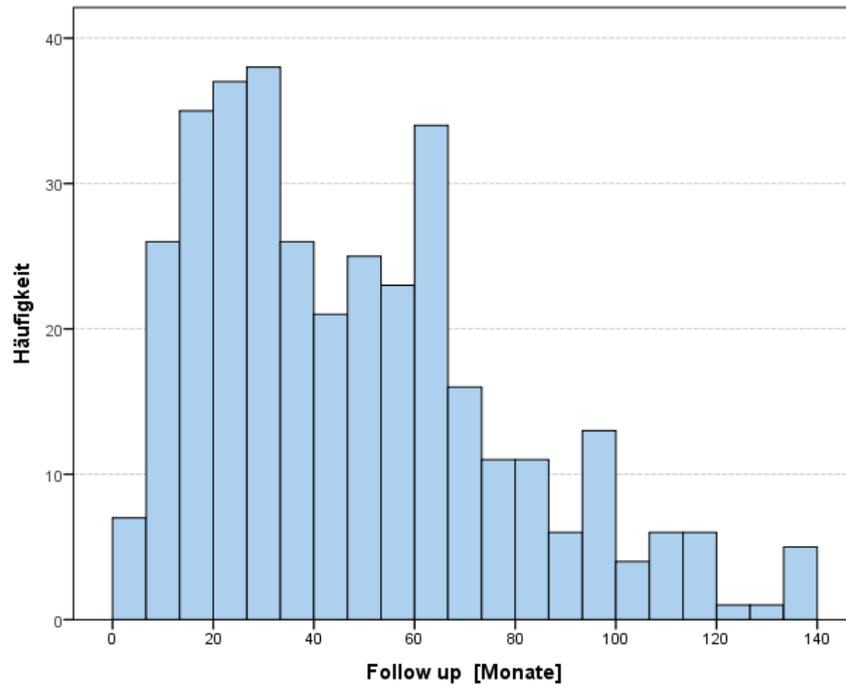


Abbildung 6: Follow up der untersuchten Patientenpopulation in Monaten bezogen auf die absolute Häufigkeit der Patientenzahl

Tabelle 3: Statistische Merkmale der Altersverteilungen und des Follow up in der Kohorte

N: Patientenzahl
 MW: Mittelwert
 δ : Standardabweichung
 Min.: Minimum
 Max: Maximum

	N	MW	δ	Min.	Max.	Perzentile		
						25.	50. (Median)	75.
Patientenalter bei Erst-diagnose [Jahre]	352	58,96	12,3	25,48	91,50	50,40	59,68	67,57
Follow up [Monate]	352	48,02	30,09	0,6	136,8	23,46	43,22	64,46

Das Gesamtzeitüberleben (overall survival) und das ereignisfreie Überleben (disease free survival) sind in Abbildung 7 und 8 dargestellt.

Basierend auf dem 95 %-Konfidenzintervall liegt die mittlere Überlebenszeit bei 95 Monaten. Der Median beträgt in diesem Fall 96 Monate, sodass 50 % der Patientinnen innerhalb dieser 96 Monate verstorben sind.

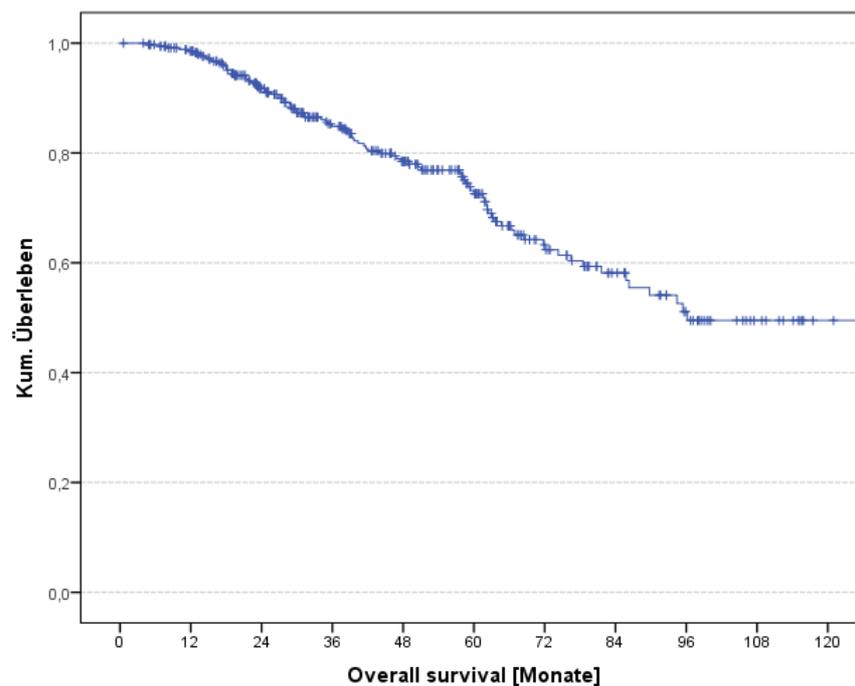


Abbildung 7: Gesamtzeitüberleben der untersuchten Patientenpopulation

x-Achse: overall survival (Gesamtzeitüberleben in Monaten)

y-Achse: kumuliertes Überleben in Prozentangabe

Wenn man die ereignisfreie Zeit (disease free survival) betrachtet (Abbildung 8), fällt auf, dass innerhalb von 120 Monaten bei über 60 % der Patientinnen die Krebserkrankung wieder in Erscheinung getreten ist.

Die Hälfte der untersuchten Patientinnen mit Mammakarzinom weisen eine ereignisfreie Zeit von 90,7 Monaten und mehr auf (Median).

Desweiteren beträgt die ereignisfreie Zeit im Gesamtdurchschnitt 87,5 Monate.

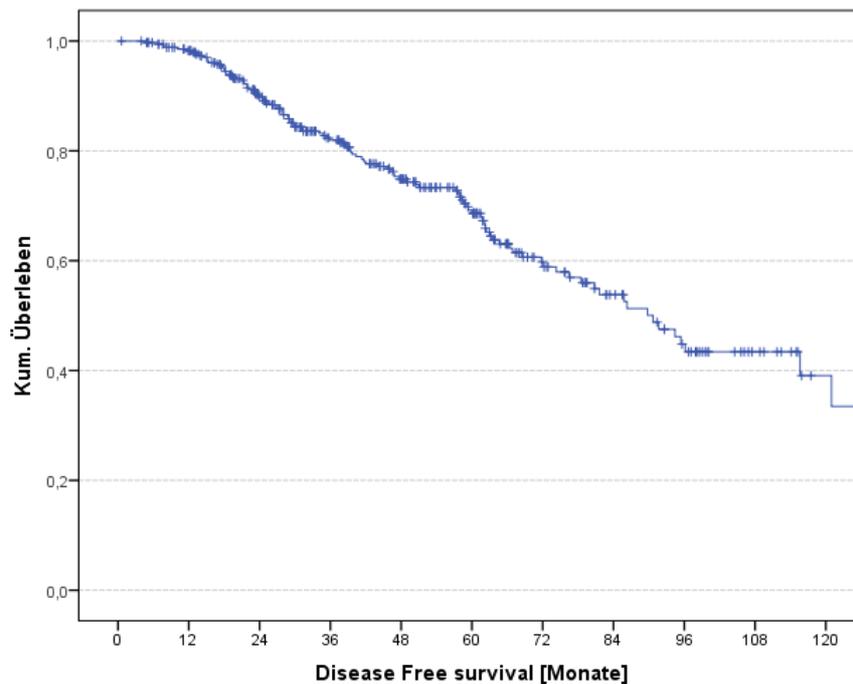


Abbildung 8: ereignisfreie Zeit der untersuchten Patientenpopulation

x-Achse: disease free survival (ereignisfreie Zeit in Monaten)
y-Achse: kumuliertes Überleben (relative kumulierte Häufigkeit)

Im Folgenden werden die allgemein bekannten Prognosefaktoren (Grading, Tumorstadium, Lymphknotenbefall, Metastasen, Hormonrezeptorstatus: Östrogen/Progesteron/Her2neu) der Patientenpopulation tabellarisch festgehalten (Tabelle 4). Es sind die absoluten und relativen Häufigkeiten der einzelnen Werte in der Gesamtpopulation von 352 Patientinnen dargestellt. Fehlende Informationen über Patienten sind ebenfalls jeweils in der absoluten und relativen Häufigkeit in Bezug zur Gesamtpopulation angegeben.

Der hohen Anzahl von 24 % fehlender Angaben beim Her2neu-Status liegt folgende Ursache zugrunde, dass vor 2002 der Her2neu-Status nicht routinemäßig mitbestimmt wurde. Für die weiteren Daten liegt die Vollständigkeit bei mindestens 91 %.

Betrachtet man die Prognosefaktoren inhaltlich genauer, fällt außerdem auf, dass in dieser Patientenpopulation nur 8,5 % bei Erstdiagnose einem Tumorstadium von T3 oder T4 angehören. 40 % der Patientinnen wiesen bei Diagnosestellung einen Lymphknotenbefall auf und 4,8 % der Population hatte zu diesem Zeitpunkt bereits Metastasen.

Tabelle 4: absolute und relative Häufigkeiten der einzelnen Prognosefaktoren

		absolute frequency	relative frequency %
age	< 50	88	25,0
	> 50	264	75,0
	total	352	100
histological grade	G1	32	9,1
	G2	216	61,4
	G3	100	28,4
	total	348	98,9
tumor stage	T1	218	61,9
	T2	104	29,5
	T3 and T4	30	8,5
	total	352	100
lymph node status	negative	207	58,8
	positive	138	39,2
	total	345	98,0
metastasis status	M0	314	89,2
	M1	16	4,5
	total	330	93,7
ER status	negative	85	24,1
	positive	264	75,0
	total	349	99,1
PR status	negative	130	36,9
	positive	219	62,2
	total	349	99,1
Her2neu status	negative	164	46,6
	positive	103	29,3
	total	267	75,9

3.2 Histologische Ergebnisse

3.2.1 Snail-positive Zellen

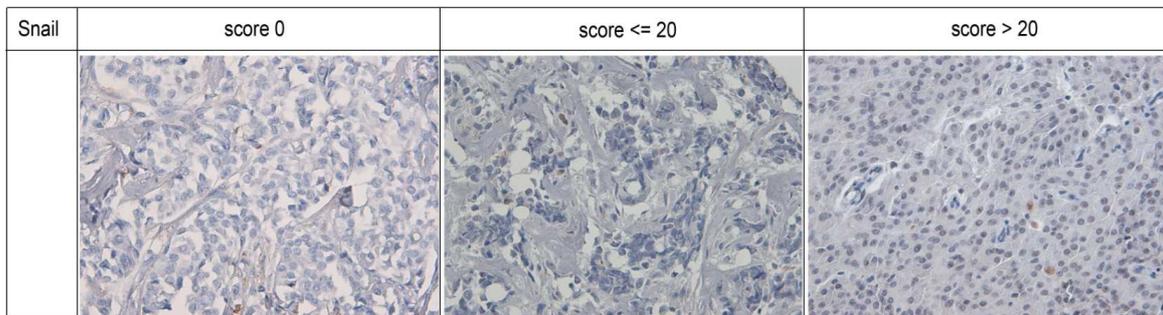


Abbildung 9: histologische Beispiele an untersuchten Mammakarzinomen für Snail-positive Zellen mit einer 400fachen Vergrößerung, aufgeteilt in drei Kategorien nach Anzahl positiver Zellen.

Abbildung 9 zeigt beispielhaft die immunhistochemische Färbung von Snail am Mammakarzinom (Abbildung 9). Die histologischen Ergebnisse sind hier nach den Kategorien 0 positive Zellen, unter 20 positive Zellen und über 20 positive Zellen eingeteilt, wie sie auch bei CD3 vorliegen. Positive Zellen stellen sich in den histologischen Bildern durch einen braun gefärbten Zellkern dar. Abbildung 10 zeigt im Anschluss einen Ausschnitt eines Tumorareals in dreifacher Ausführung. Es wurden beispielhaft Snail, E-Cadherin und Vimentin angefärbt. Es wird eine hohe Expression sowohl von Snail als auch E-Cadherin in den Tumorzellen deutlich. Vimentin wurde ausschließlich in extrazellulären Bereichen gefunden. Insgesamt konnten 251 Tumoren von 352 histologisch ausgewertet werden. Der Mittelwert der Snail-positiven Zellen in den Tissue Micro Arrays beträgt 20,2 Zellen (Standardabweichung 40) und der Median liegt bei 1,7 Zellen. Die maximale Anzahl gezählter Snail-positiver Zellen in einem Tumor beläuft sich auf 257 Zellen.

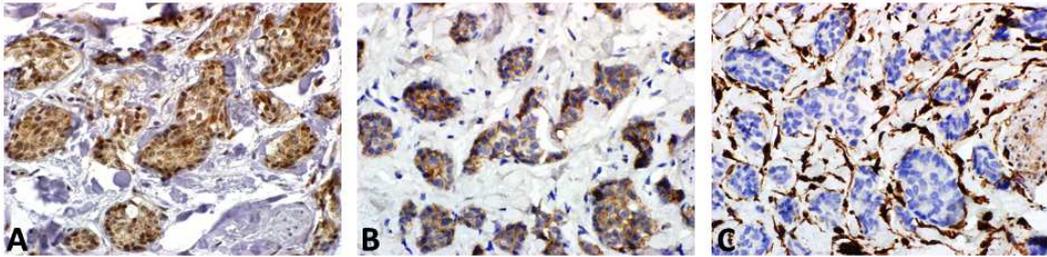


Abbildung 10: Tumorareal in 400facher Vergrößerung desselben Patienten.

A) Expression von Snail **B)** Expression von E-Cadherin. **C)** keine Expression von Vimentin in einer der Tumorzellen

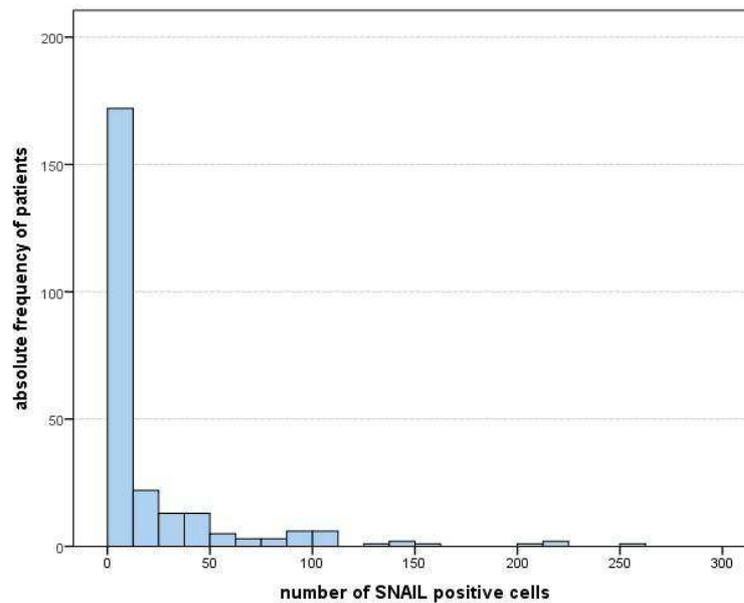


Abbildung 11: Diagramm zur Häufigkeit der Anzahl Snail-positiver Zellen im Tumor

3.2.2 CD3-positive Zellen

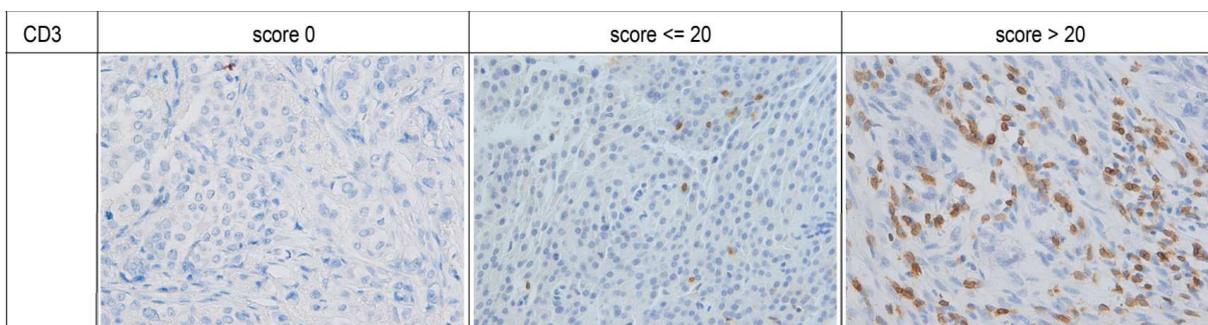


Abbildung 12: histologische Beispiele an untersuchten Mammakarzinomen für CD3-positive Zellen mit einer 400fachen Vergrößerung, aufgeteilt in drei Kategorien nach Anzahl positiver Zellen.

Ein Beispiel für das Färbeergebnis von CD3 liefert Abbildung 12. Die histologischen Ergebnisse sind hier nach den Kategorien 0 positive Zellen, unter 20 positive Zellen und über 20 positive Zellen eingeteilt, wie sie auch für die Statistik verwendet wurden. Positive Zellen stellen sich in den histologischen Bildern braun dar. Insgesamt konnten 283 Tumoren von 352 histologisch ausgewertet werden. Der Mittelwert der CD3-positiven Zellen in den Tissue Micro Arrays beträgt 16,6 Zellen (Standard-abweichung 27,2) und der Median liegt bei 7,2 Zellen. Die maximale Anzahl ge-zählter CD3-positiver Zellen in einem Tumor beläuft sich auf 205 Zellen.

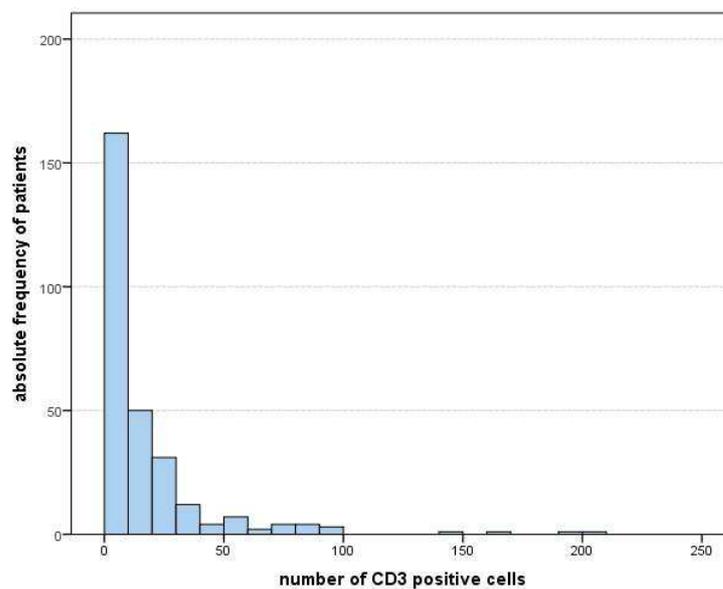


Abbildung 13: Diagramm zur Häufigkeit der Anzahl CD3-positiver Zellen im Tumor

3.2.3 CD8-positive Zellen

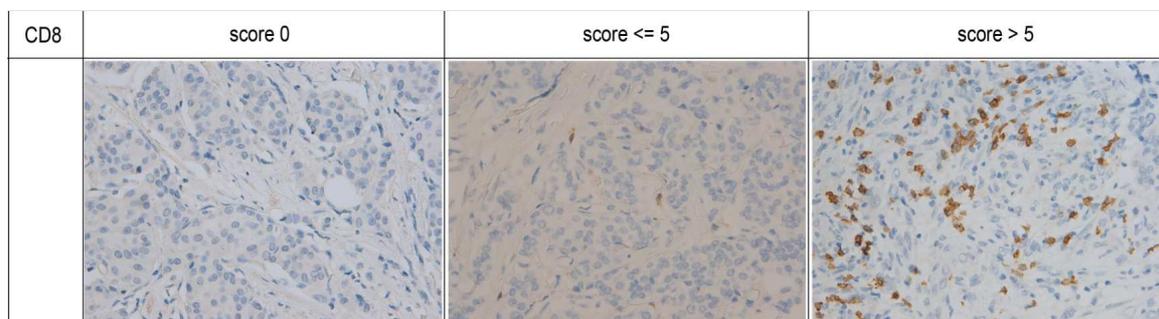
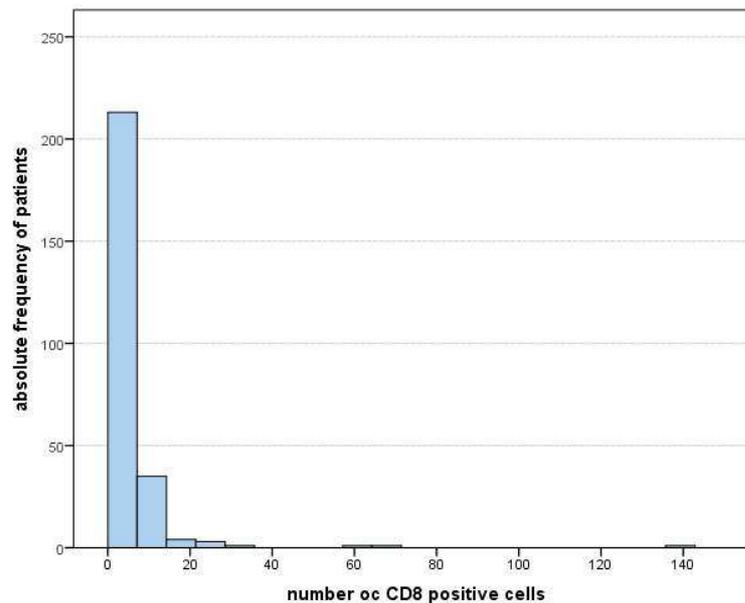


Abbildung 14: histologische Beispiele an untersuchten Mammakarzinomen für CD8-positive Zellen mit einer 400fachen Vergrößerung, aufgeteilt in drei Kategorien nach Anzahl positiver Zellen.

In Abbildung 14 ist das immunhistochemische Färbeergebnis für CD8-positive Zellen zu sehen. Die histologischen Ergebnisse sind hier nach den Kategorien 0 positive Zellen, unter 5 positive Zellen und über 5 positive Zellen eingeteilt, wie sie auch für die Statistik verwendet wurden. In manchen Tumoren war eine leicht bräunliche



Hintergrundfärbung zu erkennen. Insgesamt konnten bei CD8 259 Tumoren von 352 histologisch ausgewertet werden. Der Mittelwert der CD8-positiven Zellen in den Tissue Micro Arrays beträgt 4,5 Zellen (Standardabweichung 11,2) und der Median liegt bei 1,5 Zellen. Die maximale Anzahl gezählter CD8-positiver Zellen in einem Tumor beläuft sich auf 142 Zellen.

Abbildung 15: Diagramm zur Häufigkeit der Anzahl CD8-positiver Zellen im Tumor

3.2.4 FOXP3-positive Zellen

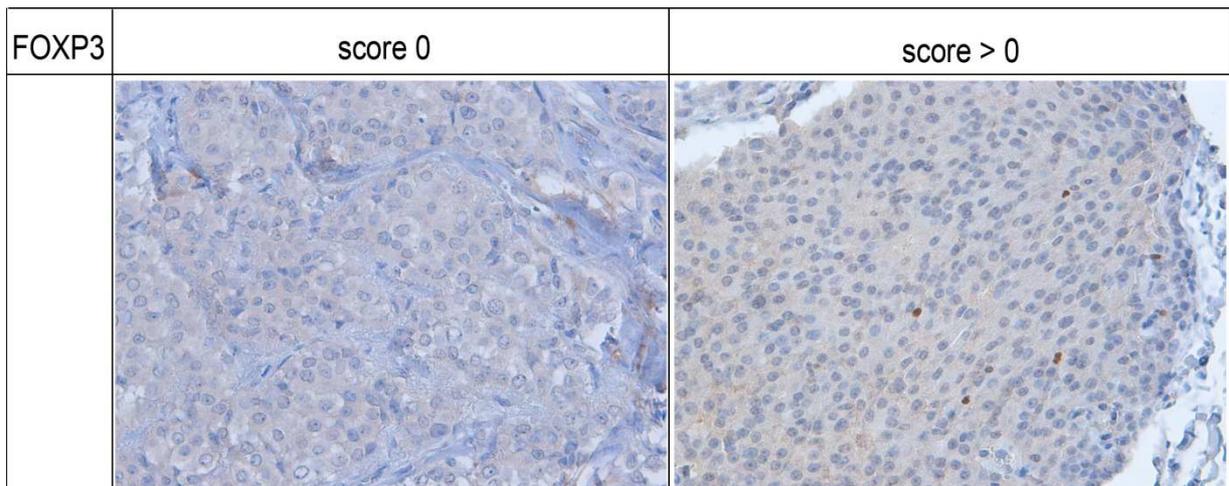


Abbildung 16: histologische Beispiele an untersuchten Mammakarzinomen für FOXP3-positive Zellen mit einer 400fachen Vergrößerung, aufgeteilt in drei Kategorien nach Anzahl positiver Zellen.

Bei der immunhistochemischen Färbung von FOXP3 wird nur zwischen positiven und negativen Tumoren differenziert. Insgesamt konnten bei der FoxP3 Färbung 266 Tumoren von 352 histologisch aus-gewertet werden. Der Mittelwert der FOXP3-positiven Zellen in den Tissue Micro Arrays beträgt 1,58 Zellen (Standardabweichung 4,7) und der Median liegt bei 0 positiven Zellen. Die maximale Anzahl gezählter FOXP3-positiver Zellen in einem Tumor beläuft sich auf 44 Zellen.

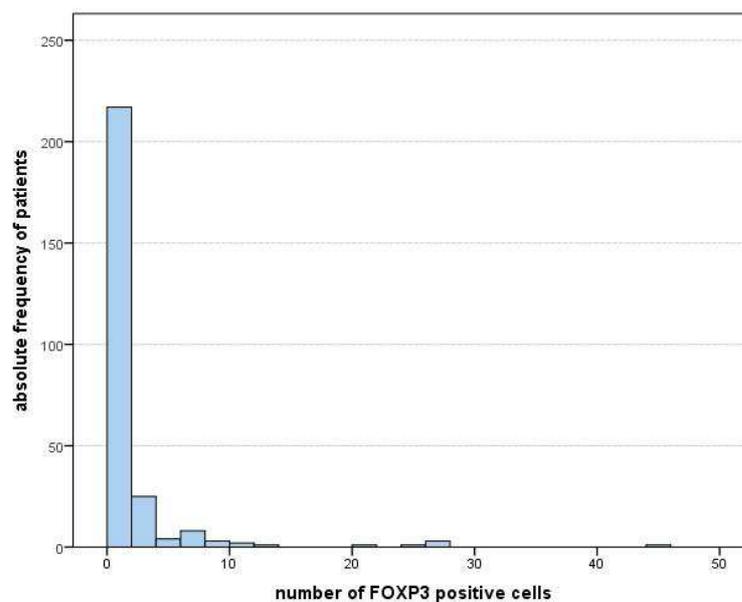


Abbildung 17: Diagramm zur Häufigkeit der Anzahl FOXP3-positiver Zellen im Tumor

3.2.5 Immunhistochemische Färbung von Twist

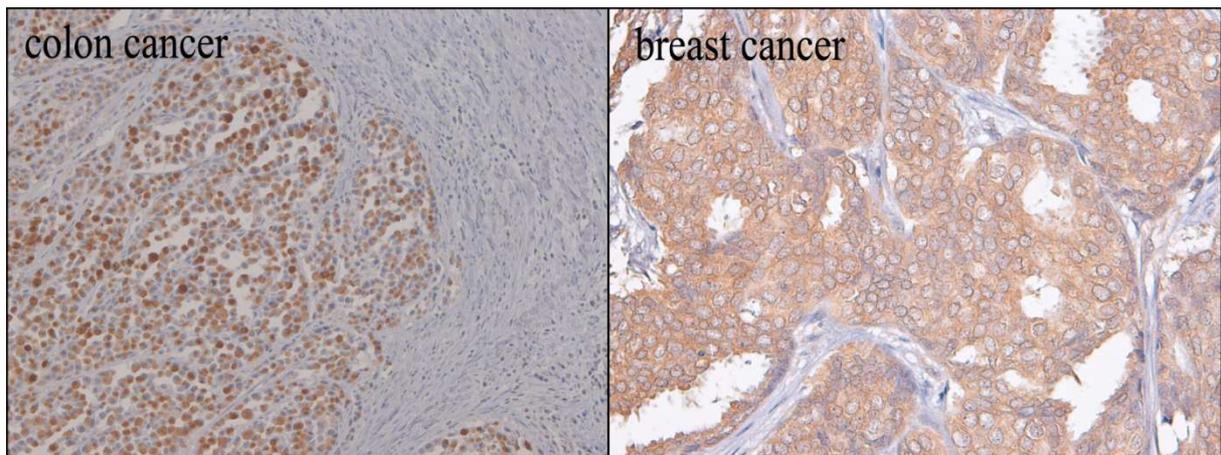


Abbildung 18: Twist-Färbungen am Colonkarzinom (200fache Vergrößerung) und am Mammakarzinom (400fache Vergrößerung)

Die oben dargestellten immunhistochemischen Bilder zeigen den Unterschied der Färberegebnisse mit demselben Twist-Antikörper bei Geweben von Colonkarzinom und Mammakarzinom. Im Colongewebe ist die Kernfärbung klar und deutlich gegenüber dem Zytoplasma der Zellen abzugrenzen. Im Kontrast hierzu ist rechts beispielhaft die Färbung von Mammakarzinom dargestellt. Hierbei lässt sich eine starke Hintergrundfärbung erkennen bei nicht vorhandener Kernfärbung, sodass die immunhistochemischen Färbungen von Twist am Mammapräparat nicht ausgewertet werden konnten aufgrund von mangelnder Qualität der Färberegebnisse. Es wurden sowohl Mamma-Ganzschnitte als auch TMAs mit dem Twist-Antikörper unter variablen Färbebedingungen gefärbt (siehe Methoden: Twist-Färbung), wobei die Färbungen allesamt keine ausreichenden authentischen Ergebnisse liefern konnten.

3.2.6 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von ZEB1 am Colon- und Mammakarzinom

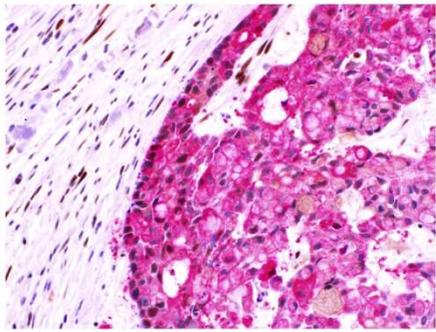
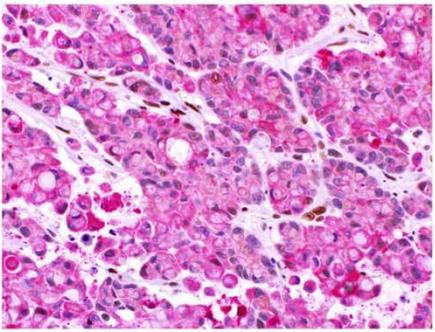
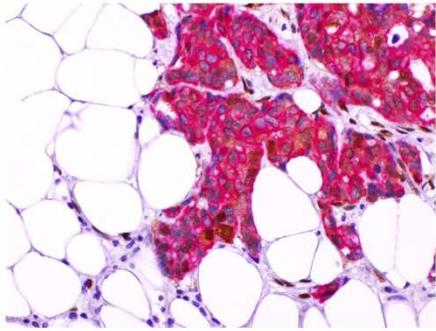
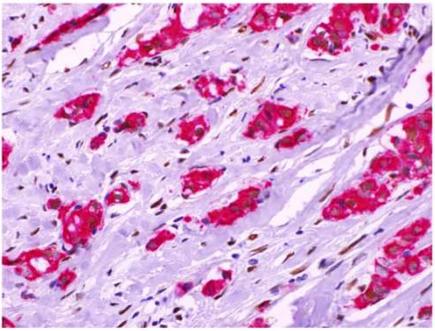
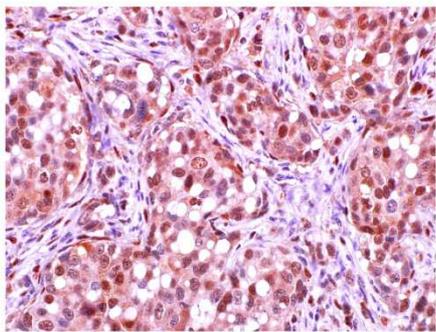
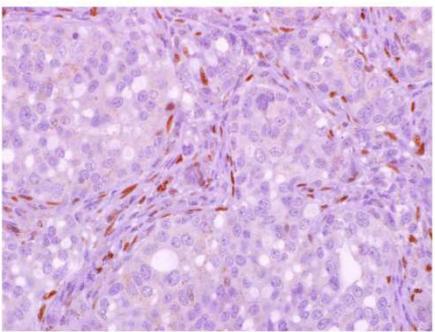
complete histological section	invasive front	1,1cm central from invasive front
colon cancer		
breast cancer		
tissue micro array	immunohistochemical staining 1	immunohistochemical staining 2
breast cancer TMA		

Abbildung 19: oben: PANCK/ZEB1-Färbungen an Ganzschnitten von Colonkarzinom und Mammakarzinom (400fache Vergrößerung) jeweils an der Invasionsfront und 1,1 cm Richtung Tumorzentrum

unten: PanCK/ ZEB1 TMA's desselben Mammakarzinoms in zwei verschiedenen Färbedurchgängen

Es wurden jeweils zur Untersuchung wenige Ganzschnitte von Colonkarzinom und Mammakarzinom mit PanCytokeratin zur Markierung epithelialen Gewebes und ZEB1-Antikörpern gefärbt. Bei den Gewebeganzschnitten lassen sich wie in den

oben exemplarisch gezeigten immunhistochemischen Bildern der Färbungen sowohl beim Colonkarzinom als auch beim Mammakarzinom deutliche Unterschiede in der Anzahl der ZEB1-positiven Zellen an der Invasionsfront gegenüber dem Gewebe weiter zentral im Tumor feststellen. Wie sich auf der Abbildung 17 oben erkennen lässt, zeigen sich deutlich mehr ZEB1-positive Zellen an der Invasionsfront, verglichen mit dem zentral gelegenen Tumorgewebe. Dieses Ergebnis stellte sich sowohl für die untersuchten Colonkarzinome als auch für die Mammakarzinome heraus.

Bei den TMAs hingegen fielen die Färbungen trotz derselben Färbebedingungen am gleichen Präparat eines Mammakarzinoms im Ergebnis gänzlich unterschiedlich aus, sodass die ZEB1 Färbungen an Mamma-TMAs technisch nicht umsetzbar waren und somit keine Aussagekraft besitzen. Aus diesem Grund wurden die Färbungen und Auszählungen an TMA's von Mammakarzinomen nicht weiter verfolgt.

3.3 Univariate Ereigniszeitanalysen zur Assoziation der Expression von Snail im invasiven Mammakarzinom mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung

Im Folgenden wurden für den EMT-assoziierten Transkriptionsfaktor Snail Ereigniszeitanalysen nach Kaplan-Meier bezüglich des Gesamtüberlebens und des ereignisfreien Überlebens erstellt.

Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der Snail-Patientenkategorien

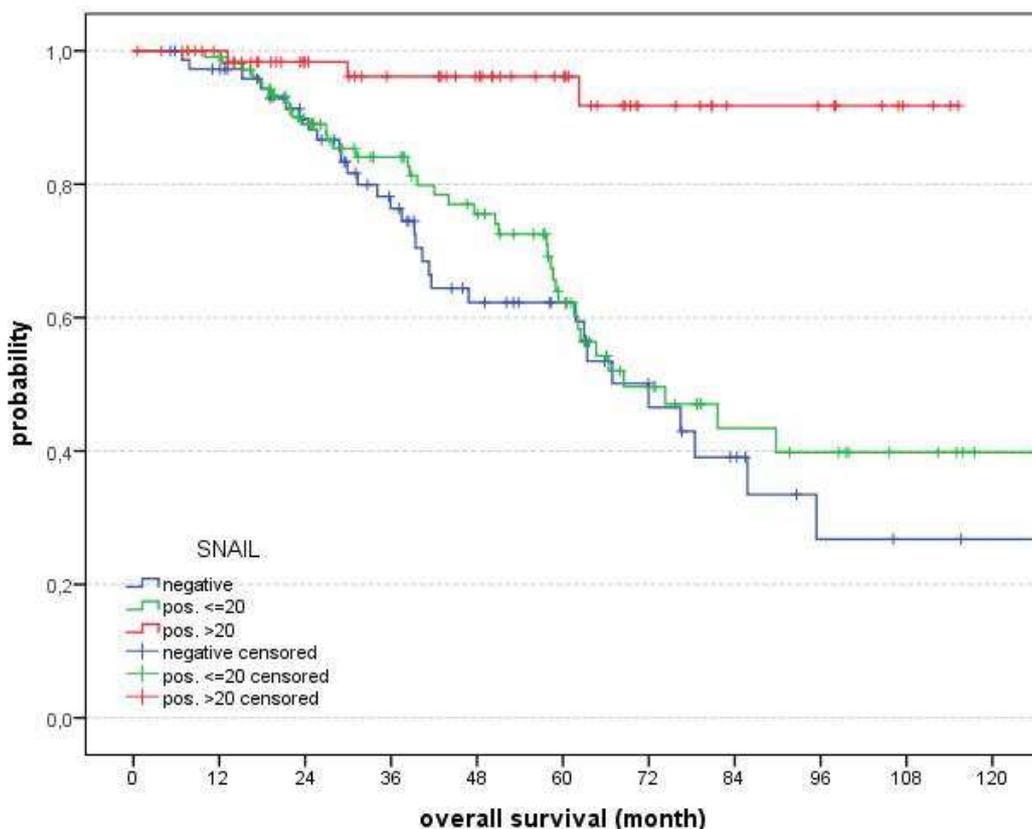


Abbildung 20: Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der Snail Patientenkategorien

In der Abbildung 20 sind die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der nach der Anzahl Snail-positiver Zellen eingeteilten Patientensubpopulationen dargestellt. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf bezüglich des Gesamtüberlebens für die Snail-negative Patientensubpopulation. Die mittlere Kategorie weist 1 - 20 Snail-positive Zellen in den untersuchten Mammakarzinom-TMA-Proben auf und wird in grün dargestellt. Rot zeigt sich die Kurve der Patienten, in deren TMA-Tumorproben mehr als 20 Snail-positive Zellen nachgewiesen wurden.

In der Überlebenszeitanalyse von Snail konnten 251 Patienten gewertet werden. Die Zensierungen betragen 179. Die Snail-negative Patientengruppe weist ein mittleres Gesamtüberleben von 74,6 Monaten (95 %-Konfidenzintervall 61,6 - 87,5 Monate) auf. Das mittlere Gesamtüberleben der Patientengruppe mit unter 20 Snail-positiven Zellen in der Probe beträgt 84,5 Monate (73,3 -95,7 Monate) und der Patientengruppe mit über 20 Snail-positiven Zellen 109,4 Monate (102,9 -115,8 Monate).

Es stellt sich heraus, dass ein stark signifikanter Unterschied der Gruppen, eingeteilt nach ihrer Anzahl von Snail-positiven Zellen, bezüglich des Gesamtüberlebens besteht. Im Log Rank Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedene Anzahl Snail-positiver Zellen zeigt sich ein p-Wert von <0,001. In der untersuchten Patientenkohorte ergibt sich also der Zusammenhang, dass eine hohe Quantität Snail-positiver Zellen mit einem höheren Gesamtüberleben assoziiert ist.

Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der Snail-Patientenkategorien

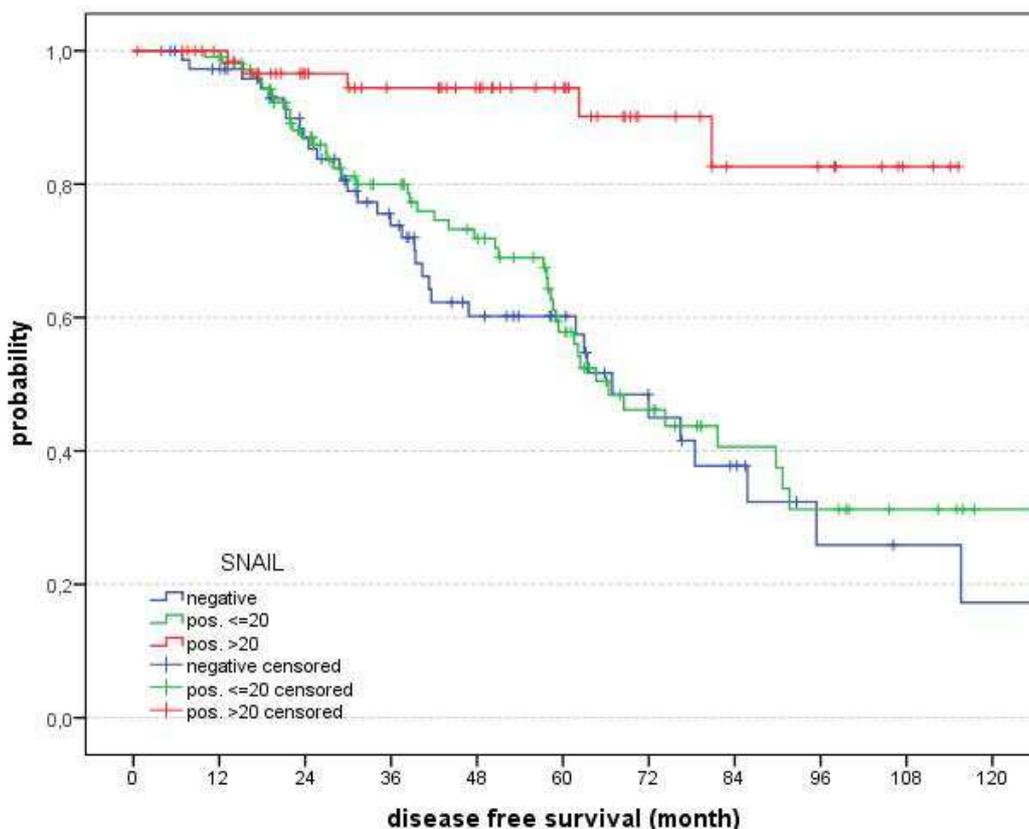


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der Snail Patientenkategorien

In der Analyse bezüglich des ereignisfreien Überlebens konnten 250 Patienten einbezogen werden, wobei 165 Fälle zensiert wurden. Das höchste mittlere ereignisfreie Überleben weist ebenso die Patientenkategorie mit der höchsten Anzahl Snail-positiver Zellen auf mit einem Wert von 105,1 Monaten (95 %-Konfidenzintervall 96,7 - 113,5 Monate). Das niedrigste mittlere ereignisfreie Überleben zeigt sich bei der Snail-negativen Gruppe mit 70,7 Monaten (59 - 82,4 Monate), und die Kategorie mit weniger als 20 Snail-positiven Zellen hat eine mittlere ereignisfreie Zeit von 78,3 Monaten (67,7 - 88,9 Monate).

Betrachtet man in der Kaplan-Meier-Kurve das ereignisfreie Leben bezüglich der drei quantitativen Snail-Patientensubpopulationen, so ergibt sich ein ähnliches Bild wie zuvor beim Gesamtüberleben. Die Patientengruppe, deren Tumor-TMA-Proben mehr als 20 positive Zellen aufweisen, zeigt ein deutlich höheres ereignisfreies Überleben als die Gruppen mit weniger oder gar keinen Snail-positiven Zellen. Auch hier wird das Signifikanzniveau von 5 % eingehalten mit einem p-Wert $<0,001$ im Lok Rank Test.

3.4 Univariate Ereigniszeitanalysen zur Assoziation der Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten im invasiven Mamma- karzinom mit der Prognose der Erkrankung

Ebenso wie für den EMT-assoziierten Transkriptionsfaktor Snail sind nachfolgend auch für die Quantität der spezifischen Zellmarker der TIL Ereigniszeitanalysen jeweils in Bezug auf das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben dargestellt.

3.4.1 CD3-positive Zellen im Tumor

Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der CD3-Patientenkategorien

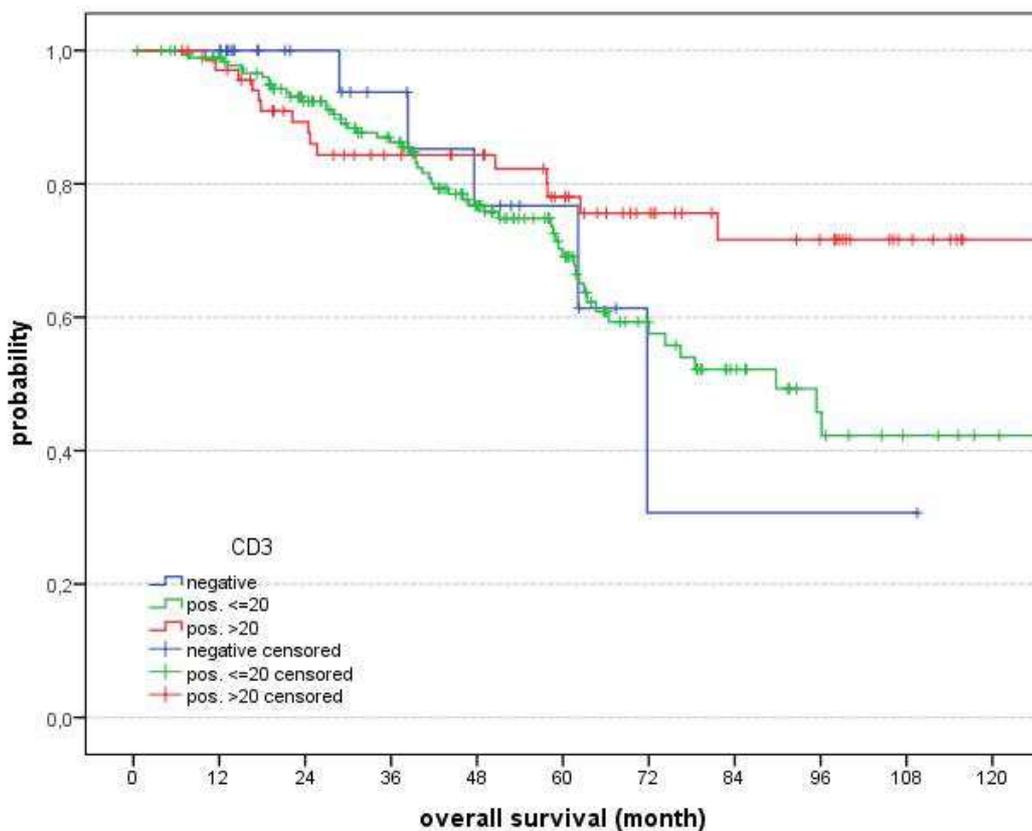


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der Patientenkategorien in Abhängigkeit der Quantität der CD3-positiven Zellen in der TMA-Probe

Die Graphik zeigt eine Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier für die jeweiligen Patientenkategorien, die eingeteilt sind nach Anzahl der CD3-positiven Zellen in den untersuchten Mammakarzinom TMA's. Auf der X-Achse ist das Gesamtüberleben in Monaten aufgetragen sowie auf der Y-Achse in Abhängigkeit das relative Gesamtüberleben. Die blaue Kurve zeigt den Verlauf der Patientensubpopulation, deren Tumorproben CD3 negativ sind. Die grüne Kurve stellt den Verlauf für diejenige Patientensubpopulation dar, deren Tumorproben insgesamt unter 20 CD3-positive Zellen aufgewiesen, und die rote Kurve zeigt letztlich den Verlauf der Patientenkategorie, bei der mehr als 20 CD3-positive Zellen in den TMA-Proben nachgewiesen werden konnten.

Insgesamt konnten Daten von 283 Patientinnen in die Ereigniszeitanalyse von CD3 eingeschlossen werden, wovon in der Follow-up-Zeit 208 Zensierungen auftraten. Für die CD3-negative Patientengruppe wurde eine mittlere Überlebenszeit von 74,3 Monaten ermittelt (95 %-Konfidenzintervall 53,5 – 95 Monate). Für die Patientengruppe mit unter 20 CD3-positiven Zellen in den Tumorproben wird die mittlere Überlebenszeit mit 90,1 Monaten angegeben (80,9 - 99,4 Monate), und die Patientengruppe mit über 20 CD3-positiven Zellen im Tumor zeigt die höchste mittlere Überlebenszeit mit 107,9 Monaten (96 - 119,8 Monate).

Auch wenn deskriptiv die Tendenz besteht, dass das Gesamtüberleben der Patientinnen mit Mammatumoren, deren CD3-Gehalt höher als 20 Zellen pro TMA-Probe ist (rote Kurve), am höchsten ausfällt, liegt der p-Wert jedoch bei 0,129, sodass der Unterschied der Subpopulationen bezüglich des Gesamtüberlebens nicht signifikant ist.

Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der CD3-Patientenkategorien

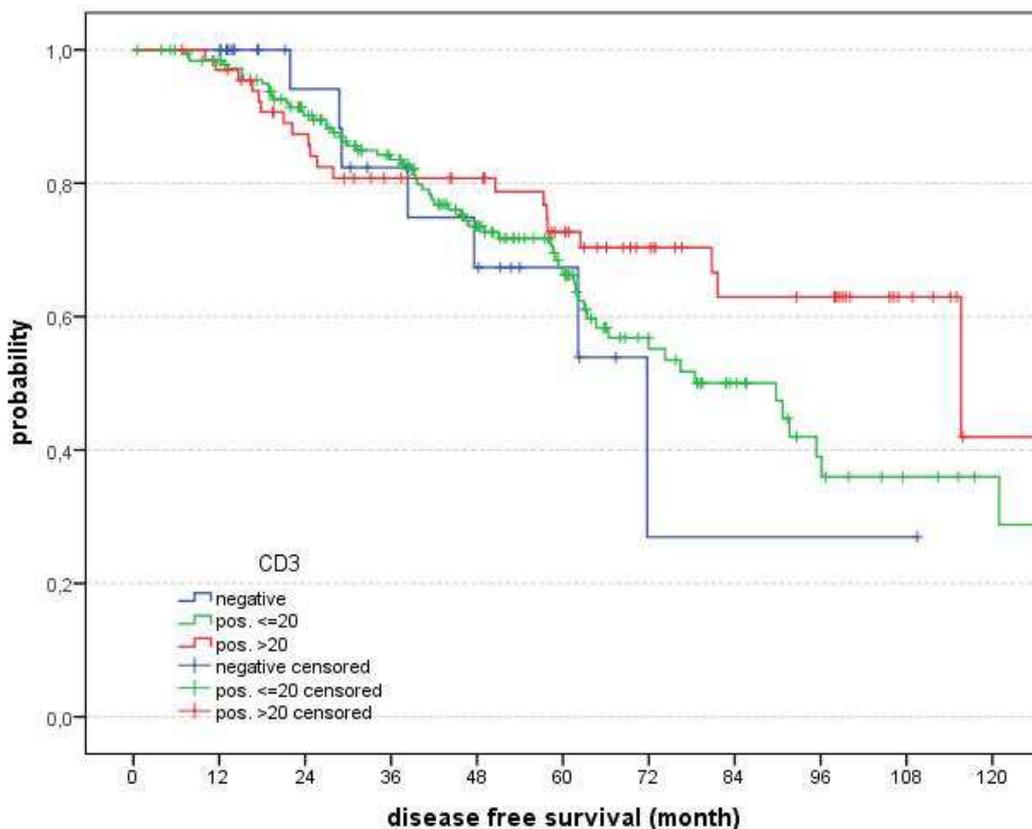


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der CD3 Patientenkategorien

Die oben abgebildeten Kaplan-Meier-Kurven betrachten das ereignisfreie Überleben der drei verschiedenen Patientenkategorien in Abhängigkeit von der CD3-Zellquantität im Tumor. Als Ereignis werden für diese Analyse sowie auch für die folgenden in den Untersuchungen nachgewiesene Rezidive, Metastasen oder der Tod, der auf das Mammakarzinom zurückzuführen ist, gewertet. Die Kurven der Patientenkategorien sind farblich gekennzeichnet wie in Abbildung 18.

Hier konnten 280 Patientendaten gewertet werden, wobei 187 Zensierungen auftraten. Die mittlere ereignisfreie Zeit für die CD3-negative Gruppe beträgt 68,4 Monate (95 %-Konfidenzintervall 48,6 - 88,2 Monate). Für die Patientengruppe mit unter 20 positiven Zellen ergibt sich eine mittlere ereignisfreie Zeit von 83,4 Monaten (74,7 - 92,2 Monate), und für die Gruppe mit über 20 CD3-positiven Zellen beträgt diese Zeit 96,7 Monate (83,2 - 110,2 Monate).

Auch hier zeigt sich augenscheinlich der Verlauf bezüglich des ereignisfreien Überlebens für die Subpopulation am günstigen, deren Tumoren mehr als 20 CD3-

positive Zellen in der TMA-Probe aufweisen. Dies wird vor allem ab einem Follow-up von 60 Monaten deutlich. Statistisch kann jedoch auch hier kein signifikanter Unterschied bezüglich des ereignisfreien Überlebens der CD3-Subpopulationen nachgewiesen werden (p-Wert 0,219).

3.4.2 CD8-positive Zellen im Tumor

Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der CD8-Patientenkategorien

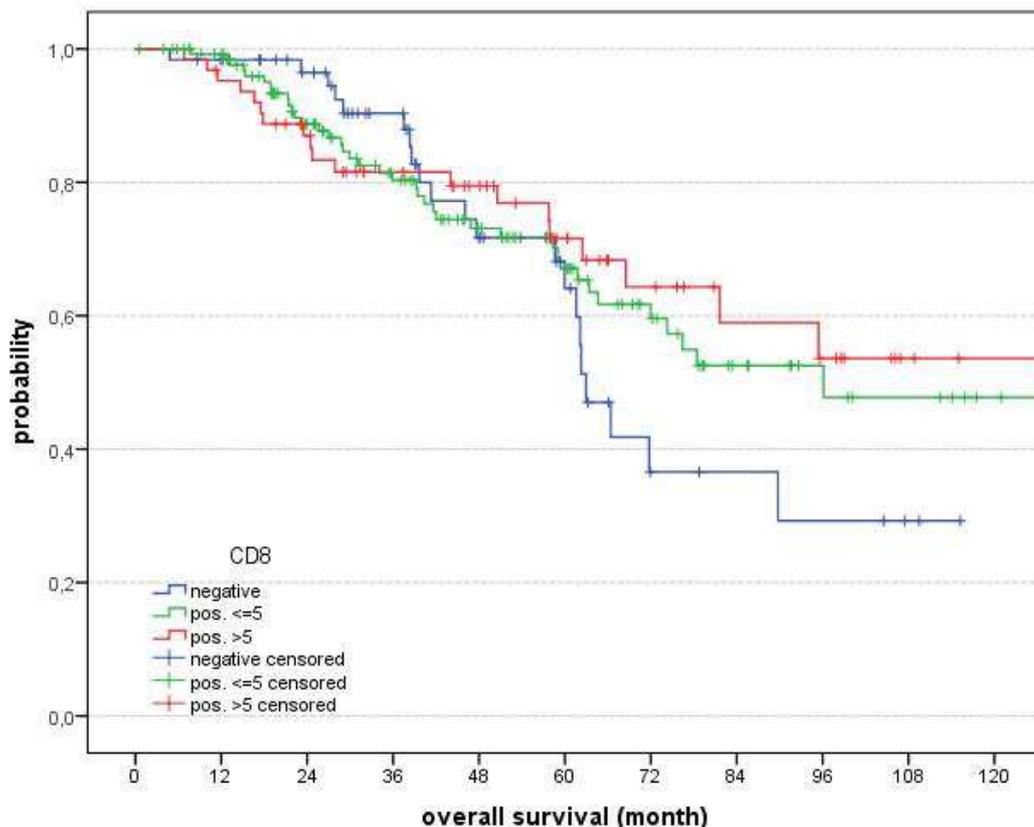


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben der Patientenkategorien in Abhängigkeit der Quantität der CD8-positiven Zellen in der TMA-Probe

Ebenso wie für die Patienteneinteilungen nach Quantität der CD3-positiven Zellen im Tumor wurde auch für die CD8-Zell-Patientenkategorien eine Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier erstellt. In der blauen Kurve ist der Verlauf für die Patientensubpopulation aufgetragen, deren TMA-Tumorprobe CD8-negativ ist. Die grüne Kurve zeigt den Verlauf für die Patienten, deren TMA-Proben zwischen 1 und 5 CD8-positiven Zellen aufweisen, und die rote Kurve stellt den Verlauf für die Subpopulation dar, deren Tumor-TMA-Probe mehr als 5 CD8-positive Zellen zählt.

259 Patienten flossen in die Analyse ein. Es gab 180 Zensierungen. Die CD8-negative Patientengruppe weist ein mittleres Gesamtüberleben von 72,6 Monaten auf (95 %-Konfidenzintervall 61,2 – 84 Monate). Die mittlere Patientenkategorie mit unter 5 CD8-positiven Zellen im Tumor kommt auf ein mittleres Gesamtüberleben von 89,8 Monaten (79,3 - 100,3 Monate) und die Gruppe mit über 5 CD8-positiven Zellen in der TMA-Probe zeigt eine mittlere Überlebensrate von 95,2 Monaten (81 - 109,4 Monate)

Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der CD8-Patientensubpopulationen. Der p-Wert beträgt 0,546.

Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der CD8-Patientenkategorien

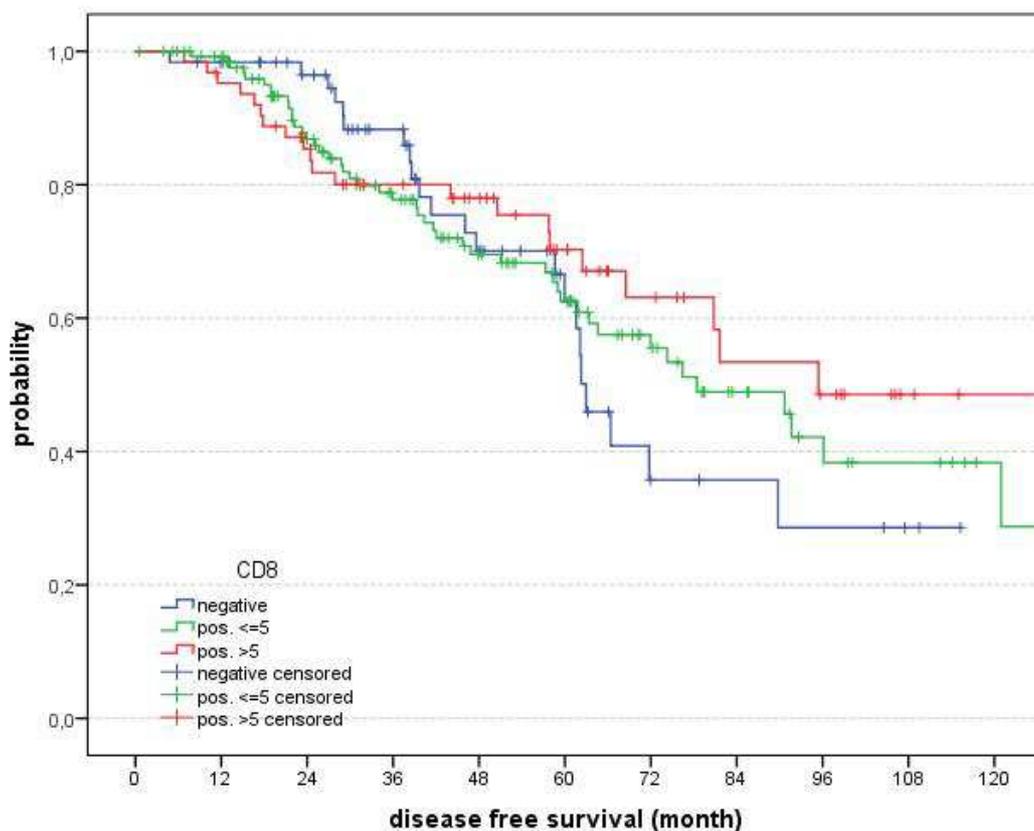


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der CD8 Patientenkategorien

In der Abbildung 25 wird das ereignisfreie Überleben bezüglich der CD8-Tumorpositivität betrachtet. Die Einteilung der CD8-Subpopulationen entspricht der oben genannten.

Insgesamt wurden 257 Patienten gewertet. Die Analyse weist 166 Zensierungen auf. Die mittlere ereignisfreie Zeit der CD8-negativen Patientengruppe beträgt 71,6 Monate (95 %-Konfidenzintervall 60,2 - 82,9 Monate). Die Patientenkategorie mit unter 5 CD8-positiven Zellen zeigt eine mittlere ereignisfreie Zeit von 81,5 Monaten (71,7 - 91,4 Monate) und die Patientengruppe mit über 5 CD8-positiven Zellen weist eine mittlere ereignisfreie Zeit von 91,6 Monaten (77,4 - 105,8 Monate) auf.

Der Verlauf der Kurven bezüglich des ereignisfreien Überlebens ähnelt dem Verlauf der Kurven in Bezug auf das Gesamtüberleben. Auch hier kann kein statistisch signifikanter Unterschied im ereignisfreien Überleben (Signifikanzniveau 5 %) zwischen den Patientensubpopulationen festgestellt werden. Der p-Wert im Lok Rank Test beläuft sich in diesem Fall ebenso auf 0,546.

3.4.3 FOXP3-positive Zellen im Tumor

Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der FOXP3-Patientenkategorien

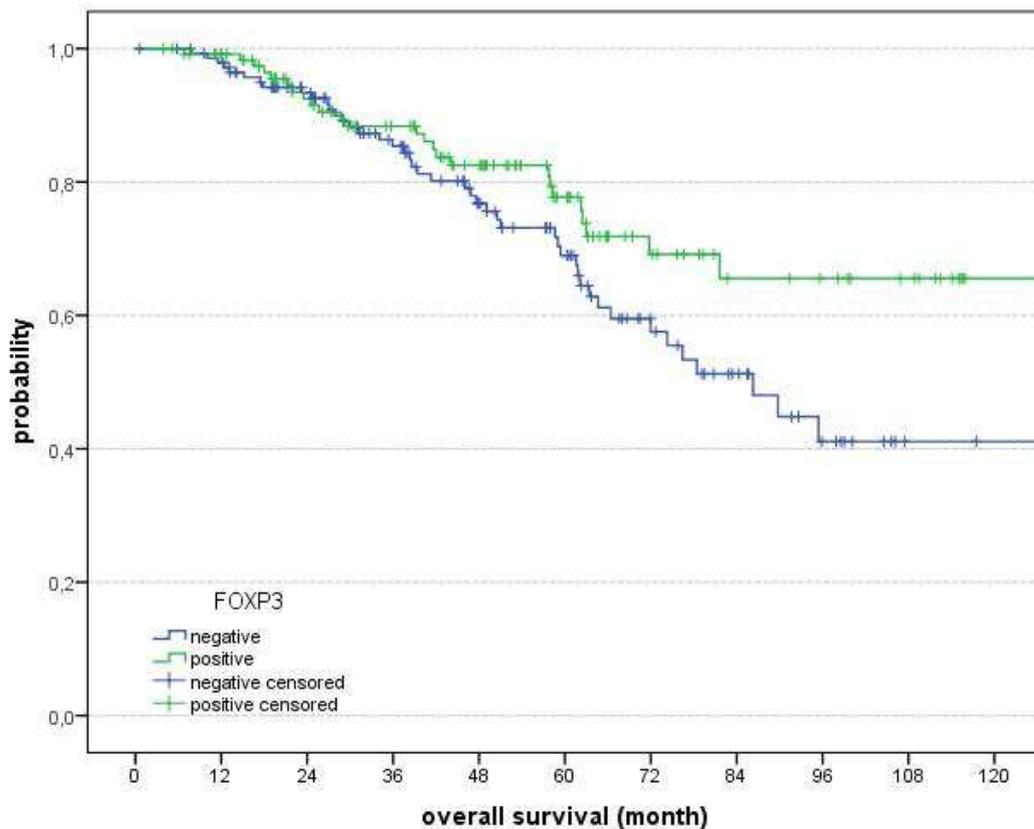


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben der Patientenkategorien in Abhängigkeit der Quantität der FOXP3-positiven Zellen in der TMA-Probe

Die Graphik zeigt die Kaplan-Meier-Kurven im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patientensubpopulationen in Bezug auf die FOXP3-Positivität. In diesem Fall wird nur zwischen FOXP3-Negativität (blaue Kurve) und FOXP3-Positivität (grüne Kurve) differenziert.

In die Gesamtüberlebenszeitanalyse von FOXP3 wurden 266 Patienten einbezogen. Es traten 196 Zensierungen auf. Das mittlere Gesamtüberleben von FOXP3-negativen Patienten in der Kohorte beträgt 88,1 Monate (95 %-Konfidenzintervall 78,2 - 98,1 Monate) und das mittlere Gesamtüberleben von FOXP3-positiven Patienten dieser Kohorte beträgt 103,1 Monate (93,8 – 114 Monate).

Im Ergebnis zeigt sich optisch in der Abbildung 22 ein klarer Unterschied zwischen den beiden FOXP3-Patientensubpopulationen, bezogen auf das Gesamtüberleben. Statistisch reicht das Ergebnis mit einem p-Wert von 0,057 nahezu an das

Signifikanzniveau von 5 % heran und zeigt somit einen statistischen Trend. Man kann also annehmen, dass zwischen dem Vorhandensein von FOXP3-positiven Zellen in den untersuchten TMA-Proben der Patientenkohorte und dem klinischen Verlauf der Erkrankung ein Zusammenhang besteht. In unserer Untersuchung zeigt sich, dass Patienten mit FOXP3-positiven Tumor-TMA-Proben eine höhere Gesamtüberlebendauer aufweisen als Patienten, deren Tumoren FOXP3 negativ sind.

Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der FOXP3-Patientenkategorien

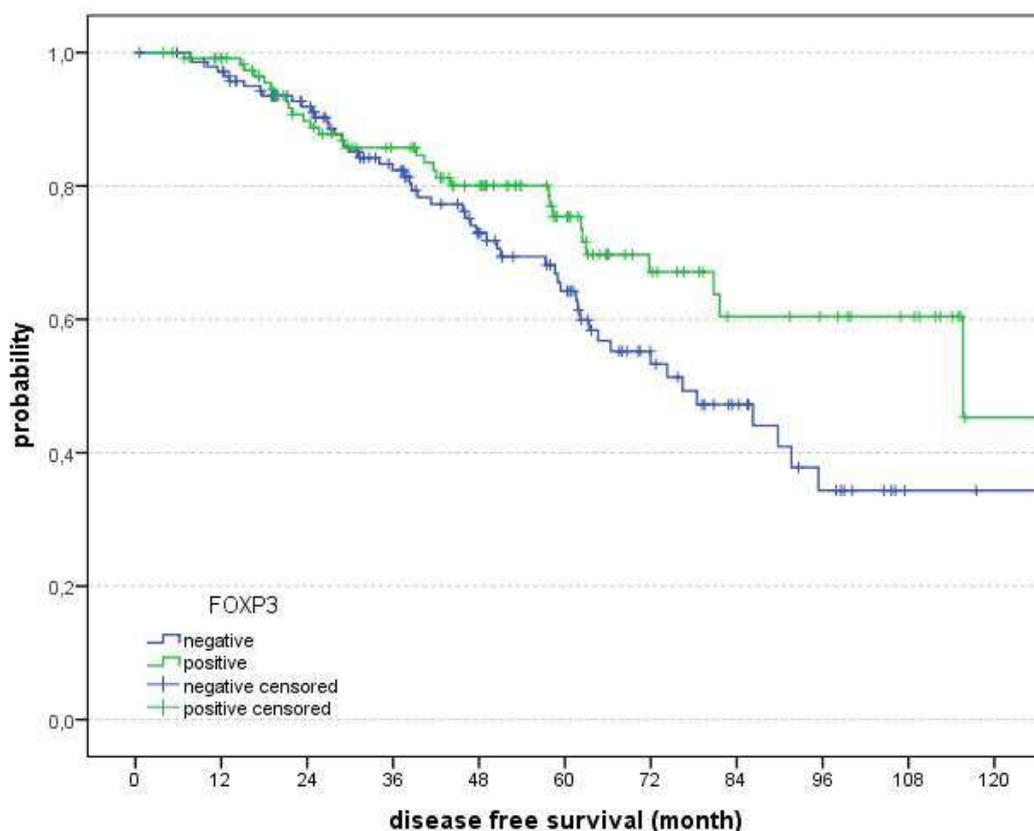


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der FOXP3 Patientenkategorien

Die Kaplan-Meier-Kurven für das ereignisfreie Überleben der FOXP3-Patientenkategorien sind oben dargestellt. Die Einteilung der Subpopulationen entspricht wie im Vorigen der Negativität und Positivität der Tumor-Proben für FOXP3.

Insgesamt konnten 284 Patientendaten einbezogen werden. Es gab in dieser Analyse 181 Zensierungen. Die FOXP3-negative Gruppe zeigt ein mittleres ereignisfreies

Überleben von 82,6 Monaten (95 %-Konfidenzintervall 73 - 92,3 Monate), und die FOXP3-positive Patientengruppe hat ein mittleres ereignisfreies Überleben von 95,4 Monaten (85 - 105,9 Monate).

Auch hier zeigt sich eine deutliche Differenz der beiden Kurven in ihrem Verlauf. Patienten aus unserer Kohorte, deren Tumoren in den untersuchten Proben FOXP3-positiv sind, zeigen auch hier ein höheres ereignisfreies Überleben als Patienten, deren Tumorproben negativ sind. Dieses beobachtete Ergebnis ergibt sich auch mit einem p-Wert im Lok Rank Test von 0,055 und zeigt somit einen statistischen Trend.

Die Ereigniszeitanalysen zur Untersuchung von FOXP3-Zellen im Mammakarzinom zeigen also, dass Patienten unserer Kohorte mit FOXP3-positiven Tumor-TMA-Proben einen insgesamt besseren klinischen Verlauf aufweisen als Patienten, deren Tumoren FOXP3-negativ sind.

3.5 Multivariate Überlebenszeitanalysen von FOXP3 sowie Snail im Cox-Regressionsmodell mit der TNM-Klassifikation

In einem weiteren Schritt wurden die untersuchten Marker, die in der univariaten Analyse signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen im Gesamtüberleben bzw. ereignisfreien Überleben zeigten ($p \leq 0,05$), in jeweils einer multivariaten cox-Regression für das Gesamtüberleben mit den Einflussgrößen Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Metastasenstatus auf ihre unabhängige Aussagekraft über die Prognose analysiert.

Cox-Regression von Snail mit TNM für das Gesamtüberleben

Die Informationen von 233 Patientinnen flossen in die multivariate Analyse des Gesamtüberlebens mit Snail und T,N,M ein. 56 Patientinnen verstarben innerhalb der Nachbeobachtungszeit.

Die Merkmale Snail über 20 positive Zellen (p -Wert $< 0,001$, N-Status positiv (p -Wert = 0,005) sowie M-Status positiv (p -Wert $< 0,001$) zeigten in dieser Konstellation im cox-Regressionsmodell signifikante Unterschiede im Gesamtüberleben gegenüber dem jeweils negativen Status. Für die Merkmale Snail unter 20 positive

Zellen sowie das T-Stadium konnte in dieser Zusammensetzung der Einflussfaktoren kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

In der Tabelle 5 sind die Daten der cox-Regression von Snail mit T,N,M aufgeführt.

Tabelle 5: cox-Regression von Snail und T,N,M für das Gesamtüberleben

	Regressions- koeffizient B	δ	Hazard Ratio exp (B)	95%- Konfidenzintervall exp (B)	Signifikanz (p-Wert)
Snail <= 20	-0,27	0,30	0,76	0,43-1,37	0,365
Snail > 20	-2,71	0,75	0,07	0,02-0,29	< 0,001
T2	0,16	0,32	1,17	0,62-2,19	0,625
T3&4	0,50	0,39	1,65	0,77-3,50	0,197
N- Status positiv	0,89	0,32	2,44	1,30-4,55	0,005
M- Status positiv	1,79	0,47	6,01	2,37-15,24	< 0,001

Zur Hazard Ratio der einzelnen Prädiktoren Snail, T, N und M wurde wie in der vorigen Konstellation mit FoxP3 ein Diagramm angefertigt. Ein positiver N- sowie M-Status wirkt sich deutlich negativ auf das Gesamtüberleben der untersuchten Patientenkohorte aus. Im Gegensatz dazu wirkt sich das Merkmal Snail > 20 positive Zellen im Tumorgewebe mit einer Hazard Ratio von 0,07 prognostisch stark positiv auf die Überlebenszeit der untersuchten Patientenkohorte aus. In diesem Modell haben unsere Patientinnen mit negativem Snail-Status ein 15fach erhöhtes Risiko gegenüber der Gruppe mit über 20 Snail-positiven Zellen, an dem diagnostizierten invasiven Mammakarzinom zu versterben.

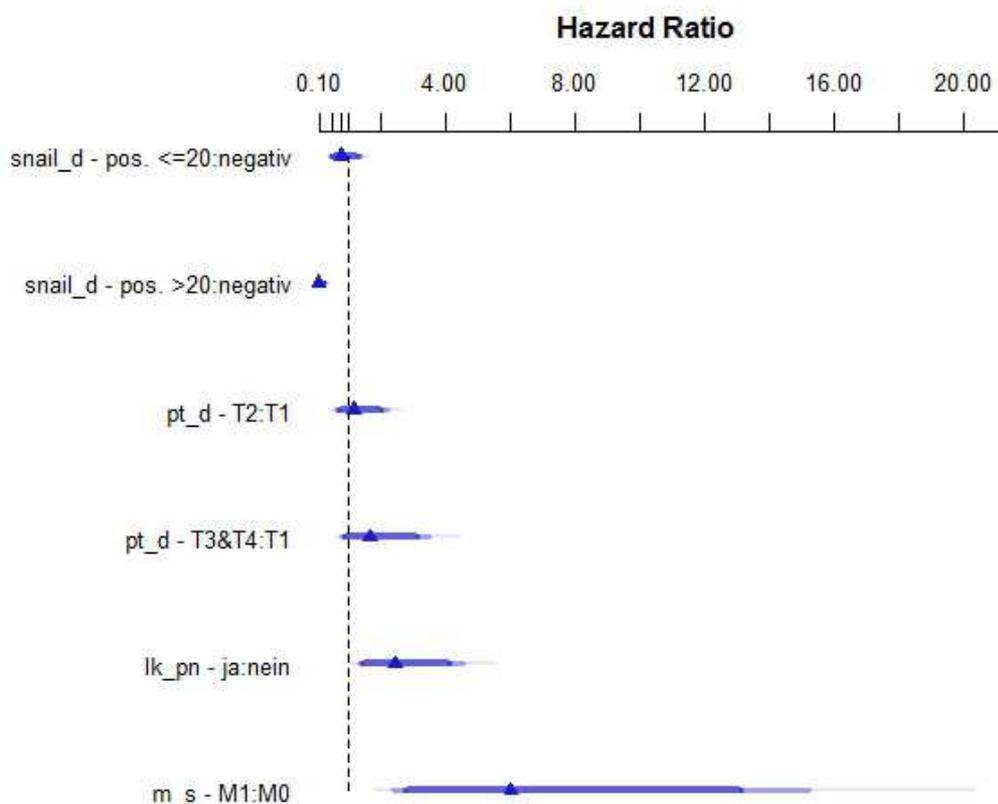


Abbildung 28: Diagramm zur Hazard Ratio der Prädiktoren Snail, T, N, M der Patientenkohorte bezüglich des Gesamtüberlebens

(Prädiktoren: Snail >20 Zellen positiv/<=20 Zellen positiv/negativ; T1/2/3&4; LK-Befall ja/nein; Metastasen ja/nein)

Cox-Regression von FOXP3 mit TNM für das Gesamtüberleben

In die multivariate Analyse des Gesamtüberlebens bezüglich FOXP3 mit T,N,M konnten insgesamt 247 Patientinnen eingeschlossen werden, von denen innerhalb der Follow-up-Zeit 53 Patientinnen verstorben sind.

Sowohl das T-Stadium (T3 und 4 gegenüber T1) mit einem p-Wert von 0,001 sowie Lymphknotenstatus (N) mit einem p-Wert von 0,007 und Metastasenstatus (M) mit einem p-Wert von 0,001 als auch FOXP3 ($p = 0,007$) zeigten in der cox-Regression einen unabhängigen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben unserer Patientenkohorte. Lediglich für das T2-Stadium gegenüber dem T1-Stadium konnte in unserer Kohorte für das Gesamtüberleben kein signifikanter Einfluss nachgewiesen werden ($p = 0,016$).

Die Tabelle 6 zeigt die Daten der cox-Regression von FOXP3 mit T,N,M.

Tabelle 6: cox-Regression von FOXP3 und T,N,M für das Gesamtüberleben

	Regressions- koeffizient B	δ	Hazard Ratio exp (B)	95%- Konfidenzintervall exp (B)	Signifikanz (p-Wert)
FOXP3	-0,82	0,31	0,44	0,24-0,80	0,008
T2	0,77	0,32	2,17	1,15-4,07	0,016
T3&4	1,33	0,42	3,80	1,67-8,62	0,001
N- Status positiv	0,88	0,33	2,42	1,27-4,61	0,007
	Regressions- koeffizient B	δ	Hazard Ratio exp (B)	95%- Konfidenzintervall exp (B)	Signifikanz (p-Wert)
M- Status positiv	1,44	0,44	4,21	1,76-10,04	0,001

Im Folgenden ist in einem Diagramm die Hazard Ratio (Dreieck) der jeweiligen Prädiktoren der Analyse mit Konfidenzintervall (dunkelblau) dargestellt. Ein positiver Nachweis von FOXP3 im Tumorgewebe der Patientinnen wirkt sich mit einer Hazard Ratio von 0,44 prognostisch günstig auf das Gesamtüberleben gegenüber FOXP3 negativen Patienten aus. FOXP3-negative Patienten der Kohorte haben somit im Vergleich zur FOXP3-positiven Gruppe in diesem Modell ein 2,28fach erhöhtes Risiko, an ihrem invasiven Mammakarzinom innerhalb des betrachteten Zeitraums zu versterben.

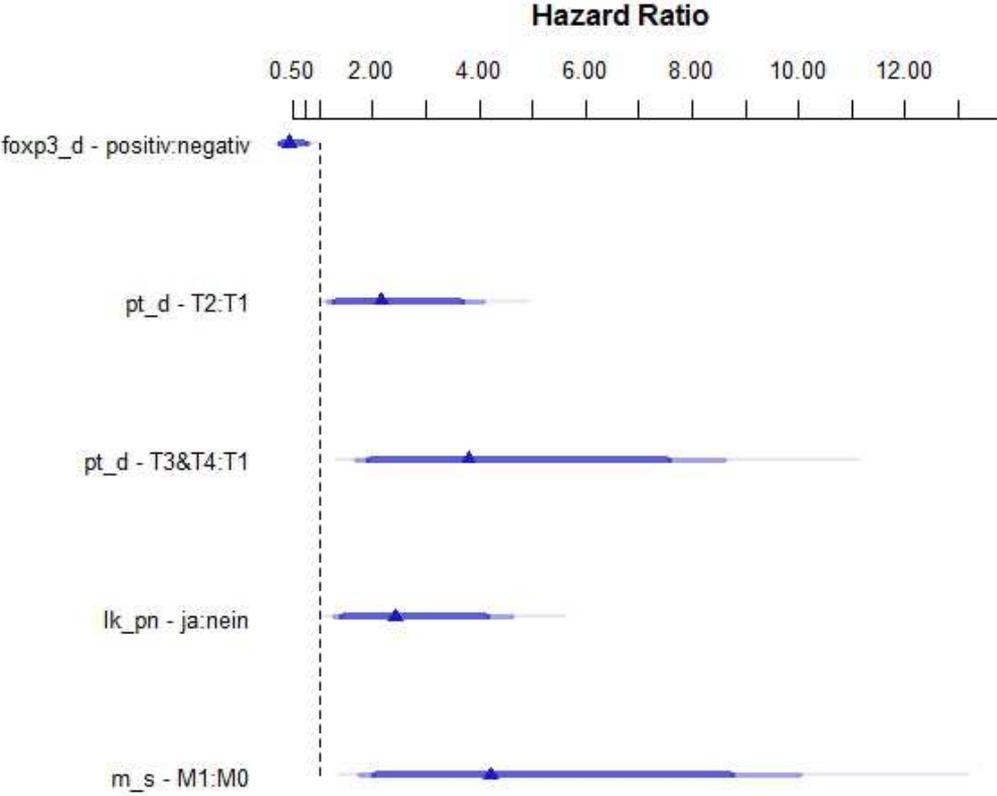


Abbildung 29: Diagramm zur Hazard Ratio der Prädiktoren FOXP3, T, N, M der Patientenkohorte bezüglich des Gesamtüberlebens

(Prädiktoren: FOXP3 positiv/negativ; T1/2/3&4; LK-Befall ja/nein; Metastasen ja/nein)

4 Diskussion

Es gilt beim invasiven duktalem Mammakarzinom wie auch bei anderen malignen Tumoren die Ausbreitung der Tumorzellen über die Organgrenzen hinaus in periphere Gebiete, die Metastasierung, als der lebenslimitierende Faktor für die Patientinnen. Dies verleiht der Forschung am Prozess der Metastatierung und den beteiligten Mechanismen eine herausragende Bedeutung. Ziel ist es, in Zukunft das Aggressivitätspotential eines Tumors vorauszusagen und in bestehende Vorgänge, die dazu führen, dass sich maligne Zellen aus ihrem Zellverband lösen, eingreifen zu können. Dieser Ansatz könnte womöglich neue Türen in der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms öffnen.

Eine Theorie zur Metastasierung stützt sich auf den Prozess der epithelialen mesenchymalen Transition, wonach Epithelzellen sich durch Anpassung und Umstrukturierung sowie den Verlust von bindenden Zell-Zell-Kontakten von ihrer Umgebung lösen und in benachbartes Bindegewebe vordringen können (Alkatout, Wiedermann et al., 2013; Mani et al., 2008; Schmalhofer et al., 2009; Thiery, 2002). Als ein bedeutender Faktor wird hierbei der Verlust des epithelspezifischen E-Cadherins und der temporären Expression von Vimentin angesehen. Snail wird als ein wesentlicher Repressor des Adhäsionsproteins E-Cadherin beschrieben (Neal et al., 2012; Vincent et al., 2009). In der Vorarbeit (Alkatout, Wiedermann et al., 2013; Wiedermann & Klapper, 2013) zu dieser Untersuchung wurde bereits das Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist und Zeb1, welche eine EMT induzieren sollen, im Mammakarzinom an Tissue Micro Arrays genauer untersucht. Es konnte in der kleinen Kohorte von 31 Patientinnen nicht gezeigt werden, dass sich die Quantität der Faktoren im invasiven Mammakarzinom im Gegensatz zu gesundem Brustdrüsengewebe und duktalem Carcinoma in situ stark unterscheiden. Auch eine Gegenüberstellung der Invasionsfront der Tumoren zum Tumorzentrum zeigte keinen Unterschied im Expressionsmuster, welcher in vorigen Studien beschrieben wurde (Drasin et al., 2011). So konnten die Thesen, dass EMT vor allem an der Invasionsfront entstehe und eine intratumorale Heterogenität der EMT-Marker im Mammakarzinom vorliege, nicht gestützt werden. Snail wurde dennoch in allen vorliegenden Tumorproben nachgewiesen und daher für eine weiterführende Untersuchung ausgewählt, um an einer größeren Patientenkohorte

zu überprüfen, inwiefern sich Snail in Tumorzellen auf das Überleben auswirkt. Um Snail als Bio-Marker für den Prozess der EMT und somit als Kennzeichen des Invasionspotentials eines Mammakarzinoms nochmals genauer zu analysieren, wurde in dieser Arbeit eine deutlich größere Gruppe von 352 Patientinnen mit invasivem duktalem Mammakarzinom eingeschlossen mit dem Ziel eine hohe statistische Aussagekraft zu erlangen. Sowohl in der univariaten Analyse als auch in der multivariaten Analyse stellte sich Snail als ein eigenständiger prognostischer Marker hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens der Patientinnen heraus. Entgegen der bisher überwiegenden Literatur zeigte die Kohorte ein insgesamt sowohl längeres krankheitsfreies – als auch Gesamtüberleben bei einem hohen Gehalt an Snail-positiven Zellen im Tumor. Diese Korrelation erwies sich als statistisch hoch signifikant und stellt Snail als unabhängigen Marker für den Krankheitsverlauf heraus.

In der Literatur sind die aktuellen Ergebnisse bezüglich der Aussagekraft und Zuverlässigkeit von EMT-Markern, insbesondere Snail, sehr heterogen verteilt. Nach dem aktuellen Stand kommt die überwiegende Mehrheit von Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass Snail wie auch Slug und Twist ein negativer Prädiktor für die Prognose der Patienten sei. In einer großen Metaanalyse mit insgesamt 3218 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten der EMT-Transkriptionsfaktoren und dem Überleben untersucht. Hier stellte sich eine starke Korrelation heraus. Die Hazard Ratio betrug in dieser Studie speziell für Snail 1,83, was bedeutet, dass Patientinnen mit Snail-positiven Tumoren das 1,83fache Risiko trugen, zu versterben (Imani, Hosseini, Cheng, Wei, & Fu, 2016). Elloul und Kollegen kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass besonders in niedrig differenzierten und lymphogen metastasierten Mamma- und Ovarialkarzinomen die Snail-mRNA Expression besonders stark ausgeprägt sei (Elloul et al., 2005). Auch andere Arbeiten wiesen eine Assoziation einer hohen Snail Expressionsrate mit einem schlechten Krankheitsverlauf wie einer erhöhten Rezidivrate nach (Drasin et al., 2011). Moody zeigte 2005 unter Verwendung eines transgenen Mausmodells, dass Snail in Her2/neu-positiven Mammakarzinom-Rezidiven in vivo spontan hochreguliert wird und somit eine EMT induziert (Moody et al., 2005). Umgekehrt gibt es Untersuchungen, bei denen eine Snail-Repression mit einem geringeren Auftreten von Metastasen und einer erhöhten

T-Zell-Reaktion in Melanom- und Blasenkarzinomen einhergeht (Kudo-Saito et al., 2009; Nomura et al., 2013). Kudo-Saito und Kollegen zeigten, dass Snail-positive Tumorzellen eine Art immunsuppressive Kaskade auslösen, wobei regulatorische T-Zellen induziert und cytotoxische T-Zellen inhibiert werden. Dies könnte ebenso bedeuten, dass eine Snail-induzierte EMT im Tumor nicht nur die Invasion und Metastasenbildung fördert, sondern auch die körpereigene Immunabwehr inhibiert (Kudo-Saito et al., 2009). Akalay und Kollegen untersuchten genau diesen Zusammenhang in ihrer Arbeit an Brustkrebszellen. Es stellte sich heraus, dass Zellen, die EMT-Marker wie Snail aufweisen, auch eine Resistenz gegenüber der CD8+-T-Zell-vermittelten Zellyse zeigen und somit eine Korrelation zwischen EMT und der Resistenz gegenüber der Tumorimmunabwehr besteht (Akalay et al., 2013). An dieser Stelle sollten weitere Studien den Zusammenhang zwischen dem Prozess der EMT und dem Auftreten der tumorinfiltrierenden Lymphozyten genauer untersuchen und evaluieren.

Kontrovers existieren in der Literatur Ergebnisse, die wie in unserer Arbeit eine Assoziation der EMT mit einem insgesamt besseren klinischen Verlauf aufzeigen. In der Studie von Tan et al. wurde bei diversen Krebsarten, unter anderem beim malignen Melanom, Bronchialkarzinom, Kolorektalkarzinom, Ovarialkarzinom sowie beim Mammakarzinom, ein EMT-Spektrum nachgewiesen. Vor allem beim Mammakarzinom und auch beim malignen Melanom wurde hier gegenüber den anderen Tumoren im starken Kontrast eine Korrelation der EMT mit einem besseren Gesamtüberleben festgestellt (Tan et al., 2014). Laut Tan könnte dieses kontroverse Ergebnis damit zusammenhängen, dass eine histologische und molekulare Heterogenität innerhalb des Mammakarzinoms die Rolle der EMT maskiere.

Andere Untersuchungen kommen nicht zu dem Schluss, dass EMT-Marker bei Tumoren insgesamt mit einem besseren oder schlechteren krankheitsfreien- sowie Gesamtüberleben assoziiert sind (Geradts et al., 2011; Makdissi et al., 2009). Logullo zeigte in diesem Zusammenhang, dass das Gesamtüberleben ausschließlich von klinischen Parametern und dem Hormonstatus abhängig sei (Logullo et al., 2010).

Obwohl in vielen Arbeiten gezeigt wurde, dass eine Snail-Expression eine EMT induzieren kann, sprechen manche Autoren allerdings auch von einer beobachteten Resistenz gegenüber der Snail-induzierten EMT in gesundem und karzinogenem

Gewebe (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Moody et al., 2005; Zhou et al., 2004). Dies könnte ein Grund sein, warum die Ergebnisse bezüglich Snail so heterogen ausfallen. Vermutlich tragen andere bisher unbekannte Faktoren dazu bei, dass Zellen eine durch Snail verursachte EMT entwickeln. Wenn man diese Einflussfaktoren ausfindig machen könnte, würde das einen immensen Schritt in der Therapie des Mammakarzinoms und anderer maligner Tumoren bedeuten, da womöglich die EMT durch Eingriffe in die molekularen Mechanismen der Tumorzellen verhindert werden und somit die Entwicklung von Rezidiven und Metastasen gebremst werden könnte.

Angesichts der stark voneinander abweichenden Ergebnisse der einzelnen Studien und unserer Arbeit lassen sich das metastatische Potential und somit die Aggressivität eines invasiven Mammakarzinoms zur Zeit nicht eindeutig durch ein Snail EMT-Scoring voraussagen. Um die Aussagekraft und Zuverlässigkeit zu erhöhen, sollten weitere EMT-Marker identifiziert werden und im Gesamtbild bezüglich ihres Auftretens und Verteilungsmusters und im Kontext des molekularen und histologischen Subtyps an größeren Patientenkohorten untersucht werden, um mit höherer Sicherheit Zellen zu detektieren, von denen Metastasen ausgehen. Um regionär bedingte Unterschiede auszuschließen, sollten zukünftige Untersuchungen auch einem multizentrischem Ansatz folgen. Zusätzlich besteht ein großer Bedarf zu untersuchen, welche Mechanismen dazu führen, dass manche Tumorzellen auf die Snail-Expression mit einer EMT reagieren und andere scheinbar resistent gegenüber dieser Verwandlung sind.

Als weiterer Bio-Marker der EMT hat sich in den letzten Jahren der Transkriptionsfaktor ZEB1 herauskristallisiert. Eine Metaanalyse von 2016 legte die Assoziation von ZEB1 mit der Prognose der Patientinnen mit Mammakarzinom dar (Imani et al., 2016). Vor allem am Colonkarzinom konnte ZEB1 immunhistochemisch nachgewiesen werden (Schmalhofer et al., 2009). Hier zeigte sich seine Verteilung innerhalb des Tumors stark zugunsten der Invasionsfront. Auch zuvor in der Arbeit von Wiedermann wurde die Expression von ZEB1 im Mammakarzinom bereits untersucht. Allerdings konnte nur in einem Fall der untersuchten Kohorte eine Zeb1-Expression dokumentiert werden (Alkatout, Wiedermann et al., 2013; Wiedermann & Klapper, 2013). In unseren histologischen Ergebnissen an Ganzschnitten konnte ZEB1 beispielhaft sowohl am Colonkarzinom als auch am Mammakarzinom positiv

getestet werden und es zeigten sich deutliche Unterschiede innerhalb des Tumors. Es ist zu erkennen, dass auch am Mammakarzinom die Positivität von ZEB1 an der Invasionsfront stärker vertreten ist als im Tumorzentrum, welche auf ein stärkeres EMT-Geschehen am Tumorrand hindeutet. Das Scoring an TMA's gelang hier jedoch nicht mit ausreichender Zuverlässigkeit der Färbeergebnisse aufgrund von divergierenden Ergebnissen bei der Reproduktion der Färbung an denselben Stanzen eines Tumors sowie der Materialbeständigkeit der TMAs, sodass an dieser Stelle weitere Arbeiten an größeren Kohorten mit alternativen und vor allem schonenderen Färbemethoden anknüpfen sollten, um diese Tendenz zu überprüfen. Gegebenenfalls sollte diese Färbung weiterführend an Ganzschnitten durchgeführt werden, da die TMAs hochempfindlich sind und sich beim Färben mit erhöhtem Materialanspruch vom Träger ablösen. Desweiteren muss man die Spezifität und Zuverlässigkeit für ZEB1 in Mammakarzinomzellen des verwendeten Färbeantikörpers in Frage stellen, da die Ergebnisse bei demselben Tumor stark variierten.

Es wird diskutiert, dass EMT mit tumorinfiltrierende Lymphozyten kausal in Zusammenhang stehen. Der Prozess der EMT trägt laut einiger Studien zur Immunsuppression und Inhibition der TIL bei, welcher somit auch indirekt zum Tumorwachstum und –ausbreitung führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von EMT mit einer Verhinderung der Induktion von FOXP3+ regulatorischen T-Zellen einhergeht und Snail+ Tumorzellen womöglich mit einer Inhibition der CD8+ T-Zellen in Zusammenhang steht (Baritaki & Bonavida, 2010; Kudo-Saito et al., 2009; Ohshio et al., 2013). Dieser Zusammenhang sollte auch auf molekularbiologischer Ebene weiter untersucht werden, um die Signalwege besser zu verstehen.

Die Verteilung und Aufgabe der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in der Entstehung und Ausbreitung eines malignen Tumors ist Teil der gegenwärtigen Forschung. Vor allem CD3+, CD8+ -T-Zellen sowie Makrophagen scheinen beim Mammakarzinom in der körpereigenen Tumorabwehr eine entscheidende Rolle zu spielen (Zhang et al., 1998). In der Vorarbeit (Wiedermann & Klapper, 2013) wurden bereits Tumorproben des invasiven Mammakarzinoms auf die Existenz und das Verteilungsmuster

tumorinfiltrierender Lymphozyten untersucht. Es konnten sowohl CD3+, CD8+ sowie auch FOXP3+ Immnzellen nachgewiesen werden, die jedoch keinen signifikanten Unterschied in ihrer Verteilung bezüglich der Invasionsfront und des Tumorzentrums aufwiesen. In der Literatur gibt es eindeutige Hinweise, dass das Auftreten von Immnzellen im Tumorareal mit der Prognose assoziiert ist (Jiang et al., 2015; S. Liu et al., 2012; Miyashita et al., 2015; Salgado et al., 2015; Stanton & Disis, 2016).

Betrachtet man bezüglich der TIL zuerst den Gehalt an CD3+- und CD8+-Zellen in den analysierten TMAs, ist im Ergebnis die Tendenz zu erkennen, dass sowohl eine erhöhte CD3+- als auch CD8+Zellzahl mit einem höheren krankheitsfreien- sowie Gesamtüberleben in der untersuchten Kohorte einhergeht. Beide Marker erreichen jedoch nicht das Signifikanzniveau von 5 %. Hinsichtlich des Auftretens CD3+ und CD8+ T-Zellen in Tumorarealen beschreiben Autoren einen positiven Effekt auf das Überleben der Patienten in diversen Tumorarten wie beim Colonkarzinom und Adenokarzinom des Ösophagus, wobei Zweiteres ebenso an immunhistochemisch angefärbten TMAs untersucht wurde (Kwak et al., 2016; Noble et al., 2016). Kwak und Kollegen erstellten einen sogenannten Immunscore, der die Dichte an CD3 und CD8-positiven Zellen im Tumorzentrum sowie –peripherie aufzeigt und kamen zu dem Schluss, dass eine höhere Dichte der Immnzelltypen mit einem günstigeren Krankheitsverlauf beim fortgeschrittenen Colonkarzinom einhergeht. In diesem Zusammenhang wird von einer Art körpereigenen Immunabwehr gegen die Tumorzellen gesprochen, welche unter anderem vor allem von CD8+-Zellen ausgeht (Ali et al., 2014; S. Liu et al., 2012; Mahmoud et al., 2011). Eine neue Metaanalyse von 2903 Patientinnen zum prognostischen Wert der TIL beim Ovarialkarzinom beispielsweise, die zeigt eine eindeutige Korrelation der intraepithelialen TIL mit dem progressionsfreien-, krankheitsfreien- sowie Gesamtüberleben der Patientinnen (Li, Wang, Chen, Bai, & Lu, 2017). Auch bei Brustkrebs gibt es Analysen, die den Gehalt von CD3+- und CD8+-T-Zellen genauer in Bezug auf den Krankheitsverlauf untersuchten. Die positiven Auswirkungen von intratumoralen CD3+-Zellen auf die Prognose werden in einer Studie von Rathore und Kollegen deutlich. In der Kohorte von 127 Brustkrebspatientinnen stellt sich CD3+ als ein unabhängiger positiver prognostischer Marker beim invasiv duktalem Mammakarzinom heraus (Rathore et al., 2013). In einer weiteren großen Metaanalyse von Mao wurden 25 Studien mit insgesamt 22.964 Patientinnen einbezogen und der Zusammenhang zwischen TIL und der

Prognose der Patientinnen untersucht. Es zeigte sich, dass TIL insgesamt keine universellen prognostischen Marker für ein günstigeres Überleben beim Mammakarzinom darstellten, sondern viel mehr bei triple-negativen Mammakarzinomen statistisch signifikante Assoziationen zu beobachten waren (Mao et al., 2016). Diesen Zusammenhang beschrieben auch andere Autoren. Es konnte in einer retrospektiven Analyse von lymphknotenpositiven Brustkrebspatientinnen mit ER/Her2neu-negativem Tumor eine reduzierte Mortalitätsrate in Abhängigkeit von stromalen und intratumoralen Lymphozyten nachgewiesen werden (Loi et al., 2013). Weitere Arbeiten bestätigen die Assoziation zwischen erhöhter T-Zellzahl und einer günstigeren Prognose bei Östrogen-negativen und triple-negativen Mammakarzinomen (Rathore et al., 2014; Shah et al., 2012; West et al., 2011). Besonders tumorinfiltrierende CD8+ zytotoxische T-Zellen wurden als starker prognostischer Marker beschrieben. In einer Studie mit insgesamt 12.439 Brustkrebspatientinnen zeigte sich auch hier in Tumorproben, die CD8+ waren, eine reduzierte Mortalitätsrate vor allem bei Östrogen-negativen und triple-negativen Tumoren allerdings auch bei Östrogen/Her2neu-positiven Tumoren (Ali et al., 2014; S. Liu et al., 2012). Es wird außerdem beschrieben, dass ein erhöhter CD8+-Zellanteil im Tumorstroma mit einem besseren Ansprechen der Patientinnen auf Chemotherapeutika wie Anthrazykline assoziiert ist (Ali et al., 2014). Dieser Ansatz könnte ebenso eine weitere Erklärung für die günstigere Prognose der Patientinnen sein. Ähnliche Beobachtungen bezüglich des Therapieansprechens machten auch weitere Kollegen (Castaneda et al., 2016; West et al., 2011). Einige Autoren kamen jedoch auch zu widersprüchlichen Ergebnissen. Eine Studie von Liu 2011 berichtet davon, dass sowohl höhere Expressionsraten von FOXP3+ als auch CD8+-Zellen im Tumor in der Patientenkohorte mit reduziertem progressionsfreien und Gesamtüberleben einherging (F. Liu et al., 2011).

Der Gehalt an FOXP3+-Zellen im Tumor korrelierte in unseren Ergebnissen stark mit dem klinischen Verlauf der Brustkrebspatientinnen. Sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse zeigte der Marker statistisch signifikante unabhängige Ergebnisse. In unserer Kohorte ist eine erhöhte Anzahl von FOXP3+-Immunzellen mit einem günstigeren Gesamtüberleben und einer reduzierten Mortalitätsrate assoziiert. Dies entspricht nicht der Mehrheit der aktuellen Ergebnisse in der Literatur, die FOXP3 mit einem negativen Krankheitsverlauf in Zusammenhang

bringt. Der Oberflächenmarker FOXP3 kennzeichnet regulatorische T-Zellen, welchen als einzige Immunzellen bisher ein negativer Effekt auf den klinischen Verlauf nachgewiesen wurde. Die Erklärung dafür könnte eine Aktivierung der regulatorischen T-Zellen durch die Tumorzellen sein, welche dazu führt, dass die körpereigene immunologische Tumorabwehr inhibiert wird und es so zu einer Tumorprogression kommen kann (Bates et al., 2006; Jiang et al., 2015; F. Liu et al., 2011; Trzonkowski et al., 2004). FOXP3+- regulatorische T-Zellen sind ebenso wie CD8+/CD3+-Zellen in verschiedenen Tumorentitäten auf ihren prognostischen Wert untersucht worden. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Rezidiven und Metastasen und dem Vorhandensein von FOXP3+-Zellen wurde zum Beispiel auch beim Lungenkarzinom nachgewiesen (Geng et al., 2015; Yan, Jiao, Zhang, Guan, & Wang, 2017). Es ist beschrieben worden, dass FOXP3+ Zellen vor allem in lymphknotenpositiven niedrig differenzierten Tumoren vorkommen (Droeser et al., 2012; Ghebeh et al., 2008). In einer großen Metaanalyse von Jiang mit insgesamt 8.277 Brustkrebspatientinnen stellte sich ebenso heraus, dass hohe Level von FOXP3+-Zellen im Tumor mit einer ungünstigeren Prognose einhergehen (Jiang et al., 2015). Obwohl viele Daten dafür sprechen, ist FOXP3 als prognostischer Marker dennoch bisher umstritten. Dies könnte auch daran liegen, dass der Einfluss von FOXP3+ regulatorischen T-Zellen je nach molekularem und histologischem Subtypen unterschiedlich stark ausfällt.

Zusammenfassend ist bei tumorinfiltrierenden Lymphozyten in unserer Arbeit wie auch in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten, die dieses Thema untersuchten, die eindeutige Tendenz zur prognostischen Assoziation zu erkennen. Jedoch muss noch genauer erforscht werden, welche spezifischen Aufgaben die verschiedenen Lymphozytenarten bei der Tumorprogression sowie -regression haben, um die Anwendung der Prognosefaktoren zu spezifizieren und zu validieren. Besonders sollten auch die verschiedenen Tumorhistotypen auf das Zusammenspiel und die unterschiedliche Aktivität der körpereigenen intratumoralen Abwehr und die Fähigkeit der tumoreigenen Unterdrückung dieser untersucht werden. Der Einfluss der EMT auf die körpereigene Tumorabwehr bedarf ebenso weiterer Untersuchungen. Die Schwankungen bzw. zum Teil starken Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen unserer Arbeit und Studien in der Literatur könnten durch die Fallauswahl begründet sein, da unsere Patientinnen aus einem Brustkrebszentrum einer Region stammen

und nicht aus mehreren Zentren verschiedener Regionen. Dennoch besitzen unsere Ergebnisse, vor allem bezüglich Snail und FOXP3 als prognostische Marker, eine hohe statistische Aussagekraft. Diese zeigt, dass es erforderlich ist, der Thematik und den Zusammenhängen weiter auf den Grund zu gehen, um die Prognose, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms weiter voran zu bringen.

Sowohl Snail als auch FOXP3 als statistisch signifikante prognostische Marker in der vorliegenden Untersuchung zeigen die starke Bedeutung von EMT sowie TIL für den Krankheitsverlauf von Brustkrebspatientinnen. Viele Studien bestätigen die Rolle der EMT in der Metastasenentstehung, die für die Patientinnen lebenslimitierend ist. Auf dem Boden der Vorarbeit (Wiedermann & Klapper, 2013) und dieser entwickelt sich die translationale Forschung bezüglich der Rolle der EMT in der Metastasenbildung weiter, um in Zukunft mit gezielt prognostischen Markern bis dato noch maskiertes aggressives Tumorwachstum an der Invasionsfront zu detektieren und spezifisch behandeln zu können. Desweiteren trägt unsere Untersuchung bezüglich der verschiedenen TIL einen entscheidenden Schritt dazu bei, die prognostische Relevanz der Immunzelltypen zu spezifizieren und ihren Zusammenhang mit der EMT zu entschlüsseln. In Zukunft könnte die Immuntherapie ein vielversprechendes Verfahren in der Brustkrebstherapie sein. Liyanage und Mitarbeiter konnten bereits 2002 zeigen, dass der Einsatz eines Treg-spezifischen Antikörpers in Mäusen zu einer immunologischen Tumorabstoßung führte (Liyanage et al., 2002). Sowohl die Förderung der körpereigenen tumorspezifischen Immunabwehr als auch die Hemmung der tumorinduzierten regulatorischen T-Zellen sind Ansätze, die diskutiert und erforscht werden (Curiel et al., 2004).

5 Zusammenfassung

Einleitung

Jährlich erkranken circa 1,7 Millionen Frauen weltweit an Brustkrebs. Das invasiv-duktales Mammakarzinom ist die häufigste Brustkrebs-Entität. Zielführend in der Tumorchirurgie ist es, eine vollständige Resektion des Tumorareals zu erreichen und dieses mit ausreichendem Sicherheitsabstand zu entfernen. Trotz R0-Resektion kommt es dennoch häufig zu anschließenden Rezidiven oder Fernmetastasierung, welche nach wie vor als lebenslimitierender Faktor gilt. Es wird angenommen, dass der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Metastasen spielt. Dabei gewinnen epitheliale Tumorzellen die Fähigkeit mesenchymale Eigenschaften anzunehmen, um sich so aus ihrem Zellverband heraus zu lösen und in die Umgebung zu migrieren. Ein Transkriptionsfaktor, der E-Cadherin herabreguliert und somit EMT induzieren soll, ist Snail. Darüber hinaus wird vermutet, dass der Prozess der EMT zur Immunsupprimierung in der Tumormikroumgebung führen und regulatorische T-Zellen induzieren kann.

Methoden

Es wurde in dieser Arbeit sowohl die Quantität der Snail-positiven Zellen als auch der verschiedenen tumorinfiltrierenden Lymphozyten und ihre Korrelation mit dem Überleben der Brustkrebspatientinnen untersucht, um zu prüfen, ob diese in Zukunft als zuverlässige prognostische Marker eingesetzt werden können. Hierfür wurde ein umfassendes Patientenkollektiv von 352 Patientinnen der Frauenklinik Kiel mit invasiv-duktalem Mammakarzinom verschiedener Stadien in der Studie analysiert, um eine Aussage über die prognostische Relevanz treffen zu können. An Tissue Micro Assays der Tumorproben wurde immunhistochemisch Snail und die TIL Oberflächenmarker FOXP3, CD3 und CD8 angefärbt. Desweiteren wurde beispielhaft ZEB1 und Twist an Ganzschnitten als zusätzliche EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren angefärbt. Anschließend folgte die Auswertung der Ergebnisse in Überlebenszeitanalysen.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass in unserer Kohorte eine starke Positivität von Snail statistisch signifikant mit einem längeren krankheitsfreien- und Gesamtüberleben einhergeht. CD3, CD8 und FOXP3-positive Zellen weisen eine Tendenz zu einem längeren Überleben auf, jedoch stellte sich in der Untersuchung nur FOXP3 als statistisch

signifikanter Marker heraus. Der Zusammenhang mit einer günstigeren Prognose und dem Vorhandensein von Snail- und FOXP3-positiven Zellen zeigte sich auch in einer multivariaten Analyse, sodass anhand unserer Ergebnisse Snail und FOXP3 als prognostische Marker eingesetzt werden können.

Diskussion

Obwohl die prognostische Bedeutung von EMT- und TIL-Markern durch viele Studien bestätigt wurde, existieren in der Literatur Diskrepanzen bezüglich der prognostischen Aussagekraft von Snail und FOXP3 als eigenständige Marker. Das invasive Verhalten eines Tumors hängt womöglich zugleich von der Heterogenität der molekularen Subtypen ab und kann zur Zeit nicht sicher allein durch lymphozytäre oder EMT-Marker eingestuft werden, obwohl diese einen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben aufzeigen. Daran anschließend sollten weitere Analysen folgen, um in Zukunft aggressives Tumorstadium spezifisch detektieren und behandeln zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Akalay, I., Janji, B., Hasmim, M., Noman, M. Z., Andre, F., De Cremoux, P., et al. (2013). Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res*, 73(8), 2418-2427.
- Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S. J., Blows, F. M., Liu, B., Shah, M., et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Annals of Oncology*, 25(8), 1536-1543.
- Alkatout, I., Kabelitz, D., Kalthoff, H., & Tiwari, S. (2008). Prowling wolves in sheep's clothing: the search for tumor stem cells. *Biol Chem*, 389(7), 799-811.
- Alkatout, I., Order, B., Klapper, W., Weigel, M. T., Jonat, W., Schaefer, F. K., et al. (2013). Surgical impact of new treatments in breast cancer. *Minerva Ginecol*, 65(4), 363-383.
- Alkatout, I., Wiedermann, M., Bauer, M., Wengers, A., Jonat, W., & Klapper, W. (2013). Transcription factors associated with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in the tumor centre and margin of invasive breast cancer. *Exp Mol Pathol*, 94(1), 168-173.
- Baritaki, S., & Bonavida, B. (2010). Viral infection and cancer: the NF-kappaB/Snail/RKIP loop regulates target cell sensitivity to apoptosis by cytotoxic lymphocytes. *Crit Rev Immunol*, 30(1), 31-46.
- Bataille, F., Rohrmeier, C., Bates, R., Weber, A., Rieder, F., Brenmoehl, J., et al. (2008). Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 14(11), 1514-1527.
- Bates, G. J., Fox, S. B., Han, C., Leek, R. D., Garcia, J. F., Harris, A. L., et al. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, 24(34), 5373-5380.

- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., et al. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*, 2(2), 84-89.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., et al. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(18), 10356-10361.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., et al. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2(2), 76-83.
- Castaneda, C. A., Mittendorf, E., Casavilca, S., Wu, Y., Castillo, M., Arboleda, P., et al. (2016). Tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *World J Clin Oncol*, 7(5), 387-394.
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9), 942-949.
- De Wever, O., Pauwels, P., De Craene, B., Sabbah, M., Emami, S., Redeuilh, G., et al. (2008). Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol*, 130(3), 481-494.
- DeNardo, D. G., & Coussens, L. M. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, 9(4), 212.
- Drasin, D. J., Robin, T. P., & Ford, H. L. (2011). Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res*, 13(6), 226.
- Droeser, R., Zlobec, I., Kilic, E., Guth, U., Heberer, M., Spagnoli, G., et al. (2012). Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC Cancer*, 12, 134.

- Eckert, M. A., Lwin, T. M., Chang, A. T., Kim, J., Danis, E., Ohno-Machado, L., et al. (2011). Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell*, 19(3), 372-386.
- Elloul, S., Elstrand, M. B., Nesland, J. M., Trope, C. G., Kvalheim, G., Goldberg, I., et al. (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*, 103(8), 1631-1643.
- Emens, L. A. (2012). Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev Anticancer Ther*, 12(12), 1597-1611.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J., Comber, H., et al. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*.
- Fu, Z., Zuo, Y., Li, D., Xu, W., Chen, H., & Zheng, S. (2013). The crosstalk: Tumor-infiltrating lymphocytes rich in regulatory T cells suppressed cancer-associated fibroblasts. *Acta Oncol*, 52(8), 1760-1770.
- Geng, Y., Shao, Y., He, W., Hu, W., Xu, Y., Chen, J., et al. (2015). Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*, 37(4), 1560-1571.
- Geradts, J., de Herreros, A. G., Su, Z., Burchette, J., Broadwater, G., & Bachelder, R. E. (2011). Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas. *Hum Pathol*, 42(8), 1125-1131.
- Ghebeh, H., Barhoush, E., Tulbah, A., Elkum, N., Al-Tweigeri, T., & Dermime, S. (2008). FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer*, 8, 57.
- Gingras, I., Azim, H. A., Jr., Ignatiadis, M., & Sotiriou, C. (2015). Immunology and breast cancer: toward a new way of understanding breast cancer and

- developing novel therapeutic strategies. *Clin Adv Hematol Oncol*, 13(6), 372-382.
- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*, 95(1), 333-339.
- Gros, A., Parkhurst, M. R., Tran, E., Pasetto, A., Robbins, P. F., Ilyas, S., et al. (2015). Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med*, 22(4), 433-438.
- Hadrup, S., Donia, M., & Thor Straten, P. (2013). Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 6(2), 123-133.
- Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*, 154(1), 8-20.
- Imani, S., Hosseinifard, H., Cheng, J., Wei, C., & Fu, J. (2016). Prognostic Value of EMT-inducing Transcription Factors (EMT-TFs) in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*, 6, 28587.
- Jiang, D., Gao, Z., Cai, Z., Wang, M., & He, J. (2015). Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3+ tumor infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*, 15(1), 727.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428.
- Kim, S. T., Jeong, H., Woo, O. H., Seo, J. H., Kim, A., Lee, E. S., et al. (2013). Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer. *Am J Clin Oncol*, 36(3), 224-231.
- Kreienberg, R., Albert, U. S., Follmann, M., Kopp, I. B., Kuhn, T., & Wackel, A. (2012). Interdisciplinary GoR level III Guidelines for the Diagnosis, Therapy and Follow-up Care of Breast Cancer“ AWMF Registry No.: 032-045OL. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 73(6), 556-583.

- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., & Kawakami, Y. (2009). Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. *Cancer Cell*, *15*(3), 195-206.
- Kwak, Y., Koh, J., Kim, D. W., Kang, S. B., Kim, W. H., & Lee, H. S. (2016). Immunoscore encompassing CD3+ and CD8+ T cell densities in distant metastasis is a robust prognostic marker for advanced colorectal cancer. *Oncotarget*, *7*(49), 81778-81790.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, *271*(5256), 1734-1736.
- Lenhard, M. (2002). Der histopathologische Bericht beim Mammakarzinom. from <http://www.german-breast-cancer-aid.com/movie/download/histopathologie.pdf>
- Li, J., Wang, J., Chen, R., Bai, Y., & Lu, X. (2017). The prognostic value of tumor-infiltrating T lymphocytes in ovarian cancer. *Oncotarget*.
- Linnemann, C., van Buuren, M. M., Bies, L., Verdegaal, E. M., Schotte, R., Calis, J. J., et al. (2015). High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med*, *21*(1), 81-85.
- Liu, F., Lang, R., Zhao, J., Zhang, X., Pringle, G. A., Fan, Y., et al. (2011). CD8+ cytotoxic T cell and FOXP3+ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Research and Treatment*, *130*(2), 645-655.
- Liu, S., Lachapelle, J., Leung, S., Gao, D., Foulkes, W. D., & Nielsen, T. O. (2012). CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research*, *14*(2), R48.
- Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., et al. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*, *169*(5), 2756-2761.

- Logullo, A. F., Nonogaki, S., Pasini, F. S., Osorio, C. A., Soares, F. A., & Brentani, M. M. (2010). Concomitant expression of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in breast ductal carcinoma: association with progression. *Oncol Rep*, 23(2), 313-320.
- Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., et al. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol*, 31(7), 860-867.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Histologie*: Thieme.
- Mahmoud, S. M., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H., et al. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, 29(15), 1949-1955.
- Makdissi, F. B., Machado, L. V., Oliveira, A. G., Benvenuti, T. T., Katayama, M. L., Brentani, M. M., et al. (2009). Expression of E-cadherin, Snail and Hakai in epithelial cells isolated from the primary tumor and from peritumoral tissue of invasive ductal breast carcinomas. *Braz J Med Biol Res*, 42(12), 1128-1137.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704-715.
- Mao, Y., Qu, Q., Chen, X., Huang, O., Wu, J., & Shen, K. (2016). The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 11(4), e0152500.
- Massagué, J. (2008). TGF β in Cancer. *Cell*, 134(2), 215-230.
- 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 Research*, 17(1), 124.

- Mohammed, Z. M., Going, J. J., Edwards, J., Elsberger, B., Doughty, J. C., & McMillan, D. C. (2012). The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*, *107*(5), 864-873.
- Moody, S. E., Perez, D., Pan, T. C., Sarkisian, C. J., Portocarrero, C. P., Sterner, C. J., et al. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*, *8*(3), 197-209.
- Nassar, A., Radhakrishnan, A., Cabrero, I. A., Cotsonis, G. A., & Cohen, C. (2010). Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *18*(5), 433-441.
- Neal, C. L., Henderson, V., Smith, B. N., McKeithen, D., Graham, T., Vo, B. T., et al. (2012). Snail transcription factor negatively regulates maspin tumor suppressor in human prostate cancer cells. *BMC Cancer*, *12*, 336.
- Noble, F., Mellows, T., McCormick Matthews, L. H., Bateman, A. C., Harris, S., Underwood, T. J., et al. (2016). Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with oesophageal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, *65*(6), 651-662.
- Nomura, S., Suzuki, Y., Takahashi, R., Terasaki, M., Kimata, R., Hamasaki, T., et al. (2013). Snail expression and outcome in T1 high-grade and T2 bladder cancer: a retrospective immunohistochemical analysis. *BMC Urology*, *13*(1), 73.
- Ohshio, Y., Teramoto, K., Hashimoto, M., Kitamura, S., Hanaoka, J., & Kontani, K. (2013). Inhibition of transforming growth factor-beta release from tumor cells reduces their motility associated with epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep*, *30*(2), 1000-1006.
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, *7*(6), 415-428.

- Rathore, A. S., Kumar, S., Konwar, R., Makker, A., Negi, M. P., & Goel, M. M. (2014). CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Med Res*, 140(3), 361-369.
- Rathore, A. S., Kumar, S., Konwar, R., Srivastava, A. N., Makker, A., & Goel, M. M. (2013). Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Cancer*, 50(3), 239-244.
- Robert-Koch-Institut. (2012). Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut, Brustkrebs 2012. from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkreb_s_node.html
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., et al. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology*, 26(2), 259-271.
- Schmalhofer, O., Brabletz, S., & Brabletz, T. (2009). E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 151-166.
- Shah, S. P., Roth, A., Goya, R., Oloumi, A., Ha, G., Zhao, Y., et al. (2012). The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486(7403), 395-399.
- Stanton, S. E., & Disis, M. L. (2016). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), 59.
- Tan, T. Z., Miow, Q. H., Miki, Y., Noda, T., Mori, S., Huang, R. Y. J., et al. (2014). Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Molecular Medicine*, 6(10), 1279-1293.

- Teixeira, L., Rothé, F., Ignatiadis, M., & Sotiriou, C. (2016). Breast Cancer Immunology. *Oncology Times*, 38(9), 18-19.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6), 442-454.
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450-461.
- Trzonkowski, P., Szmit, E., Mysliwska, J., Dobyszyk, A., & Mysliwski, A. (2004). CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol*, 112(3), 258-267.
- Vincent, T., Neve, E. P. A., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., et al. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 11(8), 943-950.
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & Zhou, B. P. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Current cancer drug targets*, 13(9), 963-972.
- West, N. R., Milne, K., Truong, P. T., Macpherson, N., Nelson, B. H., & Watson, P. H. (2011). Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*, 13(6), R126.
- Wiedermann, M., & Klapper, W. (2013). Intratumorale Homogenität der epithelialen-mesenchymalen Transition, des Tumorstammzellgehaltes und des lymphatischen Infiltrates in Mammakarzinomen. *Kiel, Univ., Diss.IV, IV, 56 S. : Ill., graph. Darst.*
- Wodarz, A., & Nathke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nat Cell Biol*, 9(9), 1016-1024.

- Yan, X., Jiao, S. C., Zhang, G. Q., Guan, Y., & Wang, J. L. (2017). Tumor-associated immune factors are associated with recurrence and metastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Ther*, 24(2), 57-63.
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14(6), 818-829.
- Yu, L. Y., Tang, J., Zhang, C. M., Zeng, W. J., Yan, H., Li, M. P., et al. (2017). New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health*, 14(1).
- Zhang, X. D., Schiller, G. D., Gill, P. G., & Coventry, B. J. (1998). Lymphoid cell infiltration during breast cancer growth: a syngeneic rat model. *Immunol Cell Biol*, 76(6), 550-555.
- Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., et al. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 6(10), 931-940.
- Zlobec, I., & Lugli, A. (2009). Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World J Gastroenterol*, 15(47), 5898-5906.

7 Danksagung

Ich möchte mich für die Ermöglichung meiner Arbeit bei Herrn Prof. Dr. med. Maass und Herrn Prof. Dr. med. Röcken ganz herzlich bedanken. Vielen Dank, dass Sie meine Arbeit sowohl finanziell als auch durch die mir zur Verfügung stehenden Labore und Fachkräfte und vor allem durch die in der Frauenklinik Kiel erhobenen Daten ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Ibrahim Alkatout, M.A., der mir jeder Zeit von Anfang bis Ende mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen lieben Dank für die herzliche und geduldige Betreuung und Zuverlässigkeit sowie die stets umgehenden Antworten und die fachlich wertvollen Anmerkungen. Mein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer aus dem Institut für Pathologie, Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Klapper, für die sehr gute Unterstützung beim experimentellen Teil meiner Arbeit. Seine fundierten Fachkenntnisse in der Histopathologie waren mir eine sehr große Hilfe und seine Ideen und Vorschläge brachten mich bei Schwierigkeiten in der praktischen Umsetzung und Auswertung sowie Deutung der immunhistochemischen Ergebnisse große Schritte weiter. Vielen Dank außerdem für die Bereitstellung der Laboreinrichtungen.

Einen weiteren außerordentlichen Dank möchte ich Charlotte Botz-von-Drahten aussprechen für ihre stets fürsorgliche, zuverlässige und sorgfältige Unterstützung meiner Arbeit im Labor. Sie stand mir kontinuierlich mit ihrer Hilfe zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr, wofür ich ihr besonders danken möchte. Ebenso gilt mein Dank Olivera Batic für die sorgfältige Anfertigung der TMAs und dem gesamten Team der Hämatopathologie, welches mir bei Fragen jeder Zeit zur Seite stand.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Hedderich für seine tatkräftige Unterstützung und wertvollen Fachkenntnisse für die statistische Auswertung meiner Daten. Das war mir eine große Hilfe.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern Martin und Kirsten Hübner und meinem Freund Sören Pygoch für die Ermöglichung meines beruflichen Werdegangs sowie für die geduldige Unterstützung bedanken. Ich danke euch von Herzen.

8 Publikationen und Preise

- Ibrahim Alkatout, **Friederike Hübner**, Antonia Wengers, Jürgen Hedderich, Meike Wiedermann, Cristina Sánchez, Christoph Röcken, Micaela Mathiak, Nicolai Maass, Wolfram Klapper (2017).

In situ localization of tumor cells associated with the epithelial-mesenchymal transition marker Snail and the prognostic impact of lymphocytes in the tumor micro-environment in invasive ductal breast cancer. *Exp Mol Pathol*, 102(2), 268-275.

- **Friederike Hübner**, Nicolai Maass, Wolfram Klapper, Ibrahim Alkatout (2016), Postervortrag 007, 61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., Stuttgart, 19.-22.10.2016

„In situ Lokalisation von Tumorzellen mit Zeichen der epithelial-mesenchymalen Transition und prognostische Bedeutung von intratumoralen Lymphozyten beim invasiven Mammakarzinom“

Auszeichnung: Posterpreis

In situ Lokalisation von Tumorzellen mit Zeichen der epithelial-mesenchymalen Transition und prognostische Bedeutung von intratumoralen Lymphozyten beim invasiv-duktalem Mammakarzinom

Friederike Hübner¹, Nicolai Maass¹, Wolfram Klapper², Ibrahim Alkatout¹

¹ Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
² Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Einleitung

Brustkrebs ist bei der Frau mit knapp 1,7 Millionen Neuerkrankungen jährlich die mit Abstand häufigste Krebserkrankung weltweit. Mit einem Anteil von circa 70% ist das invasiv-duktales Mammakarzinom die häufigste Entität, worauf sich diese Arbeit konzentriert. Als limitierender Faktor für die kurative Therapie gilt nach wie vor die Fernmetastasierung. Es wird vermutet, dass die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine zentrale Rolle spielt [1]. Hier nehmen epitheliale Tumoren mesenchymale Eigenschaften an. Dadurch können sich einzelne Zellen aus ihrem Verband lösen und so die Fähigkeit zur Migration und Invasivität erlangen. Ein Transkriptionsfaktor, der E-Cadherin herabreguliert und somit EMT induzieren soll, ist Snail [2, 3], dessen Auswirkung auf die Prognose in dieser Arbeit untersucht wurde. Ein weiterer wesentlicher Faktor, der mit Fernmetastasierung assoziiert wird, ist das Vorkommen von intratumoralen Lymphozyten (Gesamt-T-Zellen, zytotoxische und regulatorische T-Zellen). Sodass neben den bekannten Prognosefaktoren Tumorstadium, Lymphknoten- und Metastasenstatus sowie Grading, Hormonrezeptor- und Her2neu-Status ein Fokus auf neue relevante prädiagnostische Faktoren für den Verlauf der Erkrankung gelegt wurde.

Patientenkollektiv und Methoden

Es wurden die Snail-Expression sowie die Quantität intratumoraler Lymphozyten an einem umfassenden Patientenkollektiv der Frauenklinik Kiel (n = 352, 1997-2009) mit invasiv-duktalem Mammakarzinom verschiedener Stadien analysiert, um eine Aussage über die prognostische Relevanz zu erhalten. Das mediane Follow-up aller einbezogenen Patientinnen lag bei 43,22 Monaten. Snail sowie die Oberflächenmarker CD3 für die Gesamt-T-Zellen, CD8 für die zytotoxischen T-Zellen und FoxP3 für die regulatorischen T-Zellen wurden an Tissue Micro Arrays (TMA) der Tumorresektate immunohistochemisch angefarbt und manuell lichtmikroskopisch ausgewertet. Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit SPSS durchgeführt. Es wurden für die Überlebenszeitanalysen Kaplan-Meier-Kurven sowie weiterhin Cox-Regressionen für die zuvor statistisch signifikanten Marker Snail und FoxP3 angefertigt.

Ergebnisse

Repräsentativ für die immunohistochemischen Färbungen von Snail, FoxP3, CD3 und CD8 im Tumor sind in **Abbildung 1** histologische Ergebnisse dargestellt. Positive Zellen zeigen sich jeweils braun angefarbt. Für die Marker CD3 und CD8 konnte in dem Patientenkollektiv zwar eine Tendenz aber kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf nachgewiesen werden (p-Wert für CD3 > 0,13; für CD8 > 0,546). Statistisch signifikante Korrelationen konnten zwischen der Anzahl an Snail- bzw. FoxP3-positiven Zellen im Tumor und dem Verlauf der Erkrankung in Kaplan-Meier-Kurven gezeigt werden (**Abbildung 2**). Der p-Wert für Snail bezüglich des Gesamt- und ereignisfreien Überlebens beträgt jeweils < 0,001. Für FoxP3 konnten Korrelationen mit einem p-Wert von < 0,057 nachgewiesen werden. Diese beiden prognostischen Marker zeigten auch in einer multivariaten Cox-Regression mit der TNM-Klassifikation mit einer Hazard Ratio von 0,07 (Snail > 20 Zellen, p-Wert < 0,001) und 0,44 (FoxP3, p-Wert 0,008) unabhängig signifikante Ergebnisse (**Abbildung 3**). In dem untersuchten Patientenkollektiv ist eine hohe Anzahl beider Marker als prognostisch günstig zu verzeichnen.

Diskussion

Es wird grundlegend angenommen, dass EMT entscheidend zur Entstehung von Metastasen beiträgt [1,2,3]. Die Expression von Snail als ein Teil der EMT ist allgemein assoziiert mit aggressiverem invasivem Tumorwachstum in verschiedenen Tumorentitäten [4,5,6]. Im starken Kontrast hierzu stehen einzelne Analysen, in denen wie in unserer Arbeit der Nachweis von EMT im Mammakarzinom mit längerem Gesamtüberleben korreliert [7]. Unsere immunohistochemische Analyse zeigt sowohl in univariaten als auch in multivariaten Verfahren statistisch hochsignifikante Zusammenhänge zwischen der Quantität von Snail im invasiv-duktalem Mammakarzinom und dem Gesamt- sowie ereignisfreien Überleben. Eine hohe Anzahl von Snail geht in der untersuchten Kohorte mit einem prognostisch günstigeren Krankheitsverlauf einher. Der prognostische Wert von intratumoralen Lymphozyten ist in vielen Analysen beschrieben worden. Insbesondere das Auftreten von CD8 stellt sich als positiver Prädiktor heraus [8]. FoxP3 wird im Gegensatz zu unserem Ergebnis überwiegend mit dem Einhergehen eines ungünstigeren Krankheitsverlaufs in Zusammenhang gebracht [9]. Es zeigte sich mit unserer immunohistochemischen Methodik, dass in uni- und multivariaten Analysen hohe FoxP3-Werte im Tumor mit einem positiveren Krankheitsverlauf einhergehen. Das invasive Verhalten eines Tumors hängt womöglich von der Heterogenität der molekularen Subtypen ab [7] und kann zur Zeit nicht sicher durch lymphozytäre oder EMT-Marker eingestuft werden, obwohl diese einen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben aufzeigen. Daran anschließend sollten weitere Analysen folgen, um in Zukunft aggressives Tumorwachstum spezifisch detektieren und behandeln zu können.

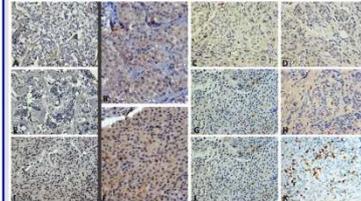


Abbildung 1:

(A, E, I) Immunohistochemische Färbung des EMT-Markers Snail (0, 1-20, >20). Positive Zellen = braune Färbung.
(B, F) Immunohistochemische Färbung von FoxP3 (0, >0). FoxP3 ist lediglich in die Kategorien positiv und negativ eingeteilt.
(C, G, J) Immunohistochemische Färbung von CD3 (0, 1-20, >20).
(D, H, K) CD8 positive Zellen zeigen sich braun (0, 1-5, >5).

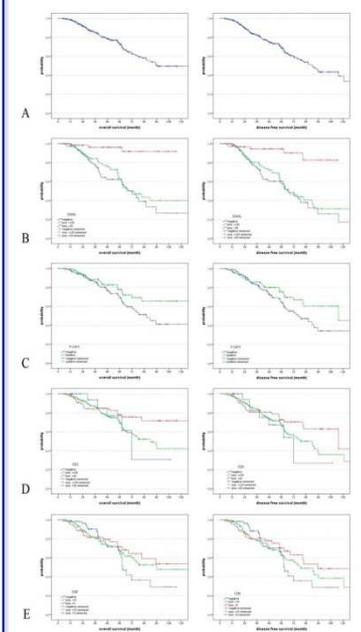


Abbildung 2:

Kaplan-Meier-Kurven, Overall survival und disease free survival jeweils für:

- A Gesamtkohorte
- B Snail-Tumorkategorien
blau 0
grün 1-20
rot >20
- C FoxP3-Tumorkategorien
blau negativ
grün positiv
- D CD3-Tumorkategorien
blau 0
grün 1-20
rot >20
- E CD8-Tumorkategorien
blau 0
grün 1-5
rot >5

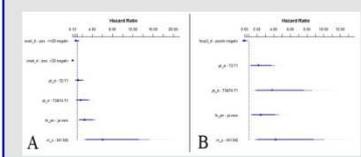


Abbildung 3:

Hazard Ratio für die prädiktiven Faktoren Snail (A) und FoxP3 (B) sowie des TNM-Status bezüglich des Gesamtüberlebens. Sowohl Snail als auch FoxP3 wirken sich in der Patientenkohorte positiv auf das Gesamtüberleben aus.

Literatur

1. Alkatout I, Odeh B, Klapper W, Heigel M, Jostl W, Schürer PKW, Mauderhke C, Wenzers A (2013) Surgical impact of new treatments in breast cancer. *Minerva Ginecol* 65(4):263-283
2. Alkatout I, Wiedemann M, Bauer M, Wenzers A, Jostl W, Klapper W (2013) Transcription factors associated with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in the tumor centre and margin of invasive breast cancer. *Exp Mol Pathol* 94 (1):168-173. doi:10.1016/j.yexmp.2012.09.003
3. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2 (6):442-454. doi:10.1038/nrc022
4. Eble B, Estrand MG, Nestrad JM, Tropé CC, Ivansson O, Gissberg R, Reich B, Carlsson B (2005) Snail, Slug, and Snail-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 103 (8):1631-1643. doi:10.1002/cncr.20946 [pii]
5. Kubota-Saito C, Shiraki H, Taniuchi T, Kawakami Y (2009) Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 15 (3):195-206. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.023
6. Nomura S, Suzuki Y, Takahashi B, Terada M, Iwata S, Hamaoka T, Iomura G, Shimizu A, Kohno Y (2010) Snail expression and outcome in T1 high-grade and T2 bladder cancer: a retrospective immunohistochemical analysis. *BMC Urol* 10:73. doi:10.1186/1471-2490-10-73
7. Tan Z, Miao QH, Miki Y, Hada T, Mori S, Huang FY, Thiery JP (2014) Epithelial-mesenchymal transition, spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med* 6 (10):1278-1293. doi:10.1002/emmm.201404208
8. Al HR, Provenzani E, Dawson SJ, Blevins PM, Lu S, Shin M, East HM, Poole CJ, Miller L, Dunn JA, Swales SJ, Twelves C, Barrett JM, Mamoud SM, Rahnha E, Ellis IO, Liu S, Gao D, Nielsen TO, Pharoah PD, Cairns C (2014) Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,438 patients. *Ann Oncol* 25 (8):1586-1593. doi:10.1093/annonc/ndu191
9. Jiang D, Gao Z, Cai Z, Wang M, He J (2015) Clinicopathological and prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 15:727. doi:10.1186/s12885-015-1742-7

9 Lebenslauf

Name: Friederike Irene Hübner
Geburtsdatum: 13. Oktober 1989
Geburtsort: Northeim
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung/Studium

seit 05/2017 Ärztin in Weiterbildung
Allgemeine und interventionelle Radiologie, Klinikum Kassel

12/2016 Erwerb der ärztlichen Approbation (Gesamtnote 1,83)
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (mündlich, Note 1)

10/2015 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (schriftlich, Note 2)

03/2012 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2,5)

10/2009 Beginn des Studiums der Humanmedizin
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

07/2009 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,6)
Kooperative Gesamtschule Moringen

Promotion

„In situ Lokalisation von Tumorzellen mit Zeichen der epithelial-mesenchymalen Transition und prognostische Bedeutung von intratumoralen Lymphozyten“, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Direktor: Prof. Dr. med. Maass, Betreuer: PD Dr. med. Alkatout, M.A.)

Praktisches Jahr

06 – 10/2016 Radiologie, Universitätsmedizin Göttingen
03 – 06/2016 Innere Medizin, Marienkrankenhaus Kassel
11/2015 – 03/2016 Chirurgie, Marienkrankenhaus Kassel

Berufliche Erfahrung

01/2014 – 09/2014 Studentische Hilfskraft

Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

10/2011 – 01/2014 Mitarbeiterin im Nachtdienst

Schlaflabor Dr. Entzian, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster

10/2011 – 01/2012 Studentische Hilfskraft

Anatomisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Famulaturen

09/2014

Abt. Radiologie

CA Dr. Moussa, Agaplesion Diakonie Kliniken Kassel

08/2014

Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und Schmerzmedizin

CA Prof. Tryba, Klinikum Kassel

03 – 04/2014

Hausärztliche Gemeinschaftspraxis

Dr. med. Engel und Kollegen, Northeim

08 – 09/2013

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

CA Prof. Stolz, Klinikum Thalkirchner Straße, LMU München

08 – 09/2012

Praxis für Dermatologie und Allergologie

Dr. med. Andrea Gräfe, Northeim

07 – 08/2012

Abt. Gynäkologie und Geburtshilfe

CA Prof. Schmolling, Krankenhaus der Augustinerinnen, Köln

Sprachen

- Deutsch (Muttersprache)
- Englisch und Spanisch (Grundkenntnisse)

Persönliche Interessen

- Acrylmalerei, Fitnesstraining, Reisen und Fotografieren